

**UNIVERSIDADE DE UBERABA
RUBENS DIAS DE MELO JÚNIOR**

**PERFIL HEMATOLÓGICO E IMUNOFENOTÍPICO DE LINFÓCITOS
PERIFÉRICOS DE VACAS *BOS INDICUS* EM LACTAÇÃO DAS RAÇAS GIR,
SINDI E GUZERÁ CRIADAS SOB REGIME EXTENSIVO.**

UBERABA (MG)

2013

RUBENS DIAS DE MELO JÚNIOR

**PERFIL HEMATOLÓGICO E IMUNOFENOTÍPICO DE LINFÓCITOS
PERIFÉRICOS DE VACAS *BOS INDICUS* EM LACTAÇÃO DAS RAÇAS GIR,
SINDI E GUZERÁ CRIADAS SOB REGIME EXTENSIVO.**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos, área de concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos do programa de Pós – Graduação em Medicina Veterinária da Universidade de Uberaba.

Orientador: Prof. Dr. André Belico de Vasconcelos
Co-orientadora: Profa. Dra. Joely Ferreira Figueiredo Bittar.

UBERABA (MG)

2013

Ata da Sessão Pública de defesa de dissertação para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos, a que se submeteu o aluno Rubens Dias de Melo Júnior - matrícula 6102305/1, orientado pelo Prof. Dr. André Belico de Vasconcelos

Aos vinte e quatro dias do mês de abril do ano de dois mil e treze, às 9 horas, na sala 2C06 da Universidade de Uberaba, reuniu-se a Comissão Julgadora da defesa em epígrafe indicada pelo o Colegiado do Programa de Mestrado em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba, composta pelos Professores Doutores: André Belico de Vasconcelos - **Presidente**, Joely Ferreira Figueiredo Bittar e Neide Maria da Silva, para julgar o trabalho do candidato Rubens Dias de Melo Júnior, apresentado sob o título: "**Perfil Hematológico Imunofenotípico de Linfócitos Periféricos de Vacas em Lactação Bos Indicus das Raças Gir, Sindi e Guzerá Criadas Sob Regime Extensivo**". O Presidente declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros da Comissão Julgadora. A seguir o candidato dissertou sobre o seu trabalho e foi arguido pela Comissão Julgadora, tendo a todos respondido às respectivas arguições. Terminada a exposição, a Comissão reuniu-se e deliberou pelo seguinte resultado:

APROVADO

REPROVADO (anexar parecer circunstanciado elaborado pela Comissão Julgadora)

Para fazer jus ao título de **MESTRE EM SANIDADE E PRODUÇÃO ANIMAL NOS TRÓPICOS**, a versão final da tese, considerada aprovada devidamente conferida pela Secretaria do Mestrado em Sanidade e produção Animal nos Trópicos, deverá ser entregue à Secretaria dentro do prazo de 30 dias, a partir da data da defesa. O aluno Aprovado que não atender a esse prazo será considerado Reprovado. Após a entrega do exemplar definitivo, o resultado será homologado pela Universidade de Uberaba, conferindo título de validade nacional aos aprovados. Nada mais havendo a tratar, O Senhor Presidente declara a sessão encerrada, cujos trabalhos são objeto desta ata, lavrada por mim, que segue assinada pelos Senhores Membros da Comissão Julgadora, pelo Coordenador do Programa de Mestrado em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da UNIUBE, com ciência do aluno. Uberaba, ao vigésimo quarto dia do mês de abril de dois mil e treze.

Prof. Dr. André Belico de Vasconcelos _____

Profa. Dra. Joely Ferreira Figueiredo Bittar _____

Profa. Dra. Neide Maria da Silva _____

Prof. Dr. Eustáquio Resende Bittar _____

Coordenador do Programa de Mestrado em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da UNIUBE

Poliana Gomes da Silva Alves _____

Secretária do Programa de Mestrado em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da UNIUBE

Ciência do Aluno: Rubens Dias de Melo Júnior

AUTENTICAÇÃO	
UNIVERSIDADE DE UBERABA	Esta fotocópia confere com o original apresentado.
	Uberaba (MG) 26/04/13
	 Secretária Geral dos Programas Stricto-Sensu Poliana Gomes da S. Alves Matrícula 11220

Dedico esta dissertação com todo meu amor e carinho para meu avô pelo grande exemplo de honestidade e simplicidade, fundamentais para o ser dito humano, mas que pouquíssimos que conheci na vida são, para os meus pais e a minha irmã que sempre me incentivaram, me deram força principalmente nas situações mais difíceis e pelo exemplo de pessoas ilibadas e honestas que são. **Essa vitória não é só minha é de vocês também!**

Quero agradecer primeiramente a Deus por sempre, de maneira clara, se fazer presente em minha vida, caminhando sempre ao meu lado e me ouvindo em todas as minhas orações, pois quando acho que todas as portas não mais se abrirão sempre uma ou mais se abrem quando o senhor ouve as minhas preces.

Em segundo lugar a meus pais (Rubens Dias de Melo e Tânia Maria França de Melo) que sempre abdicaram dos sonhos para que eu pudesse realizar o meu, me ensinando sempre a dizer a verdade e a trilhar o caminho do bem por mais árduo e trabalhoso que possa ser. Se eu consegui chegar até aqui, devo isso a vocês!

A minha irmã (Tatiany França Dias de Melo) pela amizade sincera, carinho, lealdade, respeito, paciência e tantas outras qualidades, por se fazer presente sempre ao meu lado.

Não poderia deixar de agradecer ao meu avô (Paulo Dias de Melo) (*in memoriam*) que apesar de homem simples, conseguiu nos repassar valores muito mais importantes que um título de Doutorado ou Mestrado representa, tais como honestidade, sinceridade, lealdade e amor.

A todos os professores do curso de Mestrado em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba que desde o primeiro dia se mostraram solícitos ao desenvolvimento da dissertação de cada colega.

A FAPEMIG pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

Ao Professor Carlo Oliveira e ao Marcos Vinícius (“Marquinhos”) da UFTM que mesmo em meio aos afazeres dedicaram a mim um pouco do tempo, da atenção e conhecimento que possuem me orientando na prática da Citometria de Fluxo de modo que eu pudesse melhorar cada vez mais não somente a parte experimental mas também a minha dissertação e aos colegas Bruno (IFTM) e Márcio (HVU) por separar os animais que se encontravam infestados de teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Gostaria de agradecer ao Professor Olindo Assis Martins Filho pela gentileza, atenção e presteza com que sempre me recebeu e me orientou no desenvolvimento desta dissertação. Tenho certeza que as poucas conversas que tivemos contribuíram e muito para a melhoria da dissertação e também para a minha formação.

Gostaria de agradecer também ao Márcio Sobreira que mesmo com a agenda cheia me recebeu e me orientou melhorando na qualidade dos resultados obtidos.

Agradeço ao meu orientador Professor André Belico de Vasconcelos e a minha co-orientadora Professora Joely Ferreira Figueiredo Bittar pelo empenho e pelas orientações repassadas para o bom desenvolvimento da dissertação.

Quero agradecer também a todos que por ventura não citei aqui mas que contribuíram de alguma maneira para a construção qualitativa deste trabalho, pois o bom resultado deste trabalho não é só meu é também de todos que souberam colocar aqui um pouquinho do que sabem.

A todos vocês meu **MUITO OBRIGADO!**

Abenoa

Atravessas rudes provas...
Acalma-te e abençoa.

Alguma ofensa à vista?
Esquece e abençoa.

Amigos desertaram...
Segue à frente e abençoa.

Sofres dificuldades?
Age, serve e abençoa.

Alguém te menospreza...
Silencia e abençoa.

Por nada te revoltas...
Deus te guarda e abençoa.

RESUMO

O Brasil possui um rebanho bovino com cerca de 200 milhões de cabeças, movimentando cerca de 67 bilhões de reais. Um dos fatores que possibilitam termos o segundo maior rebanho bovino do mundo é a criação a pasto, onde se pode criar uma grande quantidade de animais com custo de produção mais baixo, neste contexto as raças zebuínas são mais indicadas por serem altamente adaptadas às elevadas temperaturas e resistentes a doenças, como a mastite, apresentando assim boa eficiência produtiva em regiões tropicais, onde os taurinos encontrariam dificuldade para conseguir se manter. Tal característica de adaptabilidade e resistência a doenças torna o zebuíno importante objeto de estudo do sistema imunológico bovino. Para este estudo foi utilizado 30 vacas zebuínas leiteiras das raças Gir, Sindi e Guzerá, sendo distribuídos 10 animais para cada raça. As amostras de sangue colhidas foram avaliadas por meio da técnica do hemograma e da imunofenotipagem de leucócitos periféricos por citometria de fluxo de linfócitos T, B, células NK e macrófagos. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade (*One Way – ANOVA*) e posteriormente ao teste de *Kruskal–Wallis*, quando a distribuição dos dados não seguia a distribuição normal. Observou-se entre os parâmetros hematológicos analisados que apenas os leucócitos totais foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) e foi observado maior valor médio para a concentração de hemoglobina para os animais da raça Guzerá, proteína plasmática a raça Gir e maior valor médio de linfócitos, monócitos e eosinófilos para a raça Sindi. Na imunofenotipagem foi observado que bovinos da raça Guzerá apresentaram maior percentual de linfócitos T e de macrófagos em relação aos da raça Gir e Sindi. Nas condições que foi desenvolvido o presente estudo, conclui-se que bovinos zebuínos são hematologicamente adaptados à criação em sistema de produção tropical e são imunologicamente resistentes a doenças, como por exemplo a mastite, quando comparados a animais da raça Holandesa.

Palavras chave: Zebuínos. Citometria de fluxo. Imunologia.

ABSTRACT

Brazil has about 200 million bovine head, moving about 67 billion reais. One of the factors that make possible we have the second largest cattle herd in the world is the fact that we create bovine in a pasture. So we can create a lot of animals with lower cost of production. In in this context zebu breeds are more suitable because they are highly adapted to high temperatures and resistant to diseases such as mastitis, thus presenting good productive efficiency in tropical regions, where taurine breeds would find hard conditions to survive. This characteristic of adaptability and disease resistance makes the zebu important object of study of the bovine immune system. For this study we used 30 zebu dairy cows Gir, Sindhi and Guzerat, 10 animals for each breed. The blood samples collected were analyzed by the haemogram technique and by immunophenotyping of peripheral leukocytes by flow cytometry for T, B lymphocytes, NK cells and macrophages. The data were tested for normality (One Way - ANOVA) and subsequently to the Kruskal-Wallis test when the data distribution did not follow a normal distribution. Were observed between haematological parameters than just the total leukocytes were significantly different ($p < 0.05$) and higher medium value was observed for hemoglobin concentration for animals Guzerat, plasma protein for Gyr and higher average values for lymphocytes, monocytes and eosinophils to the Sindhi breed. In immunophenotyping was observed that Guzerat cattle had a higher percentage of T lymphocytes and macrophages compared to Gir and Sindhi. under the conditions of the present study, it was concluded that cattle are zebu are hematologic adapted to create production system in tropical areas and immunologically resistant to diseases such as mastitis, when compared with animals of the Holstein breed.

Key words: Zebuine. Flow cytometry. T Immunology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fêmea bovina representante da raça Gir.....	18
Figura 2	Fêmea bovina representante da raça Sindi amamentando a cria.....	20
Figura 3	Animais representando a raça Guzerá.....	21
Figura 4	Figura apresentando os componentes da imunidade inata com a resposta imune de macrófagos e células dendríticas.....	25
Figura 5	Funcionamento do citômetro de fluxo.....	27
Figura 6	Representação da população de monócitos em gráfico do tipo <i>dot plot</i> (FSC vs SSC).....	32
Figura 7	Representação da população celular separada em gráfico do tipo <i>dot plot</i> (FSC vs SSC).....	34
Figura 8	Percentual de células marcadas com anticorpos anti CD4 ⁺ , anti CD8 ⁺ , gama delta ($\gamma\delta$), anti CD14 ⁺ e os parâmetros CD-4 ⁺ + CD-8 ⁺ e razão T / B.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores mínimos e máximos por animal por raça, seguido de média± desv. padrão ($X\pm SD$) obtidos por meio do exame de hemograma de 30 vacas híidas das raças Gir, Sindi e Guzerá. Uberaba, MG, 2013.....	36
Tabela 2	Valores mínimos e máximos e média±desv. padrão ($X\pm SD$) obtidos por meio da imunofenotipagem de 30 vacas híidas das raças Gir, Sindi e Guzerá. Uberaba, MG, 2013.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

APCs	Células apresentadoras de antígenos
CF	Citometria de fluxo
CHCM	Concentração da hemoglobina corpuscular média
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FSC	<i>Forward Scatter</i> – Dispersão Frontal
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HVU	Hospital Veterinário de Uberaba
IL-10	Interleucina 10
LBDM	Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração
LEB	Leucoze Enzoótica dos Bovinos
LPS	Lipopolisacarídeo
MHC I	Complexo principal de histocompatibilidade classe I
MHC II	Complexo principal de histocompatibilidade classe II
NK	Célula <i>Natural Killer</i>
PE	Ficoeritrina
RPM	Rotações por minuto
SSC	<i>Side Scatter</i> - Dispersão Lateral
TCR	Receptor para célula T
VCM	Volume corpuscular médio
VG	Volume globular
$\gamma\delta$	Gama – Delta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	Aspectos econômicos, resistência a doenças e relevância do estudo imunológico de raças zebuínas.....	17
2.2	Raça Gir.....	18
2.3	Raça Sindi.....	19
2.4	Raça Guzerá.....	20
2.5	HEMATOLOGIA DE BOVINOS.....	22
2.6	IMUNIDADE EM BOVINOS.....	23
2.7	Citometria de Fluxo.....	26
3	OBJETIVOS.....	29
3.1	Objetivo geral.....	29
3.2	Objetivo específico.....	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1	Animais experimentais.....	30
4.2	Coleta de sangue.....	30
4.3	Perfil Hematológico.....	31
4.4	Avaliação do perfil Imunológico.....	31
4.4.1	Análise da imunofenotipagem dos linfócitos periféricos.....	32
4.5	Análise estatística.....	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1	Avaliação dos parâmetros hematológicos dos zebuínos das raças Gir, Guzerá e Sindi.....	36
5.2	Avaliação dos parâmetros imunofenotípico dos zebuínos das raças Gir, Guzerá e Sindi.....	38
6	CONCLUSÕES.....	43
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

1 INTRODUÇÃO

Para que países de clima tropical consigam suprir a demanda de alimentos de origem bovina faz-se necessário não somente a utilização de animais produtivos, mas também adaptados às condições ambientais e sanitárias. Bovinos *Bos indicus* apresentam pelagem curta, lisa e densa (4700 – 5000 pêlos / po^2) (DOMINGUES, 1974; SANTIAGO, 1983; VERISSIMO et al., 1998) que dificulta o estabelecimento de ectoparasitos sobre a pele. Os animais com aptidão leiteira apresentam boa produtividade sob condições tropicais, como o Gir (2575 Kg, Faria et al., 2001), o Sindi (2346 Kg, Cruz et al., 2009) e Guzerá (2018Kg, Ribeiro et al., 2009), além de apresentarem baixo índice de mastite, sendo registrado por Souza (2010) que encontrou índice de 9,4% em animais da raça Sindi e Guzerá, bem abaixo do registrado para vacas da raça holandesa por Cunha et al., (2008) que foi de 38,7%.

Tais observações mostram que os zebuínos apresentam boa produtividade leiteira, são resistentes ao estabelecimento de ectoparasitos e a mastite. Na literatura alguns trabalhos mostram a importância do estudo da imunologia bovina (MARCIANO, 2004; BITTAR et al., 2004; MORAES 2008), traçando um paralelo entre características de susceptibilidade e resistência a doenças e parasitos para raças taurinas e zebuínas com base no perfil imunofenotípico. Porém, ainda não existe descrita uma caracterização imunológica comparativa entre vacas zebuínas das raças Gir, Sindi e Guzerá, criadas sob sistema extensivo em regiões tropicais.

Desta forma o presente trabalho revela - se importante para o estudo das características imunológicas dos zebuínos, avaliando assim o perfil imunofenotípico de vacas zebuínas de elevada produção leiteira Gir, Sindi e Guzerá de maneira a elucidar a participação de algumas populações celulares no processo de resistência a doenças infectoparasitárias.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos econômicos, resistência a doenças e relevância do estudo imunológico de raças zebuínas

O Brasil é dono do segundo maior rebanho bovino do mundo com cerca de 200 milhões de cabeças, movimentando cerca de 67 bilhões de reais. Um dos fatores que contribuem para a formação desses números expressivos é a criação de animais a pasto (MAPA, 2013). Neste sentido, animais *Bos indicus* sempre se mostram importantes para a melhoria da qualidade produtiva da bovinocultura, uma vez que após serem importados e se miscigenarem com bovinos que aqui já habitavam, conseguiram transmitir para as crias importantes atributos como a tolerância ao calor e a resistência a parasitos, viabilizando desta forma a criação de bovinos a pasto (SILVA, 2006).

Com a finalidade de reunir num mesmo animal a produtividade de raças taurinas especializadas para a produção leiteira e a alta adaptabilidade do zebuínio às condições de produção nos trópicos, foi bem divulgado o emprego do cruzamento de animais da raça Gir com a Holandesa, formando o Girolando que reúne a capacidade leiteira do Holandês com a rusticidade do Gir para produção de leite em regiões tropicais (WENCESLAU et al., 2000).

Entre as características de resistência dos zebuínios a parasitos podemos citar características fenotípicas de pele e pêlo. Nos zebuínios, apesar de mais fina, a pele é mais resistente que a do *Bos taurus* por dificultar a ação de fixação da probóscide de ectoparasitos como o carrapato bovino (DOMINGUES, 1974; SANTIAGO, 1983). Com relação à pelagem, o zebuínio apresenta-se curta, lisa e densa (4700 – 5000 pêlos / pol²), que inibe ou impede que pequenos parasitos se estabeleçam sobre a pele, já a pelagem longa, fina e rala dos taurinos (cerca de 3000 pêlos / pol²) facilita o estabelecimento do carrapato sobre a pele do hospedeiro servindo de abrigo contra predadores que deles se alimentam (DOMINGUES, 1974; SANTIAGO, 1983; VERISSIMO et al., 1998).

Com relação a resistência a mastite, Fonseca et al., (2008) estudaram o perfil da expressão de genes relacionados à resistência a mastite em bovinos leiteiros das raças Holandesa preto e branco (PB) e Gir leiteiro, observando que vacas da raça Gir com mastite tenderam a expressar 7,35 vezes menos o gene para a expressão de interleucina 10 (IL-10) envolvida na inibição da atividade de células NK, quando comparadas às vacas da raça Holandesa PB também com mastite.

2.2 Raça Gir

São oriundos do sul da península de Kathiawar (Índia) que apresenta temperaturas entre 10 e 44°C, durante todo o ano (SANTOS, 1994). É um bovino característico por apresentar chifres voltados para trás, por vezes retorcidos, barbela bem desenvolvida e pelagem de coloração branca, vermelha, amarela e preta podendo apresentar várias combinações entre essas cores, como retratado na figura 1 (LEDIC, 2002).



Figura 1: Fêmea bovina representante da raça Gir.

FONTE: <httpgir-leiteiro.comvacas-da-genetica-aditiva-ultrapassam-10-mil-kg->

A importação desses animais iniciou a partir de 1911 (SANTOS, 1994), sendo frequentemente utilizada no cruzamento com raças de origem européia especializadas para produção leiteira, devido às dificuldades de adaptação que taurinos encontram (estresse térmico, baixa qualidade de alimento, parasitos e manejo inadequado) em regiões tropicais (FACÓ et al., 2002; SILVA et al. 2010).

Na Índia é muito utilizada para o fornecimento de leite (FARIA et al., 2001). No Brasil, foi observado por Ribeiro et al., (2009) que estudaram a produção de leite em vacas Gir e Guzerá em diferentes ordens de parto, na região litorânea do estado do Rio Grande do Norte observaram que vacas da raça Gir, produziram em 305 dias de lactação 2575 Kg de leite, com maior teor de lactose entre as vacas múltíparas em comparação as da raça Guzerá.

Veríssimo et al., (2008) contaram o número de mastócitos dérmicos em animais das raças Nelore, Gir, Holandês, Pardo Suíço e Jersey e relacionaram com a quantidade de

Rhipicephalus (Boophilus) microplus entre as raças. Foi observado pelos autores que animais da raça Gir apresentaram contagens mais elevadas de mastócitos/mm² (61.73) em relação a raça Holandesa (48.76) e Jersey (29.32). As maiores contagens foram obtidas em animais Nelore (139,42) seguido por animais da raça Pardo-Suíço (67,31), sendo observado pelos autores que quanto maior o número de mastócitos menor era a população de carrapatos, demonstrando assim a resistência da raça Gir a ectoparasitos frente a raças taurinas leiteiras criadas em regiões tropicais.

2.3 Raça Sindi

A raça Sindi é originária da região de Kohistan, na província de Sindi no Paquistão que apresenta clima semi-árido com precipitação anual de até 300mm. A introdução desses animais no Brasil ocorreu a partir de 1952, onde desde então se manteve concentrado em poucos rebanhos, não apresentando uma evolução expressiva como as demais raças bovinas importadas para o Brasil (TURCO et al., 2004).

As condições inerentes à raça derivam de condições próprias no país de origem. São características desses animais o tamanho pequeno, com bela aparência, apresentando cabeça pequena com chifres pequenos e grossos, orelhas de tamanho médio e largas. A pigmentação da pele e das mucosas é escura, recoberta por uma pelagem fina de coloração que pode ser vermelha, vermelha escura, ou castanha (figura 2). Adapta-se facilmente a condições de solo e clima diferentes, com notável recuperação após um período seco, apresentando elevada resistência e rusticidade, boa fertilidade e produção leiteira, produzindo em 275 dias de lactação 2346 Kg numa região semi-árida. O gado Sindi na Índia, juntamente com animais das raças Sahiwal, Tharparjar e Haryana são tidas como as melhores raças para produção leiteira (TURCO et al., 2004; CRUZ et al., 2009).



Figura 2: Fêmea bovina representante da raça Sindi amamentando a cria.
FONTE: <http://www.sindi.org.brportalindex.phpnoticias188>

Souza e colaboradores em 2007 estudaram o gado Sindi quanto a resistência a elevadas temperaturas no semi-árido do Nordeste brasileiro, por meio da aferição da temperatura retal, frequência cardíaca, respiratória e análise de parâmetros hematológicos. Foi observado que animais desta raça apresentaram maior grau de adaptabilidade entre as zebuínas para as regiões semi-áridas, sendo altamente tolerantes ao calor, alcançando quase a nota máxima no teste de tolerância ao calor (por meio da aferição da temperatura retal, frequência respiratória nos animais que estão na sombra e sob incidência solar direta) preconizado pelos autores, ficando atrás somente de caprinos da raça Moxotó, nativos da região. Tal fato garante que a raça Sindi possa ser explorada na região semi-árida do Nordeste brasileiro com maiores chances de sucesso para a atividade pecuária da região.

2.4 Raça Guzerá

O Guzerá é originário de uma região da Índia conhecida como Gujarat que apresenta solo arenoso, precipitação anual de até 700mm concentradas entre julho e outubro, com temperatura variando entre 5 e 50°C durante o ano. Começou a ser explorada no Brasil a partir de importações realizadas em 1870 (SANTOS, 2005; MUCARI-OLIVEIRA, 2003; PELICIONI et al., 2003).

Entre os zebuínos é a raça tida como a menos exigente e com potencial genético apropriado para regiões brasileiras onde a diversidade ambiental é expressiva. É um animal importante para a formação de outras como a Indubrasil e a Guzolando. É uma raça que apresenta boa produção leiteira. Ribeiro et al., (2009) observaram que vacas multíparas da raça Guzerá produziram em 305 dias de lactação 2018Kg de leite, com maior teor de gordura (4,93%) em comparação a vacas da raça Gir (4,20%) com a mesma ordem de parto.

Animais da raça Guzerá se destacam pela imponência, apresentando chifres grandes em forma de lira, pelagem que varia do cinza claro ao escuro, podendo ser branca nas fêmeas. Os membros são bem desenvolvidos e musculosos, com pele escura e pigmentada, como mostrado na figura 3 (MUCARI - OLIVEIRA, 2003; PELICIONI et al., 2003; SANTOS, 2005).



Figura 3: Animais representando a raça Guzerá.
FONTE: www.guzera.org.br

Furtado e colaboradores em 2012 avaliaram tourinhos da raça Guzerá com idade média de 31 meses mantidos em confinamento, monitorando a influência de variáveis climáticas sobre as fisiológicas (frequência respiratória, temperatura retal e superficial). Não foi observada variação significativa dos parâmetros fisiológicos quando em correlação com variáveis climáticas, indicando que animais desta raça são bem adaptados as condições de criação nos trópicos.

2.5 HEMATOLOGIA DE BOVINOS

Hemograma é um exame simples e que não exige grandes recursos tecnológicos, todavia fornece informações importantes sobre o estado de saúde do animal, no momento da coleta do sangue (GARCIA-NAVARRO, 1998).

Para tanto é necessário estabelecer valores de referência para cada espécie, com base em animais saudáveis. Porém tais referências podem sofrer variações influenciadas por fatores etários, sexuais, raciais, nutricionais, parasitários, infecciosos, ambientais (altitude, umidade relativa do ar e temperatura ambiente) e de manejo, devendo os valores de referências serem preferencialmente regionais (BIRGEL JUNIOR et al., 2001; VIANA et al., 2002).

O perfil hematológico é útil para a avaliação das diferentes fases do ciclo produtivo de bovinos leiteiros. Campos e colaboradores em 2008 com o objetivo de avaliar parâmetros hematológicos (hematócrito, hemoglobina, leucócitos totais, neutrófilos segmentados e linfócitos totais) em correlação com cortisol em vacas holandesas, observou uma diminuição do número médio de eosinófilos entre inverno ($572/\mu\text{l}$) e verão ($318/\mu\text{l}$), sendo esta queda atribuída ao efeito da estação verão e não do efeito do cortisol sobre parâmetros hematológicos.

Birgel Júnior e colaboradores em 2001 estudaram a influência exercida pelos fatores etários sobre o leucograma de 253 fêmeas bovinas da raça Jersey, soro negativas para o vírus da Leucose Enzoótica dos Bovinos (LEB), com idade entre 3 e 72 meses, criadas em regime intensivo no Estado de São Paulo. Neste estudo foi observado que ocorreu uma queda gradativa de leucócitos totais entre 24 ($13962/\text{mm}^3$) e 72 meses ($10564/\text{mm}^3$), bem como nas contagens de neutrófilos ($2709/\text{mm}^3$ vs $2657/\text{mm}^3$), basófilos ($91/\text{mm}^3$ vs $67/\text{mm}^3$), linfócitos ($10507/\text{mm}^3$ vs $6857/\text{mm}^3$) e monócitos ($214/\text{mm}^3$ vs $113/\text{mm}^3$), com aumento apenas no número de eosinófilos ($441/\text{mm}^3$ vs $870/\text{mm}^3$), sendo estas diferenças atribuídas pelo autor como sendo influência da idade sobre estes parâmetros hematológicos.

Costa e colaboradores no ano 2000 avaliaram a influência dos fatores etários no leucograma de fêmeas *Bos indicus* da raça Nelore soro negativas para o vírus da LEB. Para tanto foram colhidas amostras sanguíneas de 158 animais divididos de acordo com as seguintes faixas etárias: até 3 meses, 3 a 6 meses, 6 a 12 meses, 12 a 24 meses, 24 a 48 meses, 48 a 72 meses e maior que 72 meses. Os valores absolutos de Neutrófilos, Bastonetes, Basófilos e de Monócitos não sofreram influências relacionadas com a idade. Os Neutrófilos segmentados sofreram influência com o avançar da idade dos animais, atingindo valor máximo ($3918/\text{mm}^3$) até os 3 meses de vida, após este período foi observado queda dos

valores, até atingir a contagem mínima ($2416/\text{mm}^3$) que ocorreu entre 6 e 12 meses de vida. Com relação aos Linfócitos típicos foi observado valor mínimo ($5906/\text{mm}^3$) entre 48 e 72 meses. Linfócitos atípicos apresentaram queda dos valores a partir dos 48 meses, atingindo valor mínimo ($760/\text{mm}^3$) entre 48 e 72 meses. Ocorreu aumento do número absoluto de Eosinófilos até o período de 24 a 48 meses de idade, atingindo $999 \text{ células}/\text{mm}^3$.

Abud et al.,(2008) estudaram 58 novilhas *Bos indicus* da raça Nelore com média de 17 meses de idade púberes e pré-púberes, criadas na Embrapa Cerrados, Planaltina-DF e observaram aumento na média da contagem de Leucócitos totais ($12,68 \times 10^3/\text{mm}^3$ vs $10,8768 \times 10^3/\text{mm}^3$), Eosinófilos ($616,3168 \times 10^3/\text{mm}^3$ vs $378,5168 \times 10^3/\text{mm}^3$), Linfócitos ($7938,3868 \times 10^3/\text{mm}^3$ vs $6722,7468 \times 10^3/\text{mm}^3$) e Monócitos ($483,7768 \times 10^3/\text{mm}^3$ vs $248,5568 \times 10^3/\text{mm}^3$) de novilhas púberes em relação as pré-púberes respectivamente.

Souza e colaboradores em 2007 avaliaram o número de hemácias, hematócrito, hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM) e concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM) durante a estação chuvosa e seca de doze fêmeas *Bos indicus* da raça Sindi, com idade média de 18 meses, criadas em regime extensivo na região semi-árida do Nordeste brasileiro e observaram aumento dos valores do período seco para o chuvoso para hemoglobina ($11,1 \text{ g/dl}$ vs $13,5 \text{ g/dl}$), hematócrito ($33,9\%$ vs $38,9\%$), VCM ($36,9 \text{ } \mu^3$ vs $44,8 \text{ } \mu^3$) e CHCM ($32,6\%$ vs $34,6\%$) no período chuvoso, sendo sugerido pelos autores que as variações observadas nos parâmetros sanguíneos foram influenciadas pela elevada umidade relativa do ar durante o período chuvoso.

2.6 IMUNIDADE EM BOVINOS

A imunologia moderna tem evoluído muito, juntamente com a biologia molecular, compreendendo melhor o funcionamento do sistema imune, que é basicamente dividido em duas linhas de defesa (ABBAS, 2008).

A primeira linha de defesa do organismo é formada pela imunidade inata, também chamada de natural, composta por mecanismos inespecíficos de defesa. Sendo constituída pelas barreiras bioquímica, física e celular (ABBAS, 2008). Na barreira bioquímica as proteínas que compõem o sistema complemento são capazes de se ligar covalentemente a proteínas específicas da superfície microbiana, induzindo a lise de microrganismos que sofreram fixação de fatores do complemento, promovendo a fagocitose dos microrganismos onde o complemento encontra-se ativado (TIZARD, 2002; ABBAS, 2008). A barreira física é composta pelo epitélio de revestimento que abriga também uma população celular residente.

Nos bovinos, os mastócitos dérmicos atuam inibindo a fixação de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, sendo observado por Veríssimo et al., (2008) em animais da raça Nelore apresentaram, em valores médios, maior número de mastócitos dérmicos por mm² (139,42) que animais da raça Gir (61,73) quando comparado a animais da raça Holandesa (48,76), encontrando uma correlação negativa entre o número de mastócitos na derme superficial e a quantidade de carrapatos, demonstrando desta forma a importância da imunidade inata na resistência bovina frente a infestação por carrapato.

Já a barreira celular é composta pelos fagócitos (neutrófilos e macrófagos) e células *natural killers* (NK). Os macrófagos são células que se originam de precursores sanguíneos (monócitos) e ao se situarem em diferentes tecidos recebem nomes especiais como células de Küpffer no fígado, macrófagos alveolares no pulmão e micróglia no sistema nervoso central. Uma das maneiras de ativação dos macrófagos ocorre através da ligação do lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano ao CD14⁺, estimulando o macrófago a destruir microrganismos através da fagocitose. Os macrófagos apresentam ainda a habilidade de permanecer por mais tempo que os neutrófilos nos locais da inflamação, sendo por isso células efetoras dominantes nas fases mais tardias da resposta imune natural (ABBAS, 2008).

Mecanismos de ativação envolvendo moléculas da superfície de células NK ainda são pouco conhecidos. Sivori et al., (1997) demonstraram que o principal desencadeador de lise celular, mediada por células NK, ocorre através de uma proteína de 46KDa (NKp46) com expressão restrita em células NK. Segundo Warren et al., (2005) a designação CD para a NKp46 é CD335.

Elhmouzi-Younes et al., (2009), estudaram células NK de bovinos, da raça holandesa, entre 2 dias e 3 anos de idade com o objetivo de compreender melhor a imunidade inata em bezerros recém nascidos. Foi observado que bezerros com idade inferior a 8 dias apresentaram em média 1/3 de células NK entre os leucócitos mononucleares (2,5%), em comparação com bezerros com mais de 8 dias de vida (7,5%).

As células dendríticas são as principais células apresentadoras de antígenos (APCs) capazes de desencadear uma resposta dos linfócitos T. Após realizar endocitose de antígenos proteicos de microrganismos extracelulares ou antígenos proteicos utilizados como adjuvantes em vacinas, as células dendríticas migram para os linfonodos apresentando esses antígenos via complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC II) para células T CD4⁺ *naïve*, se tornando APCs eficazes (Figura 4) (ABBAS, 2008).

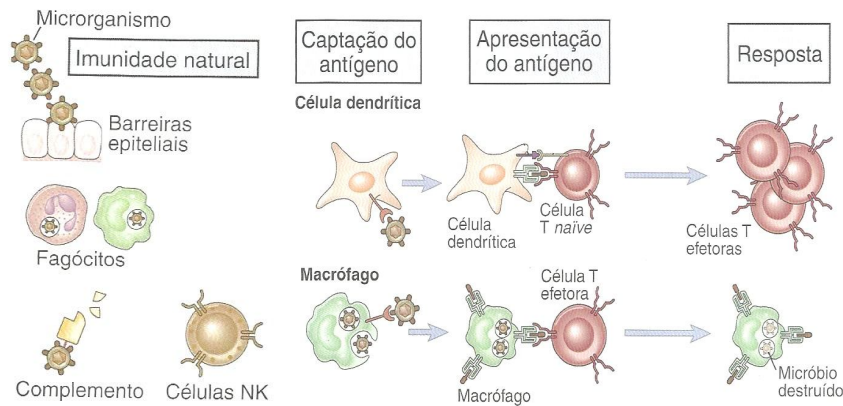


Figura 4: Figura apresentando os componentes da imunidade inata com a resposta imune de macrófagos e células dendríticas.

FONTE: ABBAS, 2008, modificado.

A segunda linha de defesa é a imunidade adquirida, também chamada de adaptativa, composta por linfócitos e anticorpos, sendo por isso subdividida em celular e humoral. A imunidade humoral é responsável pela produção de anticorpos por células B, combatendo microrganismos que não se encontram dentro de células, opsonizando-os para a realização de fagocitose e se ligando a fatores do complemento ativado (ABBAS, 2008).

A importância da imunidade humoral na criação de bovinos situa-se na amamentação do colostro, pois é através do colostro (rico em imunoglobulinas) que o bezerro adquire resistência às doenças, enquanto o organismo ainda não é imunologicamente competente, o que garante melhores condições de desenvolvimento na fase de cria, deixando o bezerro em bom estado de saúde para outras fases de criação (MACHADO NETO et al., 1997).

A imunidade mediada por células se inicia com a apresentação via MHC II de antígenos proteicos de microrganismos extracelulares, fagocitados pelas células dendríticas para células T $CD4^+$, ativando-as que respondem estimulando células como os macrófagos, células dendríticas e células B, reforçando a atuação destas células na imunidade inata. A resposta através de células T $CD8^+$ são iniciadas por antígenos microbianos presentes no citosol (vírus) de células infectadas e apresentadas via complexo principal de histocompatibilidade classe I (MHC I) de células dendríticas, terminando com o desenvolvimento de grânulos citoplasmáticos contendo perforina e granzima ativando a lise da célula alvo (ABBAS, 2008).

De todos os linfócitos sanguíneos de bovinos adultos, somente 20 a 30% são da linhagem CD4 que apresentam a habilidade de expressar moléculas de superfície responsáveis por ativar outras células como os macrófagos, linfócitos B e células dendríticas. Linfócitos T

CD4⁻ CD8⁻ apresentam receptor para células T (TCR) do tipo γ/δ e expressam WC1. Nos ruminantes estima-se que cerca de 60% da população de células T tenham TCR do tipo $\gamma\delta$ que se caracterizam por terem atividade fundamentalmente citotóxica, não necessitando serem apresentados à moléculas MHC II que se encontram na superfície das APCs. Apresenta, portanto potencial de reconhecer e responder rapidamente a moléculas expressas por tipos celulares distintos, reconhecendo diretamente os antígenos alvo, de modo semelhante ao realizado por células NK (TIZARD, 2002; MORAES, 2008; MURPHY, 2010).

Marciano (2004) caracterizou o perfil leucocitário e fenotípico de linfócitos (CD4⁺, CD8⁺ e CD21⁺) da circulação periférica de bovinos das raças Holandesa, Pardo-Suíça, Hereford, Nelore, Gir e Guzerá. Ao analisar o perfil fenotípico de linfócitos entre animais da mesma raça, foi evidenciada pela autora diferença significativa para os percentuais de linfócitos (62,08%) entre as raças taurinas, já nas raças zebuínas foi observado que animais da raça Nelore e Guzerá apresentaram percentual de linfócitos significativamente menor que o observado para a raça Holandesa. Entre as raças foi evidenciado que animais da raça Holandesa (43,2%) e Pardo-Suíça (56,96%) apresentaram percentual de linfócitos T significativamente superiores em relação à Gir (34,01%) e significativamente inferior em relação a Guzerá (59,41%).

Bittar et al., (2004), estudaram o perfil fenotípico de linfócitos periféricos de bovinos Hereford, Holandês e Pardo-Suíço e observaram que houve uma diferença quanto a porcentagem de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ entre as raças Holandesa (25,32% para células T CD4⁺ e 17,82% para células T CD8⁺) e Pardo-Suíça (32,39% para células T CD4⁺ e 24,56% para células T CD8⁺). A raça Holandesa apresentou maior percentual de linfócitos B (CD21⁺) (18,58%) e menor percentual de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺), em comparação a raça Hereford que foi de 12,25% para CD21⁺.

2.7 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo (CF) é um método de análise que permite a obtenção de informações quantitativas e qualitativas por meio da caracterização biológica (por meio do uso de anticorpos), física (tamanho e granulosidade) ou de complexidade da parede celular por meio da utilização de anticorpos, ou ainda qualquer outra partícula como microrganismos, sendo portanto uma ferramenta de análise multiparamétrica, com capacidade de analisar um grande número de células ou partículas em suspensão numa amostra, de maneira individual (BROWN e WITTEWER et al., 2000; RIESEBERG et al., 2001).

Um citômetro de fluxo é composto basicamente por 5 elementos: a(s) fonte(s) de radiação, filtros ópticos para a seleção de um determinado comprimento de onda a partir de um espectro de onda mais amplo, detectores dos sinais emitidos, a câmara de fluxo onde as células passam em fila única e uma unidade processadora dos dados (SILVA et al., 2004; BACAL e FAULHABER, 2003). Esta suspensão celular é sugada para a câmara, onde ocorre a passagem linear das células no centro do fluxo do fluido isotônico, sendo interceptadas através do feixe de laser que se encontra perpendicular a partícula (Figura 5A), sofrendo dispersão frontal (*Forward Scatter* - FSC) e lateral (*Side Scatter* - SSC), (Figura 5B e 5C) captada por fotodetectores. A combinação desses tipos de dispersões revela informações como o tamanho e a complexidade celular (SILVA et al., 2004).

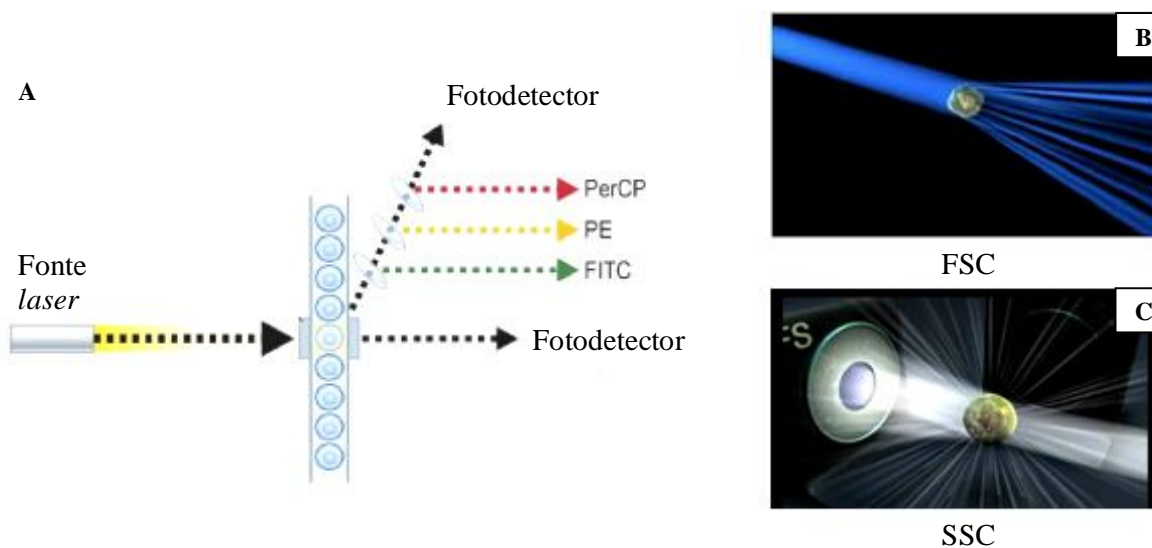


Figura 5: Funcionamento do citômetro de fluxo. (A) Partículas em suspensão passando em fila indiana perpendicularmente ao feixe de laser, com a filtragem dos comprimentos de onda. (B) Célula sendo interceptada pelo raio laser sofrendo dispersão frontal (FSC). (C) Célula sendo interceptada pelo raio laser sofrendo dispersão lateral (SSC).
FONTE: www.imunohemato.blogspot.com (modificado)

Após a interceptação do laser sobre a célula ocorre emissão de luz que são coletadas por sistemas ópticos que direcionam a luz para uma série de espelhos dicróicos e filtros, responsáveis por isolar uma banda de comprimento de onda que então são detectados por tubos fotomultiplicadores e digitalizados pelo computador que pode dispor as informações em histograma ou *dot plot* (BROWN e WITTWER, 2000).

Anticorpos podem se ligar a fluorocromos que se ligam a receptores específicos na membrana da célula e ao serem interceptados pelo feixe de *laser* são excitados para um nível maior de energia. Ao retornar ao estado basal os fluorocromos emitem energia, por meio de um comprimento de onda maior e específico (espectro de cor) que são captados e digitalizados pelo computador (BROWN e WITTWER, 2000). Fluorocromos diferentes

apresentam distintos espectros de absorção e emissão que podem ser separadas por filtros ópticos no citômetro (BACAL e FAULHABER, 2003), com possibilidade de análise de mais de 20 parâmetros utilizando diferentes combinações de anticorpos (ALVAREZ et al., 2010).

Na citometria de fluxo uma variedade de espécimes (sangue, medula óssea, urina e tecidos sólidos) (BROWN e WITTWER, 2000) podem ser marcadas com anticorpos ligados a fluorocromos e grande número de células e subpopulações celulares podem ser analisadas. Este processo recebe o nome de imunofenotipagem (BACAL e FAULHABER, 2003), o que torna a citometria de fluxo uma ferramenta valiosa para a avaliação do estado de saúde do organismo, ou para a comparação do perfil imunofenotípico entre raças zebuínas leiteiras, (Gir, Sindi e Guzerá) objetivo central desta dissertação.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar o perfil hematológico e imunofenotípico de linfócitos periféricos de vacas em lactação das raças Gir, Sindi e Guzerá, estabelecendo um perfil imunofenotípico comparativo entre as três raças citadas, em criação extensiva sob clima tropical.

3.2 Objetivos específicos

- Construir um banco de dados com informações de parâmetros hematológicos e imunológicos de vacas das raças Gir, Sindi e Guzerá;
- Caracterizar um perfil imunológico comparativo entre bovinos das raças Gir, Sindi e Guzerá em condições de campo;
- Correlacionar os perfis obtidos com as características de resistência imunofenotípica ou de adaptabilidade em ambiente tropical;

4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais

O trabalho experimental foi realizado no período de 20 de dezembro de 2012 a 20 de janeiro de 2013, utilizando 30 vacas híbridas em lactação divididas igualmente entre as raças Gir, Sindi e Guzerá, com idade entre 2 e 10 anos. Os animais da raça Gir e Guzerá apresentavam idade entre 4 e 10 anos e a Sindi entre 3 e 6 anos. A temperatura ambiente variou entre 20 e 26°C, umidade entre 69 e 93% e a pluviosidade média registrada para o período ficou entre 0 e 4902 mm. Estes dados obtidos através do site (www.iftm.edu.br/uberaba/met/consulta.php#) do Instituto federal do Triângulo Mineiro, campus Uberaba (IFTM). Os animais pertencem a Fazenda Escola da Universidade de Uberaba (19° 31.75' S e 48° 02.28' O), situada a margem da rodovia Br 050 Km 145, localizada a 26 Km da cidade de Uberaba, Minas Gerais e mantidos em pasto formado por *Cynodon spp* cultivar tifton recebendo sal mineral e água *ad libitum* e receberam todas as vacinas exigidas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

Para os animais experimentais foi realizada a avaliação da contagem de células somáticas do leite (CCS) pelo laboratório Clínica do Leite da Universidade de São Paulo, na cidade de Piracicaba, sendo encontrado valor médio em 1000 células/ml, 289,3 células para a raça Gir, 298,7 para a Sindi e 238,8 células para a raça Guzerá.

4.2 Coleta de sangue

O sangue dos animais experimentais foi coletado, por meio de punção da veia jugular, utilizando agulha (25x8mm) apropriada para sistema de coleta a vácuo e armazenados em tubos a vácuo de poliestireno, estéreis, da marca Vacuette® (Campinas – São Paulo – Brasil) contendo anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) K3 para a realização do exame de hemograma e imunofenotipagem. Para a realização do exame de hemograma as amostras foram armazenadas sob refrigeração em caixas de isopor e enviadas pessoalmente para o Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário de Uberaba (HVU), Minas Gerais. As amostras destinadas a realização da imunofenotipagem foram armazenadas em caixa de isopor (sem refrigeração) e enviadas pessoalmente para o Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração (LBDM) do Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ em Belo Horizonte, Minas Gerais.

4.3 Perfil hematológico

O perfil hematológico dos animais experimentais foi realizado analisando-se primeiramente a viabilidade da amostra quanto à existência de fibrina e coágulo, em seguida foi realizada a análise da série eritrocitária e contagem do número de plaquetas, por meio da operação do contador automático de células sanguíneas modelo ABC Vet[®] (ABX Diagnostics[®] – Montpellier – France) sendo avaliado, número de hemácias totais, a dosagem de hemoglobina e o número de leucócitos totais. A seguir foi realizada a confecção das lâminas com os esfregaços sanguíneos, coradas pelo kit panótico rápido para uso hematológico marca Laborclin[®] (Pinhais – Paraná – Brasil) para a realização da contagem diferencial de leucócitos (linfócitos, neutrófilos segmentados, bastonetes, monócitos e eosinófilos), mediante contagem e análise das células presentes na lâmina, utilizando microscópio óptico marca Olympus, com aumento de 1000x.

4.4 Avaliação do perfil imunológico

O ensaio de citometria de fluxo para a imunofenotipagem dos leucócitos periféricos seguiu o seguinte protocolo. Em tubos individuais de poliestireno com capacidade de cinco ml foram adicionados anticorpos monoclonais mouse antibovine CD4⁺, CD8⁺, CD14⁺ e CD25⁺ (AbD Serotec[®]), marcados com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), diluídos em PBS *wash* 1x (solução salina tamponada com fosfato – PBS = 0,15M, 8g/L de NaCl, 2g/L de KCl, 2g/L de KH₂PO₄ e 1,15g/L de Na₂HPO₄, pH 7,2 com 0,5% de albumina bovina sérica e 0,1% de azida sódica), na concentração de 1:50, e o anticorpo anti $\gamma\delta^+$ WC1 (FITC) na concentração de 1:25. Em tubos individuais de poliestireno de cinco ml foi adicionado anticorpo monoclonal mouse antibovine CD21(FITC) na concentração de 1:50, juntamente com o anticorpo monoclonal mouse antibovine CD335⁺ marcado com ficoeritrina (PE) na concentração de 1:25 diluídos em PBS *wash* 1x.

Foram adicionados aos anticorpos diluídos 30 microlitros (μ L) de sangue total previamente homogeneizado, seguido de vortexação dos tubos para homogeneização juntamente com o anticorpo diluído em PBS *wash* 1x, seguida de incubação por 30 minutos ao abrigo da luz. Após a incubação dos anticorpos monoclonais foi adicionado três ml de solução de lise (FACS LISYNG SOLUTION[®] – Becton Dickinson[®]), com os tubos já sob vortexação seguida de incubação por 8 minutos em temperatura ambiente. Após este período os tubos foram centrifugados a 1300 rotações por minutos (rpm), durante 7 minutos a

temperatura de 20°C. Depois da centrifugação foi realizado o descarte do sobrenadante em movimento pendular seguido pela adição de três ml de PBS *wash* 1x. Todos os tubos após a vortexação foram centrifugados a 1300 rpm durante 7 minutos a temperatura de 20°C. Ao término desta segunda centrifugação foi feito o descarte do sobrenadante foi realizado inversão dos tubos em movimento pendular e adicionado 200 µL de solução fixadora para citometria MaxFacsFix (MFF) (10,0g/l de paraformaldeído, 10,2g/l de cacodilato de sódio e 6,65g/l de cloreto de sódio, pH 7,2). Após este processo, os tubos foram mantidos em geladeira a temperatura de 5°C até o momento da leitura. A leitura foi realizada após 24 horas em citômetro de fluxo do tipo FACS CALIBUR® (Becton Dickinson®), sendo adquiridas 20000 células por tubo.

4.4.1 Análise da imunofenotipagem dos leucócitos periféricos

A análise das células foi realizada utilizando o software Flow Jo® (versão10.0). O primeiro passo constituiu-se na identificação e seleção da população celular em gráficos que apresentam tamanho *versus* granulosidade (FSC x SSC), por meio do posicionamento da *gate* onde a população celular de interesse é majoritária (figura 06 A). Após a seleção da população celular, através da *gate* foi gerado o gráfico dividido em quadrantes. Na figura 6B podemos observar as populações celulares marcadas com anticorpo monoclonal anti CD14⁺ (3,91%), formado a partir das células marcadas presentes na *gate* do gráfico da figura 6 A.

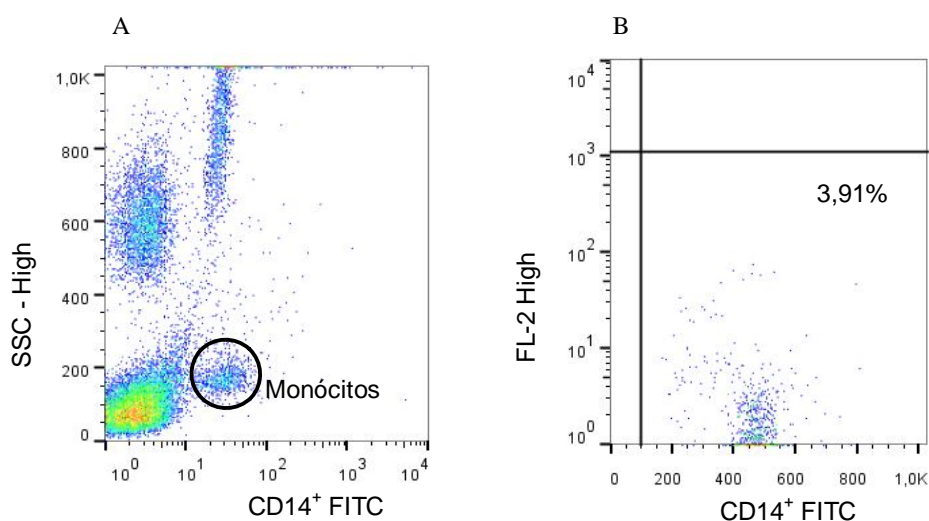


Figura 6 – Representação da população de monócitos em gráfico do tipo *dot plot* (FSC vs SSC) mostrando a população de monócitos isolada (A) e macrófagos marcados com anticorpo monoclonal anti CD14⁺ (B) apresentando as percentagens em cada quadrante.

Da mesma forma, procedeu-se a análise dos linfócitos (figura 7). Inicialmente selecionou-se a população celular de interesse em gráficos que apresentam tamanho *versus* granulosidade (FSC x SSC), por meio do posicionamento da *gate* onde a população celular de interesse é majoritária (figura 7A), onde a seleção da população de linfócitos no gráfico 7A, gera os gráficos 7B, 7C, 7D, 7E e 7F, para CD4⁺ (20,05%), CD8⁺ (11,23%), CD21⁺ (41,72%) x CD335⁺(2,20%), CD25⁺(2,56%) e $\gamma\delta^+$ (WC1) (3,39%) respectivamente. A partir do gráfico da figura 7F foi realizado o isolamento da população de $\gamma\delta^+$ (WC1) *high* (2,16%) e o percentual de células $\gamma\delta^+$ (WC1) *low* (1,23%) foi obtido subtraindo o percentual de células $\gamma\delta^+$ (WC1) (3,39%) do percentual de células $\gamma\delta^+$ (WC1) *high* (2,16%).

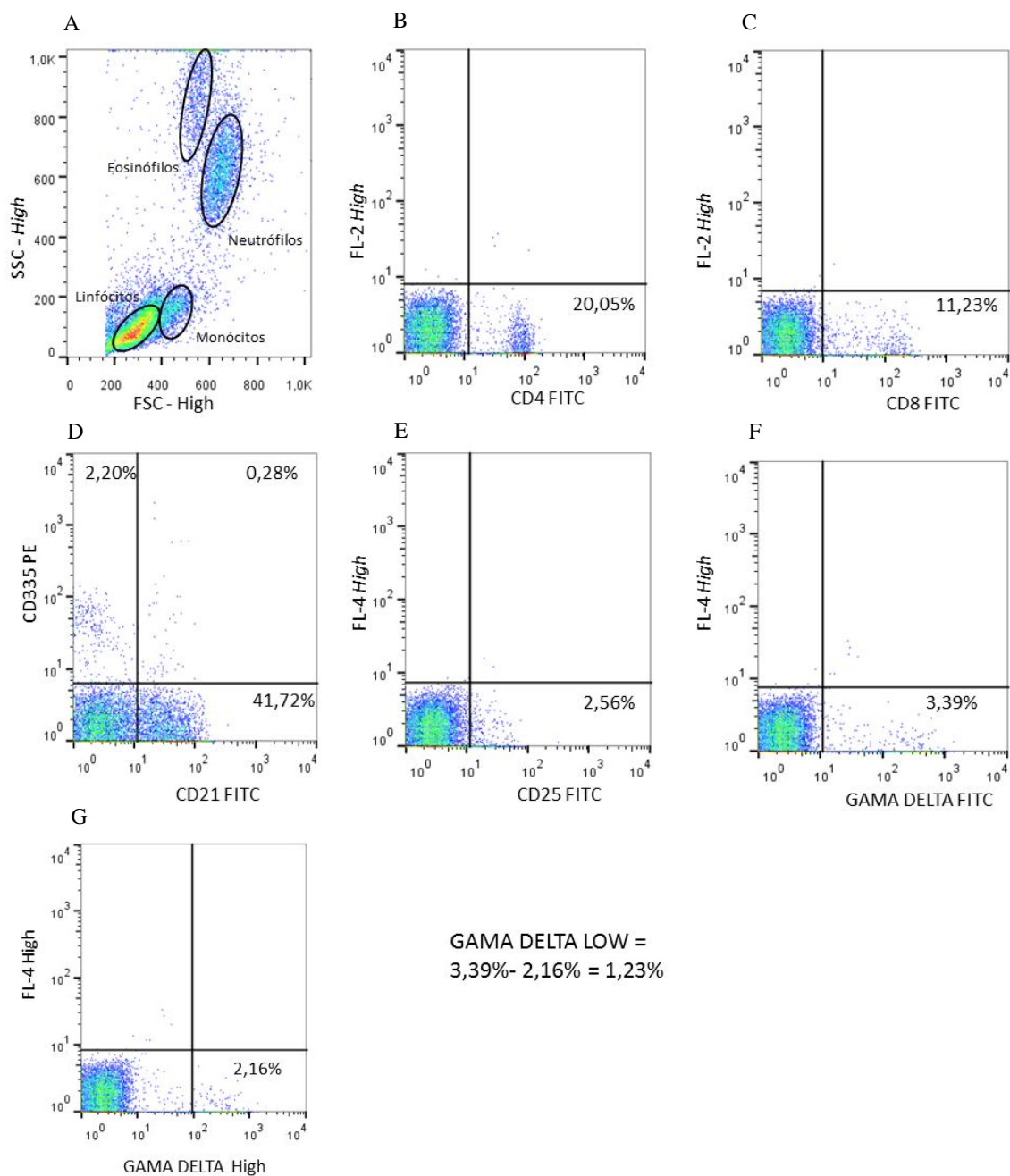


Figura 7 – Representação da população celular separada em gráfico do tipo *dot plot* (FSC vs SSC) (A), bem como da população de linfócitos bovinos marcados com anticorpo monoclonal anti CD4⁺ (B), anti CD8⁺ (C), anti CD21⁺ (D), células NK marcadas com anticorpo monoclonal anti CD335⁺ (D), ativação celular por meio do anticorpo monoclonal anti CD25⁺ (E), $\gamma\delta^+$ (WC1) (F), isolamento da população de células $\gamma\delta^+$ (WC1) *high* (G), apresentando as percentagens em cada quadrante.

4.5 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi feita utilizando o programa PRISMA[®] (versão 4.0). Para as variáveis contínuas que apresentaram distribuição normal, a comparação das médias dos três grupos (Gir, Sindi e Guzerá) foi realizada análise de variância (One Way - ANOVA), com nível de significância de 5%, com correção de *Bonferroni*. Quando a análise de homogeneidade não apresentou distribuição normal, em pelo menos um dos grupos estudados, foi realizado teste de *Kruskal-Wallis*, com significância de 5% em conjunto com o teste de comparação múltipla de *Dunn's*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação dos parâmetros hematológicos dos zebuínos das raças Guzerá, Gir e Sindi

Os valores apresentados na tabela 1 referem-se ao menor e maior valor encontrado entre os animais experimentais para cada parâmetro por raça analisada, seguido pela média \pm desvio padrão. No eritrograma observa-se que o número de hemácias, a concentração de hemoglobina, o hematócrito, a hemoglobina corpuscular média (HCM) e CHCM se encontram dentro do intervalo de referência (FELDMAN, 2000; MEYER, 1995; SMITH, 1994) para cada raça analisada.

Tabela 1 – Valores mínimos e máximos por animal por raça, seguido de média \pm desv. padrão ($X \pm SD$) obtidos por meio do exame de hemograma de 30 vacas híbridas das raças Gir, Sindi e Guzerá. Uberaba, MG, 2013.

RAÇAS				
HEMOGRAMA	Gir	Sindi	Guzerá	Intervalo de referência*
ERITROGRAMA	Mín - Máx	Mín - Máx	Mín - Máx	Mín - Máx
Nº Hemácias ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	6,1 – 8,78 7,89 \pm 0,75a	7,33 – 9,15 8,05 \pm 0,67a	5,65 – 9,04 8,03 \pm 1,02a	5 – 10,0
Hemoglobina (g/dl)	8,7 – 11,4 10,25 \pm 0,84a	9,6 – 11,4 10,43 \pm 0,65a	9 – 12,7 10,64 \pm 1,21a	8 – 15,0
Hematócrito (%)	27,2 – 36,8 32,75 \pm 2,97a	30,0 – 35,7 33,22 \pm 2,03a	28,3 – 40,8 33,15 \pm 4,10a	24 – 46
Proteína Plasmática (g/dl)	8,2 – 9 8,68 \pm 0,27a	8,0 – 10 8,68 \pm 0,56a	8 – 9,2 8,5 \pm 0,38a	7 – 8,5
VCM (fl)	38,70 – 45,76 41,60 \pm 2,29a	34,47 – 44,45 41,43 \pm 3,30a	35,61 – 49,20 41,61 \pm 4,74a	40 – 60
HCM (pg)	12,16 – 14,34 13,03 \pm 0,76a	11,18 – 15,12 13,00 \pm 0,98a	11,39 – 14,85 13,36 \pm 1,46a	11 – 17
CHCM (%)	30,15 – 31,98 31,33 \pm 0,83a	30,34 – 31,97 31,41 \pm 0,81a	31,12 – 32,86 32,13 \pm 0,51a	30 – 36
LEUCOGRAMA	Mín - Máx	Mín - Máx	Mín - Máx	Mín - Máx
Leucócitos totais ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	10100 – 20200 12960 \pm 3568,75ab	9300 – 51400 21150 \pm 14208,70a	7500 – 14400 10800 \pm 2147,87b	4000 – 12000
Neutrófilo Segmentado ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	17 – 58 33,8 \pm 13,63a	7 – 38 31,4 \pm 12,04a	28 – 43 21,8 \pm 12,66a	600 – 4000
Linfócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	32 – 73 55,1 \pm 13,96a	42 – 88 45,1 \pm 18,51a	32 – 63 57,8 \pm 25,54a	2500 – 7500
Monócitos (mm^3)	3 – 10 7,1 \pm 2,18a	1 – 11 9,3 \pm 7,35a	4 – 24 5,0 \pm 4,11a	25 – 840
Eosinófilos (mm^3)	3 – 10 5,4 \pm 3,17a	1 – 20 4,6 \pm 4,27a	1 – 12 6,70 \pm 7,63a	0 – 2400
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	163000 – 841000 532600 \pm 216874,87a	451000 – 783000 548500 \pm 133133,39a	483000 – 752000 595400 \pm 164979,59a	100000 – 800000

Os valores paramétricos foram apresentados como média \pm desv. padrão (*One Way* - ANOVA) com correção de Bonferroni ($p < 0,05$) para todos os animais por raça analisada. Valores seguidos de letras diferentes, na linha, são significativamente diferentes

* **Intervalo de referência:**

FELDMAN, Bernard F; ZINKL, Joseph G; JAIN, Nemi C. *Schalm's veterinary*. 5ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2000.

MEYER, Coles; RICH. *Medicina de laboratório veterinário. Interpretação e diagnóstico*. São Paulo: Roca, 1995.

SMITH, Bradford P. *Tratado de medicina interna de grandes animais: moléstias de equinos, bovinos, ovinos e caprinos*. São Paulo (SP): Manole, 1994.

O volume corpuscular médio (VCM) revela que os valores mínimos apresentados em todas as raças (38,70 para a Guzerá, 34,47 para a Gir e 35,61 para a raça Sindi) se encontram mais baixos que os apresentados no intervalo de referência (40 – 60). Baixos valores de VCM indicam hemácias de tamanho pequeno, característico de raças zebuínas, tal característica é compensada pelo maior carregamento de hemoglobina e conseqüentemente de oxigênio, em comparação a hemácias de tamanho normal, revelando assim uma elevada capacidade dos zebuínos em carrear quantitativamente hemoglobina com oxigênio para as células (FELDMAN, 2000; MEYER, 1995; SMITH, 1994). Tal capacidade de maior carregamento de oxigênio confere às raças zebuínas elevada capacidade de adaptação a elevadas temperaturas, por meio do aumento da frequência respiratória, oxigenando melhor os tecidos e eliminando calor pela expiração, como observado por Souza et al., (2007) em que animais da raça Sindi foram altamente resistentes a elevada temperatura no semi-árido nordestino.

Para o parâmetro proteína plasmática observa-se que os valores mínimos apresentados para cada raça, na tabela 1, se encontram dentro do intervalo de referência. Para os valores máximos observa-se que ocorre um leve aumento da concentração proteína plasmática. Na literatura é relatado que a concentração de proteína plasmática pode ser afetada pelo balanço de líquidos do organismo, ou devido à desidratação. No presente trabalho os animais se encontravam em período de lactação o que poderia justificar uma baixa na concentração de proteína plasmática como relatado por Feldman, 2000; Meyer, 1995; Smith, 1994. Todavia não foi observada no presente estudo, uma queda da concentração proteica. Possivelmente, este aumento possa ser justificado pela suplementação proteica oferecida para os animais durante o período de estudo do presente trabalho.

Foi observado para as raças Gir, Sindi e Guzerá (em valores médios) que a concentração de hemoglobina (g/dl) (10,25 vs 10,43 vs 10,64), hematócrito (%) (32,75 vs 33,22 vs 33,15), VCM (fl) (41,60 vs 41,43 vs 41,61) e CHCM (%) (31,33 vs 34,41 vs 32,13), se encontram dentro do intervalo de referência respectivamente para hemoglobina (8 - 15), hematócrito (24 – 46), VCM (40 – 60) e CHCM (30 - 36), se apresentando próximos aos apresentados por Souza et al., (2007), que avaliaram a resistência de animais da raça Sindi a elevadas temperaturas, o que sugere que todos os animais do presente trabalho apresentam boa capacidade de carregamento de oxigênio (função da hemoglobina) e quantidade suficiente de hemácias para carregamento da hemoglobina com oxigênio, com condições suficientes de levar oxigênio às células frente a um aumento da frequência respiratória quando submetidos a elevadas temperaturas.

Foi observado que os valores médios para leucócitos totais ($12960 \times 10^3/\mu\text{l}$), eosinófilos ($609,6/\mu\text{l}$) e linfócitos ($7167,6 \times 10^3/\mu\text{l}$) da raça Gir se encontram em concordância com os valores apresentados por Abud et al., (2008) que observaram maiores valores de leucócitos totais ($12680 \times 10^3/\mu\text{l}$), eosinófilos (616,31), linfócitos (7938,38) em 58 novilhas *Bos indicus* púberes e pré-púberes da raça Nelore com média de 17 meses de idade, criadas na Embrapa Cerrados em Planaltina – Distrito Federal, sendo relatado pelo autor que este perfil pode ser utilizado como indicador auxiliar de determinação da puberdade em novilhas pré-púberes no bioma cerrado.

O valor médio de leucócitos totais ($12960 \times 10^3/\mu\text{l}$) da raça Gir e de linfócitos ($15021,1/\mu\text{l}$) da raça Sindi apresentados no presente estudo (tabela 3) estão de acordo com o número de leucócitos totais ($13962/\text{mm}^3$) e de linfócitos ($10507/\text{mm}^3$) apresentados por Birgel Júnior et al (2001) para fêmeas da raça Jersey entre 3 e 24 meses criadas em regime extensivo no Estado de São Paulo. O autor demonstrou que o fator etário influencia o leucograma dos bovinos, atribuída principalmente ao comportamento do número absoluto de linfócitos. Apesar do presente estudo não ter como objetivo avaliar a influência do fator etário sobre o quadro leucocitário dos animais experimentais, a raça Sindi apresentava idade entre 3 e 6 anos e os da raça Gir entre 4 e 10 anos, o que explica o predomínio de leucócitos totais e de linfócitos observado para animais da raça Sindi do presente estudo em comparação as raças Gir e Guzerá.

5.2 Avaliação dos parâmetros imunofenotípicos dos zebuínos das raças Gir, Sindi e Guzerá

Os percentuais mínimos e máximos dos animais das raças Gir, Sindi e Guzerá, para os parâmetros: células T (CD4^+ , CD8^+ e $\gamma\delta^+$), B (CD21^+), monócitos (CD14^+), células que apresentam CD25^+ e células NK (CD335^+), encontram-se apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Valores mínimos e máximos e média±desv. padrão (X±SD) obtidos por meio da imunofenotipagem de 30 vacas híbridas das raças Gir, Sindi e Guzerá. Uberaba, MG, 2013.

PARÂMETROS (%)	RAÇAS		
	Gir	Sindi	Guzerá
CD4 ⁺	14,18 – 42,61	0,37 – 41,14	20,44 – 43,75
	26,64 ^a ±8,47	15,90 ^b ±14,74	30,69 ^a ±6,67
CD8 ⁺	0,05 – 21,82	1,51 – 24,05	13,09 – 33,04
	12,96 ^a ±7,17	9,83 ^b ±7,32	20,21 ^a ±5,97
Razão CD4 ⁺ / CD8 ⁺	1,42 – 2,88	0,15 – 4,04	0,84 – 2,38
	43,45 ^a ±130,90	1,69 ^b ±1,47	17,99 ^a ±45,62
CD21 ⁺ total	10,5 – 41,72	17,53 – 64,58	8,17 – 35,7
	26,06 ^b ±10,44	35,46 ^a ±15,90	61,52 ^b ±20,85
CD14 ⁺	0,64 – 6,26	0,53 – 4,06	3,55 – 7,88
	3,65 ^a ±1,83	1,91 ^b ±1,46	5,00 ^a ±1,39
CD25 ⁺	2,56 – 5,79	0,46 – 8,5	3,19 – 9,12
	4,32 ^a ±1,10	3,92 ^a ±2,57	5,57 ^a ±2,05
γδ ⁺	3,39 – 8,41	0,73 – 11,88	2,84 – 8,93
	6,63 ^a ±1,63	4,89 ^a ±3,42	6,07 ^a ±1,78
γδ ⁺ high	2,16 – 6,66	0,39 – 8,24	1,06 – 6,26
	4,79 ^a ±1,37	3,29 ^a ±2,58	3,41 ^a ±1,61
γδ ⁺ low	1,23 – 2,63	0,34 – 3,64	1,59 – 4,18
	1,84 ^a ±0,45	1,59 ^b ±1,07	2,66 ^a ±0,93
CD335 ⁺	1,28 – 7,16	0,56 – 2,73	1,55 – 9,96
	3,58 ^a ±1,92	2,04 ^a ±1,91	3,96 ^a ±2,79

Os valores paramétricos foram apresentados como média ± desv. padrão (*One Way* - ANOVA) com correção de Bonferroni ($p < 0,05$) para todos os animais por raça analisada. Valores seguidos de letras diferentes, na linha, são significativamente diferentes ($p < 0,05$) e os seguidos de letras iguais, na linha, não são significativamente diferentes entre si ($p > 0,05$).

Os valores percentuais foram analisados, estatisticamente e foi observada diferença entre as raças Sindi e Guzerá para os seguintes parâmetros CD4⁺ (15,90% vs 30,69%, $p < 0,05$), CD8⁺ (9,83% vs 20,21%, $p < 0,001$), CD4⁺ + CD8⁺ (25,73% vs 50,90% $p < 0,01$), CD21⁺ total (35,46% vs 19,16% $p < 0,01$), razão T/B (1,08% vs 3,46%, $p < 0,05$), CD14⁺ (1,91% vs 5,00%, $p < 0,001$) e γδ⁺ low (1,59% vs 2,66%, $p < 0,05$). Entre as raças Gir e Guzerá foi observada também diferença para células marcadas com anticorpo anti-CD21⁺ total (26,06% vs 19,16%, $p < 0,001$), conforme mostrado na figura 8.

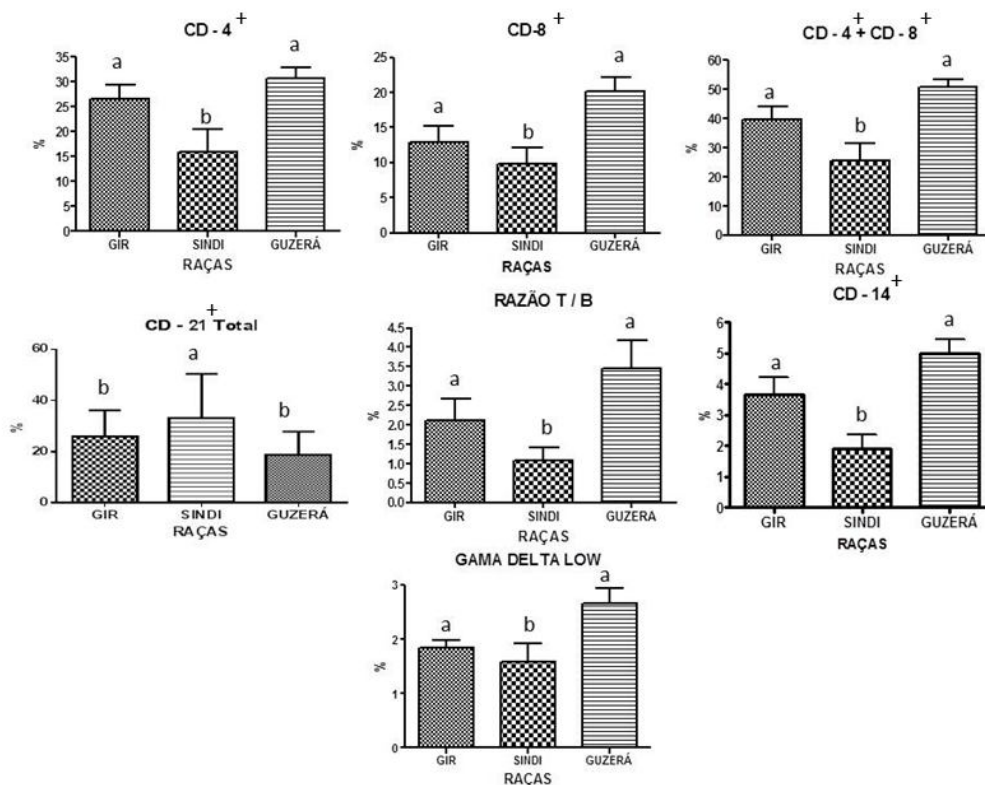


Figura 8: Percentual de células marcadas com anticorpos anti CD4⁺, anti CD8⁺, gama-delta ($\gamma\delta$), anti CD14⁺ e os parâmetros CD-4⁺ + CD-8⁺ e razão T/B.

Os valores paramétricos são apresentados como média \pm desv. padrão (*One Way - ANOVA*), com correção de *Bonferroni*.

* Letras diferentes, entre as colunas, indicam diferenças significativas entre as raças para os parâmetros analisados.

Para os parâmetros supracitados observa-se que animais da raça Guzerá apresentaram um predomínio de células T CD4⁺, CD8⁺, $\gamma\delta$ ⁺ e monócitos (CD14⁺). Partindo do princípio que macrófagos (CD14⁺) são células importantes para a imunidade inata, com atuação marcante na fagocitose de microrganismos com permanência mais prolongada no local da inflamação, os resultados sugerem que os animais da raça Guzerá apresentam melhor capacidade de resistência a doenças. Carneiro et al., (2009) descrevem que os leucócitos, principalmente os polimorfonucleados são importantes agentes de eliminação de bactérias causadoras de mastite, resultados estes observados na análise comparativa entre as três raças de estudo, esclarecendo que a ordem de resistência a mastite segue com Gir, Sindi e Guzerá.

Uma vez que os macrófagos presentes na glândula mamária são responsáveis por secretar componentes derivados do ácido aracônico, pode conferir grande capacidade de

defesa da glândula mamária (RAINARD e RIOLLET, 2003). Isto é reforçado conforme relatado por Abbas, (2008) que macrófagos são células com papéis centrais na imunidade inata e adquirida, onde a especificidade da resposta é de células T. Todavia a função efetora da eliminação de microrganismos ocorre através da fagocitose, realizada pelos macrófagos.

Souza (2010) estudando a prevalência de mastite em animais das raças Sindi e Guzerá que não recebiam cuidado sanitário para prevenção de mastite, observou índice maior no período seco, quando comparado ao período chuvoso (9,4 vs 6,9%), respectivamente. Índice bem menor que o encontrado por Cunha et al., (2008) que foi de 38,7% no ano de 2003 para animais da raça Holandesa. Souza (2010) demonstrou maior resistência de zebuínos das raças Sindi e Guzerá a mastite quando comparados a taurinos da raça Holandesa. Estes baixos índices podem ser justificados conforme Fonseca et al., (2008) que estudaram o perfil da expressão de genes relacionados à resistência a mastite em bovinos leiteiros das raças Holandesa preto e branco e Gir leiteiro. Foi encontrada expressão gênica 7,35 vezes menor para interleucina 10 (IL-10) (responsável por inibir a atividade de células NK) em animais da raça Gir, quando comparadas às vacas da raça Holandesa preto e branco. Este relato vai de encontro ao observado no presente trabalho, quando analisado os valores de células NK, uma vez que animais da raça Sindi apresentam 2,64 vezes menos células NK que os animais da raça Gir e 3,64 vezes menos que os animais da raça Guzerá, sugerindo uma possibilidade que os animais da raça Guzerá são mais resistentes à mastite.

Este resultado pode ser confrontado quando analisado o parâmetro de CD21⁺, visto que animais da raça Sindi apresentaram valores maiores quando comparados às demais raças. Tendo em vista que células B (CD21⁺) são responsáveis pela produção de anticorpos conforme descrito em Abbas, (2008). Estes parâmetros propiciam uma importante fonte de resistência imunológica para os bezerros, deixando-os em condições de suportar melhor outras fases de criação, além de preservar a saúde mamaria (MACHADO NETO et al., 1997).

Bittar e colaboradores no ano de 2004, com o objetivo de avaliar o perfil fenotípico de linfócitos periféricos (CD4⁺, CD8⁺ e CD21⁺) de bovinos taurinos das raças Holandesa, Hereford e Pardo–Suíça, observaram menor percentual de linfócitos T totais (CD4⁺ e CD8⁺) e maior de linfócitos B (CD21⁺), com menor relação T/B da raça Holandesa em comparação a raça Hereford. Foi sugerido pelos autores que o menor percentual de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) em animais da raça Holandesa pode estar relacionado com a maior susceptibilidade da raça a infecções por *Babesia* e a maior razão T/B da raça Hereford sobre a raça Holandesa pode estar associada a maior resistência apresentada pela raça Hereford a infecções por *Babesia*. No presente estudo foi observado que os animais da raça Guzerá descrevem um

padrão de resposta imunológica semelhante ao apresentado pela raça Hereford quando avaliada razão T/B. Reforçando a este padrão o predomínio de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺, CD335⁺ sugerindo maior resistência dos animais da raça Guzerá a doenças infectoparasitárias.

Para o parâmetro CD21⁺ os maiores valores encontrados para a raça Holandesa também corroboram com os resultados apresentados para a raça Sindi, sugerindo uma resposta humoral mais efetiva.

Para os demais parâmetros analisados entre as raças Gir, Sindi e Guzerá, não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) para: $\gamma\delta^+$ (WC1), $\gamma\delta^+$ (WC1) *high*, CD25⁺ e CD335⁺, conforme apresentado na tabela 2.

Para a espécie bovina em comparação as demais espécies de mamíferos domésticos apresenta maiores valores de $\gamma\delta^+$ (WC1) e $\gamma\delta^+$ (WC1) *high* (TIZARD 2002), sem justificar uma relação imunológica direta, este pensamento é pautado pelo presente trabalho uma vez que os valores encontrados nas três raças estudadas não apresentaram diferença estatística.

6 CONCLUSÕES

Ocorreu diferença no perfil imunológico entre animais da raça Sindi (células B CD21⁺) e animais da raça Guzerá (células T CD4⁺, CD8⁺ e CD335⁺);

Considerando os parâmetros hematológicos abordados no projeto, sugere-se que:

As raças zebuínas do presente trabalho tem maior possibilidade de resistência às condições de produção tropical;

A raça Guzerá tem maior possibilidade de ser mais resistente a doenças infectoparasitárias, devido ao predomínio de CD4⁺, CD8⁺ e CD335⁺.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, Abul. K; LICHTMAN, Andrew. H.; PILLAI, Shiv. **Imunologia Celular e Molecular**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- ABUD, L. J.; GUIMARAES, C. O.; PAULINI, F.; COSTA, G. L.; LOBO, J. R.; SILVA, M. C.; FIORAVANTI, M. C. S.; SERENO, J. R. B. Perfil Metabólico e Hematológico de Novilhas Nelore criadas no bioma cerrado no período peri-puberal. **In: SIMPÓSIO NACIONAL CERRADO**, 2008, Brasília - DF. Parla Mundi, p.1-6, 2008.
- ALVAREZ, D. F.; HELM, K.; DEGREGORI, J.; ROEDERER, M.; MAJKA, S.; Publishing flow cytometry data. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**. Rockville Pike. 13 nov. 2009.
- BACAL, Nydia Strachman; FAULHABER, Marcelo H. Wood. **Aplicação prática em citometria de fluxo**. São Paulo: Atheneu, 2003.
- BIRGEL JUNIOR, E. H.; D'ANGELINO, J. L.; BENESI, F. J. Valores de referência do leucograma de bovinos da raça Jersey criados no Estado de São Paulo. **Brazilian Journal Research Veterinary Animal Science**, São Paulo, v. 38, n. 3, p.136-141, 2001.
- BITTAR, J. F. F.; RIBEIRO, M. F. B.; MARCIANO, A. P. V.; SALCEDO, J. H. P.; MARTINS-FILHO, O.A. Perfil fenotípico de linfócitos periféricos de bovinos de raças européias. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.56, n.1, pp. 107-110, 2004.
- BROWN, M.; WITTEWER, C. Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. **Clinical Chemistry**. v. 46, n. 8 Pt 2, p. 1221-1229, 2000.
- CAMPOS, R.; LACERDA, L. A.; TERRA, S. R.; GONZALEZ, F. H. D. Parâmetros hematológicos e níveis de cortisol plasmático em vacas leiteiras de alta produção no Sul do Brasil. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 45, n. 5, p.354-361, 2008.
- CARNEIRO, Deolinda Maria Vieira Filha; DOMINGUES, Paulo Francisco; VAZ, Adil Knackfuss. Imunidade inata da glândula mamária bovina: resposta à infecção. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.6, p.1934-1943, set, 2009.
- COSTA, J. N.; BENESI, F. J.; BIRGEL, E. H.; ANGELINO, J. L.; AYRES, M. C. C.; FILHO, I. R. B. Fatores etários no leucograma de fêmeas zebuínas sadias da raça Nelore (*Bos indicus*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 3, p.399-403, 2000.
- CRUZ, G. R. B; RIBEIRO, M.; PIMENTA FILHO, E. Estimativas de Parâmetros de Curvas de Lactação. **Archive zootechnics**, Paraíba, v. 58, n. 224, p.695-704, 2009.
- CUNHA, R. P. L; MOLINA, L. R; CARVALHO, A. U; FACURY FILHO, E. J; FERREIRA, P. M; GENTILINI, M.B. Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com número de lactações, produção e composição química do leite em vacas da raça Holandesa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.60, n.1, p.19-24, 2008.

DOMINGUES, Octávio. **O Zebu, sua reprodução e multiplicação dirigida**. 3ed. São Paulo: Nobel, 1974.

ELHMOUZI-YOUNES, J.; STORSET, A. K.; BOYSEN, P.; LAURENT, F.; DROUET, F. **Bovine neonate natural killer cells are fully functional and highly responsive to interleucine-15 and to NKp46 receptor stimulation**. 2009. Disponível em: <www.vetres.org>. Acesso em: 10 out. 2012.

FARIA, Fabio José Carvalho; FILHO, Anibal Eugênio Vercesi; MADALENA, Fernando Enrique; JOSAHKIAN, Luiz Antônio. Parâmetros Populacionais do Rebanho Sindi Registrado no Brasil. **Revista Brasileira Zootecnia**, Belo Horizonte, n. 30, p.1989-1994, 2001.

FACÓ, Olivardo; LÔBO, Raimundo Nonato Braga; FILHO, Raimundo Martins; MOURA, Arlindo de Alencar Araripe. Análise do Desempenho Produtivo de Diversos Grupos Genéticos Holandês x Gir no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Fortaleza, v.31, n.5, p.1944-1952, 2002.

FELDMAN, Bernard F; ZINKL, Joseph G; JAIN, Nemi C. **Schalm's veterinary**. 5ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2000.

FONSECA, Isabela. **Perfil da expressão de genes relacionados à resistência à mastite em bovinos leiteiros**. 2008. 45f. Dissertação (Pós-Graduação em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

FURTADO, Demerval A.; PEIXOTO, Adriana P.; REGIS, Jonh. E. F.; NASCIMENTO, J. W. B.; ARAÚJO, Tiago G. P.; LISBOA, Ana C. C. Termorregulação e desempenho de tourinhos Sindi. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 16, n. 9, p.1022-1028, 2012.

GARCIA-NAVARRO, Carlos Eugênio Kantek. **Manual de hematologia veterinária**. São Paulo: Varela, 1998.

IFTM. Depósito Legal. In: INSTITUTO FEDERAL DO TRIANGULO MINEIRO. Uberaba, 2013. Disponível em: <http://www.iftm.edu.br/uberaba/met/consulta.php>. Acesso em: 11 abril 2013.

LEDIC, Ivan Luz. **Manual de bovinotecnia leiteira. Alimentos: produção e fornecimento**. São Paulo (SP): Varela, 2002.

MACHADO NETO, R.; PACKER, I. U.; BONILHA, L. M.; FIGUEIREDO, L. A.; RAZZOK, A. G.; CANDIDO, J. G. Concentração de IgG sérica em bezerros das raças Nelore, Guzerá, Gir e Caracu: efeitos sobre crescimento e mortalidade até a desmama. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 26, n. 5, p. 920-923, 1997.

MARCIANO, Ana Paula Vieira. **Avaliação de aspectos da imunidade Celular de Bovinos taurinos (*Bos taurus*) e zebuínos (*Bos indicus*)**. 2004. 54 f. Monografia (Bacharelado em Imunologia e Bioquímica) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.

MAPA. Depósito Legal. In: MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Brasília, 2013. Disponível em:

<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>. Acesso em: 10 abril 2013.

MEYER, Coles; RICH. **Medicina de laboratório veterinário. Interpretação e diagnóstico**. São Paulo: Roca, 1995.

MORAES, Júlia Miranda. **Imunofenotipagem e avaliação quantitativa de Linfócitos Circulantes de Bovinos de raça Curraleiro**. 2008. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.

MUCARI, T. B.; OLIVEIRA, J. A. Análise Genético-Quantitativa de Pesos aos 8, 12, 18 e 24 Meses de Idade em um Rebanho da Raça Guzerá. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.6, p.1604-1613, 2003.

MURPHY, Kenneth; TRAVERS, Paul; WALPORT, Mark. **Imunobiologia de Janeway**. 7ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

PELICIONI, L. C.; QUEIROZ, S. A.; ALBUQUERQUE, L. G. Estimativas de Parâmetros Genéticos para Pesos ao Nascer e Mensais até 450 dias em Bovinos Guzerá. **Arch. Latinoam. Prod. Anim.** 2003.

RAINARD, Pascal; RIOLLET, Céline. Mobilization of neutrophils and defense of the bovine mammary gland. v. 43, n. 5, 2003. Disponível em:<http://rnd.edpsciences.org/index.php?option=com_article&access=standard&Itemid=129&url=/articles/rnd/ref/2003/05/RND5-2003_6/RND5-2003_6.html. Acesso em: 12 abril. 2013.

RIBEIRO, Adélílian Baracho; TINOCO, André Fernandes da Fonseca; LIMA, Guilherme Ferreira da Costa; GUILHERMINO, Magda Maria; RANGEL, Adriano Henrique do Nascimento. PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE DE VACAS GIR E GUZERÁ NAS DIFERENTES ORDENS DE PARTO. **Revista Caatinga**. Natal, v.22, n3, p 46-51, julho/setembro, 2009.

RIESEBERG, M.; KASPER, C.; REARDON, K. F.; SCHEPER, T. Flow cytometry in biotechnology. **Applied Microbiology Biotechnology**, Hannover Germany, p. 350-360. 23 jun. 2001.

SANTOS, Rinaldo dos. **Gir: a raça mais utilizada no Brasil**. Uberaba: Agropecuária Tropical, 1994.

SANTOS, Rinaldo dos. **Guzerá, o gado do Brasil**. 1ª ed. Uberaba: Agropecuária Tropical, 2005.

SANTIAGO, Alberto Alves. **O Nelore**. São Paulo: Ed. Dos Criadores, 1983.

SMITH, Bradford P. **Tratado de medicina interna de grandes animais: moléstias de equinos, bovinos, ovinos e caprinos**. São Paulo (SP): Manole, 1994.

SILVA, Ana Mary da. **Estudo da infestação de fêmeas bovinas de corte pelo *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Haematobia irritans* e *Dermatobia irritans***. São

Carlos: UFSCar, 2006. 144f. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

SILVA, D. G.; SILVA, P. R. L.; FAGLIARI, J.J. Hemograma e perfil sérico, inclusive hemogasométrico, de bezerros infectados experimentalmente com *Salmonella* Dublin. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 62, n. 2, p.251-257, 2010.

SILVA, Teresa Lopes da; REIS Alberto; HEWITT, Christopher; ROSEIRO, José Carlos. Citometria de fluxo - Funcionalidade celular on-line em bioprocessos. **Métodos em Biotecnologia - Citometria de Fluxo II**. Boletim de Biotecnologia, 2004. Disponível em: <http://repositorio.ineg.pt/bitstream/10400.9/1316/1/CITOMETRIA%20DE%20FLUXO.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2013.

SIVORI, S.; VITALE, M.; MORELLI, L.; SANSEVERINO, L.; AUGUGLIARO, R.; MORETTA, L.; MORETTA, A. p46, a novel natural killer cell - specific surface molecule that mediates cell activation. **Journal of Experimental Medicine**, Itália, v. 186, n.7, p.1129-1136, 06 out. 1997.

SOUZA, B. B.; SILVA, R. M. N.; MARINHO, M. L.; SILVA, G. A.; SILVA, E. M. N.; SOUZA, A. P. Parâmetros fisiológicos e índice de tolerância ao calor de bovinos da raça Sindi no semi-árido paraibano. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 31, n. 3, p.883-888, 2007.

SOUZA, Dalana Régia Melo de. **Qualidade do leite de vacas das raças Guzerá e Sindi criadas no Cariri Ocidental paraibano – Brasil**. 2010. 79f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2010.

TIZARD, Ian R. **Imunologia Veterinária: uma introdução**. 6ª ed. São Paulo: Roca, 2002.

TURCO, S. H. N.; ARAÚJO, G. G. L.; TEIXEIRA, A. H. C.; FILHO, C. G.; MESQUITA, E.; ALENCAR, S. C. **Avaliação de alguns fatores do clima que influenciam a adaptação, o comportamento fisiológico e o desempenho de bovinos da raça Sindi, no Semi-árido brasileiro**. Petrolina Pe: Embrapa, 2004.

VERÍSSIMO, C.J et al. Características do pelame e infecção por carrapatos em bovinos Gir e mestiços (Holandês x Gir). In: REUNIÃO ANUAL: SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35, 1998. **Anais** [s.n],1998.

VIANA, R. B.; BIRGEL JUNIOR, E. H.; AYRES, M. C. C.; BIOJONI, F. S. M.; SOUZA, M. C. C.; BIRGEL, E. H. Influência da gestação e do puerpério sobre o leucograma de caprinos da raça Saanen, criados no Estado de São Paulo. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 39, n. 4, p.196-201, 2002.

WARREN, Hilary S. The Eighth Human Leucocyte Differentiation Antigen (HLDA8) Workshop: Natural killer cell section report. **Cellular Immunology. Elsevier**. v. 236, n. 1–2, p. 17-20, jul–ago. 2005.

WENCESLAU, A. A. LOPEZ, P. S.; TEODORO, R. L.; VERNEQUE, R. S.; EUCLYDES, R. F.; FERREIRA, W. J.; SILVA, M. A. Estimação de parâmetros genéticos de medidas de

conformação, produção de leite e idade ao primeiro parto em vacas da raça Gir leiteiro.
Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa, v. 29, n. 1, p.153-158, 2000.