

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

PARÂMETROS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DA RESPOSTA IMUNE EM
EQUINOS SUBMETIDOS À AUTO-HEMOTERAPIA

PAULA RODRIGUES LOPES

Belo Horizonte – MG
Escola de Veterinária – UFMG
2018

Paula Rodrigues Lopes

PARÂMETROS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DA RESPOSTA IMUNE EM
EQUINOS SUBMETIDOS À AUTO-HEMOTERAPIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina e Cirurgia.

Orientador: Maristela Silveira Palhares.

Co-orientador: Márcio Sobreira Silva Araújo.

Belo Horizonte
Escola de Veterinária-UFMG
2018

L864p Lopes, Paula Rodrigues, 1988-
Parâmetros clínicos e laboratoriais da resposta imune em equinos submetidos à auto-hemoterapia / Paula Rodrigues Lopes. – 2018.
66 p. : il.

Orientadora: Maristela Silveira Palhares
Co-orientador: Márcio Sobreira Silva Araújo
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Equino – Teses. 2. Resposta imune – Teses. 3. Imunoterapia – Teses.
4. Auto-hemoterapia – Teses. I. Palhares, Maristela Silveira. II. Araújo, Márcio Sobreira
Silva. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

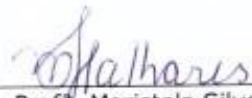
CDD – 636.108 96

FOLHA DE APROVAÇÃO

PAULA RODRIGUES LOPES

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração MEDICINA E CIRURGIA VETERINÁRIAS.

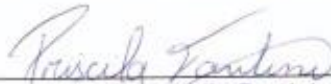
Aprovada em 27 de Fevereiro de 2018, pela banca constituída pelos membros:




Prof^a. Maristela Silveira Palhares
Presidente - Orientador



Prof^a. Fabíola de Oliveira Paes Leme
Escola de Veterinária - UFMG



Prof^a. Priscila Fantini
Centro Universitário UNA



Prof^a. Renata de Pino Albuquerque Maranhão
Escola de Veterinária - UFMG



Dr. Márcio Sobreira Silva Araújo
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Aos meus pais, Paulo e Marta, e ao meu irmão,
Eduardo, por estarem sempre ao meu lado,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Maristela Silveira Palhares pela confiança em mim depositada há anos. Pelo exemplo daquilo que é certo e correto. Pelos desafios a mim confiados sempre afirmando meu potencial. Por mais uma oportunidade para me tornar uma melhor pessoa e profissional.

Ao meu co-orientador Márcio Sobreira Araújo Silva pela oportunidade em me conhecer e me mostrar um novo mundo na pesquisa. Pela paciência em me ensinar tudo do início, pela calma soberana que me deram confiança e tranquilidade para enfrentar cada dia. Obrigada por cada palavra, cada orientação e cada encontro que não me deixaram perder o foco e nem encontrar as “tartarugas”.

Ao meu amigo e colega Carlos Eduardo Real Pereira por me mostrar as possibilidades da minha dissertação e me apresentar ao Márcio.

A minha mãe, Marta, pela presença onipresente, amor e apoio incondicionais. Ao meu pai, Paulo, pela tranquilidade, ajuda, conselhos e por me deixar partir. Ao meu irmão, Eduardo, pela parceria. As minhas companheiras, Céu e Zara.

A Jéssica Guerra de Oliveira, minha fiel ajudante, amiga e companheira de trabalho. Sempre disposta a me ajudar. A minha amiga Isabel Vinagre, pelo abraço sempre na hora certa.

Ao Galpão “C” de Equinos e meus amigos Jorge Tibúrcio, Sebastião Alves e a residente Tatiana Castro. A professora Renata Maranhão pela amizade e conselhos. Aos estagiários Amanda Henriques de Oliveira e Gabriel Nunes Guimarães pela ajuda com os animais durante o experimento.

A Priscila Fantini, minha amiga e exemplo profissional, obrigada pelos conselhos, amizade, orientações e risadas, sempre. A Ana Luisa Miranda, minha mais fina colega, pela amizade e carinho.

A professora Fabíola Paes Leme sempre disposta a me ajudar e pela disponibilidade do Laboratório de Patologia Clínica assim como suas soluções, esclarecimentos e ensinamentos. Obrigada a todos os residentes do Laboratório que me auxiliaram no experimento.

As minhas queridas e sempre presentes: Ana Luiza Dolabela, Ludimila Luza, Nathalia Galuppo e Raquel Rodrigues pelo apoio, risadas e amizade.

A todos os integrantes do GIPB FIOCRUZ pela paciência e ajudas e à FIOCRUZ/MINAS pela disponibilidade dos laboratórios e citômetro de fluxo. Ao Maurício Azevedo Batista por dividir comigo seus conhecimentos e se prestar a, em pleno feriado, me ajudar no experimento.

A professora Denise Giunchetti e Otoni Alves pela contribuição primordial.

A todos os meus amigos e amigas de Brasília, pela força e apoio, em especial à Gabriela Guimarães amiga especial, única e sempre presente. Aos meus amigos de Rio Doce, por preencherem meu coração em BH.

Ao Marcos Tadeu Machado Júnior por me desafiar diariamente me tornando uma pessoa melhor e por sua companhia tão almejada.

A UFMG pela estrutura, corpo docente e missão. Orgulho em fazer parte da sua história.

Por fim, aos cavalos, seres maravilhosos que me ensinam sobre a delicadeza e a força, humildade e braveza simultâneas. Motivam-me diariamente a contribuir para a Veterinária e para a saúde equina. Em especial ao Charlie, Crioulo, Paul, John, Pantera, Yoko, Jonis-Jopling e Elis Regina.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	12
ABSCTRACT	14
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. Auto-Hemoterapia.....	17
2.2. Auto-Hemoterapia na Medicina Veterinária.....	19
2.3. Avaliações Hematológicas e Bioquímicas.....	20
2.4. O Sistema Imunológico.....	22
2.5. Sistema Monocítico Fagocitário.....	23
2.6. Neutrófilos.....	26
2.7. Fagocitose.....	27
2.8. Capacidade fagocítica com o uso do fungo/levedura <i>Saccaromyces cerevisiae</i> (Zimosan).....	28
2.9. Citocinas.....	29
2.10. Citometria de Fluxo.....	31
3.0. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. Local de realização do experimento e manejo dos animais.....	34
3.2. Avaliação de parâmetros clínicos dos animais submetidos à AHT....	34
3.3. Procedimento da Auto-Hemoterapia (AHT).....	35
3.4. Coleta de amostras para análises no estudo.....	36
3.5. Análises dos parâmetros bioquímicos dos animais submetidos à AHT.....	37
3.6. Avaliação dos parâmetros hematológicos dos animais submetidos à AHT.....	38
3.7. Avaliação do perfil de linfócitos T e B através de expressão de marcadores de superfície celular (CD3 ⁺ e CD21 ⁺) empregando a citometria de fluxo.....	38
3.7.1. Avaliação do perfil de expressão de citocinas intracelulares em linfócitos.....	41
3.8. Ensaio de fagocitose de Zimosan por neutrófilos do sangue periférico.....	46
3.8.1. Obtenção do Zimosan.....	46
3.8.2. Marcação do Zimosan.....	46
3.8.3. Avaliação da fagocitose de Zimosan por neutrófilos.....	47
3.9. Análise Estatística.....	49
4.0. RESULTADOS	50
4.1. Avaliação dos parâmetros clínicos dos animais submetidos à AHT...	50
4.2. Perfil bioquímico de enzimas hepáticas e renais e proteinograma no sangue periférico de equino submetidos à AHT.....	52
4.3. Perfil hematológico de células no sangue periférico de equinos submetidos	54

	à AHT.....	
4.4.	Perfil de fenótipos de linfócitos T(CD3 ⁺) e B(CD21 ⁺) no sangue periférico de equinos submetidos à AHT	56
4.5.	Perfil da razão da frequência de linfócitos T(CD3 ⁺) e B(CD21 ⁺) no sangue periférico de equinos submetidos à AHT.....	58
4.6.	Perfil da expressão de citocinas intracelulares (IFN- α , IL-6, IL-8, IL-4, IL-10) em linfócitos do sangue periférico de equinos submetidos à AHT.....	58
4.6.1.	Perfil da expressão de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , IL-6, IL-8).....	59
4.6.2.	Perfil da expressão de citocinas antiinflamatórias (IL-4, IL10).....	61
4.7.	Atividade fagocítica anti-Zimosan em neutrófilos do sangue periférico de equinos submetidos à AHT.....	62
5.	DISCUSSÃO	63
6.	CONCLUSÕES	71
7.	PERSPECTIVAS FUTURAS	72
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
9.	ANEXOS	82
	Anexo I- Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CEUA/UFMG).....	82
	Anexo II- Parâmetros físicos avaliados no exame clínico realizado na Clínica de Equinos da Escola de Veterinária da UFMG.....	83

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1.	Valores médios ($\bar{x} \pm s$) dos índices paramétricos, de acordo com o tempo, de equinos submetidos à auto-hemoterapia (AHT).....	51
Tabela 2.	Valores das análises bioquímicas, de acordo com tempo, de equinos submetidos à auto-hemoterapia (AHT).....	53
Tabela 3.	Valores das análises hematológicas, de acordo com tempo, de equinos submetidos à auto-hemoterapia (AHT).....	56

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Cronograma de coleta de amostras e aplicação da Auto-hemoterapia em equinos hípidos.....	36
Figura 2.	Anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de avaliação de linfócitos do sangue periférico de equinos hípidos submetidos à Auto-hemoterapia	39
Figura 3.	Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de linfócitos T CD3 ⁺ e linfócitos B CD21 ⁺ no sangue periférico de equinos hípidos submetidos à Auto-Hemoterapia.....	40
Figura 4.	Painel de anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de avaliação do perfil de expressão de citocinas intracelulares em linfócitos de equinos.....	42
Figura 5.	Sequência de procedimentos para quantificar o porcentual de linfócitos T/IFN- γ^+ , linfócitos T/IL-6 ⁺ e linfócitos T/IL-8 ⁺ na cultura do sangue total de equinos submetidos à Auto-hemoterapia	43
Figura 6.	Sequência de procedimentos para quantificar o porcentual de linfócitos T/IL-4 ⁺ e linfócitos T/IL-10 ⁺ na cultura do sangue total de equinos submetidos à Auto-hemoterapia	45
Figura 7.	Lâminas de esfregaço sanguíneo em equinos hípidos submetidos à Auto-Hemoterapia após uma hora de cultura de sangue total com Zimosan, este em processo de fagocitose pelos neutrófilos.	48
Figura 8.	Sequência de procedimentos para quantificar o porcentual de neutrófilos/Zimosan ⁺ na cultura de sangue total de equinos hípidos submetidos à Auto-hemoterapia.....	48
Figura 9.	Percentual de linfócitos T (CD3 ⁺) e B (CD21 ⁺) no sangue periférico de equinos hípidos submetidos à Auto-hemoterapia	57
Figura 10.	Razão entre Linfócitos T CD3 ⁺ /Linfócitos B CD21 ⁺ no sangue periférico de equinos hípidos submetidos à Auto-hemoterapia	58
Figura 11.	Perfil de expressão de citocinas pró-inflamatórias por linfócitos T do sangue periférico de equinos hípidos submetidos à Auto-hemoterapia	60
Figura 12.	Perfil de expressão de citocinas antiinflamatórias por linfócitos T do sangue periférico de equinos hípidos submetidos à Auto-hemoterapia	61
Figura 13.	Análise do comportamento da produção de citocinas intracitoplasmáticas em linfócitos do sangue periférico de cavalos submetidos à Auto-Hemoterapia (AHT) após as células serem cultivadas in vitro sob estimulação.....	61
Figura 14.	Atividade fagocítica anti-Zimosan em neutrófilos do sangue periférico de equinos hípidos submetidos à Auto-hemoterapia	64

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Anticorpo
AcMo	Anticorpo Monoclonal
AHT	Auto-hemoterapia
ALB	Albumina
ALT	Transaminase-glutâmico-pirúvica
AST	Aspartato-aminotransferase
A647	Alexa Flúor 647
BFA	Brefeldina
BPI	Fator de aumento de permeabilidade bacteriana
bpm	Batimentos por minuto (frequência cardíaca)
CCL-2	Quimiocina ligante
CD	Grupamento de diferenciação
CD2	Marcador de superfície celular de linfócitos T e linfócitos B
CD3	Marcador de superfície celular da população de linfócitos T
CD4⁺	Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T auxiliares/indutores
CD5	Marcador de superfície celular de linfócitos T e alguns linfócitos B
CD7	Marcador de superfície celular de precursores mielóides
CD8⁺	Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T citotóxicos/supressores
CD 10	Marcador de superfície celular de precursores de linfócitos T e B
CD 14	Marcador de superfície celular da população de monócitos
CD 15	Marcador de superfície celular de granulócitos
CD 19	Marcador de superfície celular de linfócitos B e células NK
CD 21	Marcador de superfície celular de linfócitos B
CD 22	Marcador inibidor de linfócitos B
CD 79^a	Marcador da transdução de sinal do BCR dos linfócitos B
CD 40	Marcador de superfície celular de células apresentadoras de antígeno
CD 41	Marcador de superfície celular de macrófagos e plaquetas
CD 64	Marcador de superfície celular de monócitos e granulócitos
CD 71	Marcador de superfície celular de leucócitos ativados
CD11b/CD18	Molécula de adesão
CF	Capacidade de Fagocitose
CK	Creatina Quinase
CMF	Citometria de Fluxo
CXCL-8	Quimiocina/Interleucina 8
CREAT	Creatinina

DC's	Célula dendrítica
EDTA	Ácido etileno diamino tetraacético
FA	Fosfatase alcalina
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FIB	Fibrinogênio
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FL	Fluorocromo
FSC	Forward Angle Light Scatter (Tamanho celular)
GGT	Gama-glutamiltransferase
HBSS	Solução Balanceada de Hanks (solução salina)
IF	Índice Fagocitário
IFN-γ	Interferon gamma
Ig	Imunoglobulina
IgG	Imunoglobulina G
IgE	Imunoglobulina E
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
MFF	Max Facs Fix (solução fixadora)
MHC II	Complexo de histocompatibilidade principal classe II
mL	Mililitro
mpm	Movimentos por minuto (frequência respiratória)
M1	Macrófago tipo 1
M2	Macrófago tipo 2
MPO	Mieloperoxidase
NK	Célula Natural Killer
NOD	<i>nucleotid-binding oligomerization domain</i>
NO	Óxido nítrico
PBS	Salina tamponada com fosfato
PBS-P	Solução de permeabilização
PBS-W	Solução de lavagem
PE	Ficoeritrina
PMA	Acetato mirístico de forbol
PPT	Proteína Total
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (meio de cultura)
SSC	Side Angle Light Scatter (Granulosidade)
SMF	Sistema Monocítico Fagocitário
Tc	Células T citotóxicas
Th	Células T helper
Th1	Células T CD4 ⁺ secretoras do padrão 1 de citocinas
Th2	Células T CD4 ⁺ secretoras do padrão 2 de citocinas

TLR	Receptores tipo Toll
TPC	Tempo de preenchimento capilar
TNF-α	Fator de necrose tumoral
TGF-β	Fator de crescimento transformante beta
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
URE	Uréia
μL	Microlitro

RESUMO

A Auto-hemoterapia (AHT) consiste na aplicação de sangue autólogo por via intramuscular ou subcutânea com o objetivo de estimular o sistema imunológico. É uma técnica antiga com relatos em todo o mundo, mas com pouco embasamento científico tornando seu uso e função questionáveis. Seus resultados e experiências clínicas apontam incremento imunológico devido à melhora observada em pacientes com doenças crônicas, auto-imunes e no preventivo de pós-cirúrgicos. Embora pouco comprovado cientificamente, acredita-se que a AHT e seus subprodutos gerem um aumento na migração dos leucócitos para os órgãos, aumentando sua atividade orgânica, um aumento na circulação periférica de monócitos e maior produção de macrófagos tornando-se assim uma terapia que ativa o Sistema Monocítico Fagocitário. A partir das diferentes hipóteses sobre a técnica, esse estudo propôs caracterizar os aspectos imunológicos da AHT em equinos. Para tal, oito animais hípidos foram submetidos a três sessões de AHT com intervalos de sete dias com volume de sangue aplicado no músculo de acordo com o peso de cada animal seguindo o protocolo de 20mL a cada 100kg de peso vivo. Aspectos celulares e moleculares do sangue periférico dos equinos submetidos à AHT foram avaliados antes (T0) e três dias (T1, T2 e T3) após cada aplicação da AHT incluindo parâmetros clínicos, bioquímicos, hematológicos, avaliação do perfil fenotípico de linfócitos T (CD3) e B (CD21), a avaliação de citocinas (IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-8 e IL-10) intracitoplasmáticas e por fim a atividade fagocítica de neutrófilos anti-Zimosan. Nossos resultados demonstraram ausência de reação local ou sistêmica nos animais pós-aplicação da AHT. Foi observado um aumento da população de linfócitos T (CD3) nas primeiras semanas de aplicação (T1 e T2) e, por sua vez, diminuição da população de células B (CD21) nos três tempos. Foi observado aumento da produção da citocina IFN- γ e IL-10 nos três tempos pós AHT com consequente diminuição das citocinas IL-6 e IL-8. Por fim, a atividade fagocítica de neutrófilos anti-Zimosan não demonstrou alteração durante o estudo. Em síntese os resultados mostraram que a AHT não alterou os parâmetros clínicos e hematológicos dos animais; quanto aos aspectos imunológicos pôde se observar uma pequena alteração no “status” da resposta imunológica levando à uma resposta inicial mais inflamatória seguido de uma resposta reguladora tendendo então a um balanço. Considerando os resultados, estudos empregando novos marcadores imunológicos devem ser realizados a fim de trazer maiores subsídios que possam confirmar que a AHT seja uma técnica com resultados satisfatórios cientificamente.

Palavras-chaves: imunoterapia, imunofenotipagem, modulação imunológica.

ABSTRACT

Autohemotherapy (AHT) consists of the application of autologous blood intramuscularly or subcutaneously in order to stimulate the immune system. It is an old technique with reports all over the world, but with little scientific background making its use and function questionable. Its results and clinical experiences indicate an immunological increase due to the improvement observed in patients with chronic, autoimmune and post-surgical preventive diseases. Although little scientifically proven, AHT and its byproducts are believed to increase the migration of leukocytes to the organs, increasing their organic activity, an increase in the peripheral circulation of monocytes and increased production of macrophages, thus becoming an active therapy the Monocytic Phagocytic System. From the different hypotheses about the technique, this study proposed to characterize the immunological aspects of AHT in horses. To do this, eight healthy animals were submitted to three sessions of AHT with intervals of seven days with blood volume applied in the muscle according to the weight of each animal following the protocol of 20mL per 100kg of live weight. Cellular and molecular aspects of the peripheral blood of horses submitted to AHT were evaluated before (T0) and three days (T1, T2 and T3) after each application of AHT including clinical, biochemical and hematological parameters, evaluation of the phenotypic profile of T lymphocytes (CD3) and B (CD21), the evaluation of intracytoplasmic cytokines (IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-8 and IL-10) and finally the phagocytic activity of anti-Zymosan neutrophils. Our results demonstrated a lack of local or systemic reaction in the animals after AHT application. An increase in the T lymphocyte (CD3) population was observed in the first weeks of application (T1 and T2) and, in turn, a decrease in the B cell population (CD21) in the three times. Increased production of cytokine IFN- γ and IL-10 was observed in the three post-AHT times with a consequent decrease in IL-6 and IL-8 cytokines. Finally, the phagocytic activity of anti-Zimosan neutrophils showed no change during the study. In summary the results showed that AHT did not alter the clinical and hematological parameters of the animals; a small change in the status of the immune response was observed, leading to a more inflammatory initial response followed by a regulatory response, tending to a balance. Considering the results, studies using new immunological markers should be carried out in order to bring more subsidies that can confirm that AHT is a technique with scientifically feasible results.

Key-words: immunotherapy, immunophenotyping, immunological modulation

1. INTRODUÇÃO

A Auto-hemoterapia (AHT) consiste na aplicação de sangue autólogo por via intramuscular ou subcutânea (Leite, 2008) com o objetivo de estimular o sistema imunológico (Silva et al., 2009). Com escassa literatura, a técnica foi relatada inicialmente por Ravault em 1910 quando, em um registro científico, apontou o auto-tratamento em diversas doenças infecciosas como a febre tifóide, dermatoses, asma, urticária e estados anafiláticos (Shakman, 1992).

Mettenleitter (1936) observou um efeito estimulante no sistema retículo endotelial e sistema nervoso simpático em seres humanos após a administração de 20 mL de sangue autógeno, via intramuscular, no pós-operatório de um total de 300 cirurgias. Os resultados demonstraram um incremento às atividades e resistência dos órgãos prevenindo complicações pulmonares pós-operatórias. Em seu estudo, Mettenleitter (1936) citou cinco diferentes formas de realizar o procedimento: injeção intramuscular de sangue desfibrinado, injeção intramuscular de 16 mL de sangue fresco misturados com 4ml de água destilada, injeção intramuscular de sangue fresco inalterado, injeção intravenosa de sangue desfibrinado ou sangue mantido no gelo e injeção intradérmica em pequena quantidade (1 ou 2mL de sangue fresco). No paciente humano, até 40 mL podem ser injetados no músculo sem sinais de desconforto.

Apesar de ainda ser baseada em experiências pessoais, a técnica tem sido empregada no tratamento de doenças crônicas, com pequena resposta a medicamentos ou em afecções recidivantes. Os resultados satisfatórios têm estimulado pesquisas com o intuito de se comprovar seu efeito. A ausência de estudos atualizados e cientificamente embasados requer investigações com avaliação adequada dos benefícios e riscos associados à prática da auto-hemoterapia (Mondo e Carvalho, 2012).

O objetivo deste estudo foi caracterizar as possíveis alterações clínicas, hematológicas, bioquímicas e no sistema imune, de equinos hípidos submetidos à Auto-Hemoterapia (AHT).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Auto-hemoterapia

A auto-hemoterapia (AHT) é uma prática terapêutica de baixo custo que consiste na retirada de sangue por venopunção e sua imediata administração por via intramuscular ou subcutânea, em que o doador e o receptor são o mesmo indivíduo (Leite, 2008). Os efeitos benéficos da AHT envolvem os antígenos presentes no sangue, a produção de anticorpos e a presença de derivados de bactérias do foco de infecção na corrente sanguínea durante a fase ativa da doença (Rosenow, 1914; Vajda et al., 1967). Em seu estudo, os pacientes de Moraes e Ota (2017) citaram como benefício do tratamento o aumento da disposição, aumento na resistência a gripes e resfriados, melhora da circulação, melhora da pele e qualidade do sono.

Acredita-se que a AHT promova estímulo proteico inespecífico, ativação do sistema imune devido à degradação eritrocitária e seus produtos (Santin e Brito, 2014). Para Mettenleitter (1936) e Teixeira (1940), a AHT leva à diminuição dos leucócitos circulantes devido à migração leucocitária para os tecidos e órgãos abdominais gerando incremento nas funções orgânicas, particularmente do fígado, acelerando processos de desintoxicação e secreção biliar. Entretanto, Robbins (1994) e Tizard (2008a) citam estar a diminuição leucocitária relacionada aos produtos da coagulação (fibrinopeptídeos e fibrinogênio) e suas ações no sistema vascular periférico e

imunológico como aumento da permeabilidade vascular, atividade quimiotática de neutrófilos e estímulo aos macrófagos através do TLR4 (Receptor do tipo toll-4).

Ao redor da prática da AHT há uma grande polêmica, por ser a técnica considerada um procedimento terapêutico sem comprovação científica ou sem comprovação de sua eficácia e segurança. Existem apenas estudos clínicos e experiências em seres humanos e animais. Desta forma, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e a Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (SBHH) não reconhecem a AHT como prática hemoterápica. Os possíveis riscos apontados por estes órgãos englobam a falta de material descartável, higiene deficiente, além da realização da técnica por pessoal incapacitado (Leite, 2008).

A AHT desempenha papel auxiliar aos tratamentos convencionais. Enquanto os antibióticos inibem a reprodução dos microorganismos, o sistema imunológico ativado destrói o agente infeccioso e diminui os efeitos da infecção (Teixeira, 1940). Em relação à indicação da AHT, esta também é variada sendo utilizada em casos preventivos de pós-operatório (Mettenleiter, 1936; Escodro et al., 2012), casos de nódulos, tumores e pólipos (Thomassian, 2005; Gomes et al., 2014; Quessada et al., 2014), doenças de pele (Trevisanil, 2015), auxiliar em processos de cicatrização (Silva et al., 2009) e doenças infecciosas sistêmicas como a toxoplasmose (Moura, 2008). Seu uso pode, também, estar associado a outros tratamentos (Cesarino et al., 2008) ou procedimentos como excisão cirúrgica (Gomes et al., 2014; Thomassian, 2015).

Embora seja um assunto pouco abordado cientificamente, o uso crescente da AHT tem encorajado autores a pesquisarem sobre a técnica e seus efeitos, tanto na medicina humana como na veterinária (Teixeira, 1940; Santin e Brito, 2006; Silva, 2009; Escodro et al., 2012; Quessada et al., 2014; Gomes et al. 2014; Trevisanil, et al., 2015; Guedes et al., 2016).

Teixeira (1940) apresentou a primeira justificativa plausível para a ação da técnica confirmando as observações de Mettenleiter (1936). A partir desse estudo, o autor se tornou referência para os estudos da AHT. O autor concluiu que o sangue ao ser empregado fora do aparelho circulatório, se torna uma substância completamente diferente para o organismo. Em seu estudo, Teixeira (1940) induziu a formação de uma bolha na coxa dos seus pacientes por meio do uso de uma substância irritante, a cantárida. O autor observou 5% de macrófagos, antes da AHT. A partir da primeira hora, após a AHT, o percentual aumentou gradativamente alcançando 22% após oito horas, mantendo este percentual durante cinco dias, com retorno ao valor basal no sétimo dia após a aplicação da AHT. Com estes resultados, Teixeira (1940) concluiu que o sangue, ao ser extraído por punção venosa, sofre modificações físico-químicas devido ao contato com a seringa tornando-se uma proteína estranha ao ser re-injetado no organismo.

Muller e Petersen (1926) demonstraram não haver redução na circulação de leucócitos, como descrito por Widal (1921), e sim um aumento dessas células nos órgãos abdominais, com incremento nas funções orgânicas, particularmente do fígado, e aceleração dos processos de desintoxicação.

No século seguinte, o médico Luiz Moura observou diminuição crescente do número de infecções pós-operatórias em seus pacientes após o uso da AHT (ABMC, 2007). De acordo com o autor, o sangue administrado por via intramuscular é reconhecido pelo organismo como um corpo estranho. Desta forma, ativaria o Sistema Monocítico Fagocitário (SMF) e levaria à maior produção de macrófagos.

Trevisanil et al. (2015) observaram, em pacientes humanos hígidos, o aumento do número de monócitos e das imunoglobulinas IgM, IgG e IgE após uma única dose de AHT (10mL), ratificando a sua capacidade em estimular a resposta imunológica.

Silva et al. (2009) observaram aumento do número de leucócitos séricos em ratos Wistar e uma cicatrização mais plana e menos aparente da lesão induzida quando comparada ao grupo não desafiado pela AHT.

2.2. Auto-hemoterapia na Medicina Veterinária

Quessada et al. (2014) relataram um caso de mastocitoma canino com tratamento cirúrgico associado à AHT. Foram utilizados 10mL de sangue (sem anticoagulante), administrados no músculo glúteo, semanalmente durante seis semanas. Os autores observaram regressão significativa do tamanho das massas desde a primeira semana de aplicação e cicatrização de úlcera escrotal. Neste trabalho, foi utilizado um tratamento contínuo com a AHT, com cinco meses de duração. Borges et al. (2014) observaram efetiva melhora clínica e antecipada recuperação dos cães com parvovirose, ao utilizarem a AHT como adjuvante ao tratamento rotineiro da doença.

Na espécie equina, Thomassian (2005) citou o tratamento do sarcóide equino com a associação do tratamento cirúrgico à AHT, com volume de 10mL e aplicação por via intramuscular, uma vez por semana, totalizando quatro aplicações.

Escodro et al. (2012) apresentaram a AHT aplicada em pontos de acupuntura como efetiva na substituição de protocolos com antiinflamatórios e antibióticos, no pós-cirúrgico de oito orquiectomias em cavalos carroceiros, sugerindo a técnica como protocolo para rotinas com animais carentes. Os autores utilizaram 30mL de sangue total, posteriormente distribuídos em quatro acupontos, baseados na teoria da medicina chinesa tradicional, com atuação no sistema imunológico, distúrbios genitourinários, dor lombossacral, edema e efeitos antiinflamatórios.

Gomes et al. (2014) relataram a AHT como tratamento auxiliar no tratamento de melanocitoma em pônei. A AHT foi realizada em quatro seções semanais, com 80 ml de sangue, em quatro diferentes sítios de aplicação. Os autores relataram a melhora clínica uma semana após o início da AHT e redução de 40% no diâmetro dos nódulos após quatro semanas de tratamento. Os resultados hematológicos com o uso da AHT, caracterizados por leucocitose com linfocitose, eosinofilia e monocitose foram sugestivos de ativação do sistema imunológico.

Guedes et al. (2016) obtiveram bons resultados na cura de papilomatose juvenil em potros. O protocolo de aplicação da AHT foi realizado durante três semanas consecutivas, com o uso de 10mL de sangue, no músculo semitendíneo de um paciente de nove meses de idade. Os autores observaram remissão completa das lesões vinte dias após o final do tratamento.

2.3. Avaliações hematológicas e bioquímicas

A hematologia animal tem avançado significativamente. Os métodos e procedimentos tradicionais vêm sendo substituídos por contadores automatizados, proporcionando rapidez e precisão aos resultados e maior detalhamento na sua interpretação. Apesar disso, ao se considerar a relevância econômica do rebanho equino no Brasil e o contingente de 5.450,601 cabeças (IBGE, 2014), verifica-se um pequeno número de publicações em relação à hematologia equina.

Os exames laboratoriais, juntamente com o exame clínico e a anamnese, trazem informações necessárias ao veterinário para elaborar o diagnóstico, efetuar um correto prognóstico e acompanhar a evolução de pacientes em tratamento (Coppo, 1980).

Considerando a importância do hemograma como exame de rotina na avaliação do estado de saúde e no acompanhamento de enfermidades dos animais, busca-se atualmente a obtenção de parâmetros hematológicos para as raças equinas nacionais como o número de hemácias, concentração de hemoglobina, o volume globular (VG), o volume corpuscular médio (VCM), a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), a amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW), a contagem total de leucócitos, a contagem de plaquetas, a amplitude de distribuição das plaquetas (PDW), o volume plaquetário médio (MPV) e proporção de macroplaquetas (P-LCR). Estes parâmetros deveriam considerar, além da raça, do sexo e da idade, as diferenças entre equinos, muares e asininos (Holanda et al., 2013).

Por sua vez, no diagnóstico veterinário, o suporte dos exames bioquímicos é também complementar ao exame clínico, trazendo informações importantes nas afecções nefrouinárias (uréia e creatinina), hepatobiliares (aspartato-aminotransferase (AST), transaminase glutâmico pirúvica (ALT), sorbitol desidrogenase (SDH), gama glutamiltransferase (GGT), fosfatase alcalina (FA)), hematológicas e endócrinas. Auxiliam também na elucidação dos sinais clínicos em processos inflamatórios, infecciosos, metabólicos, imunes, articulares, dentre outros (Coppo e Mussart, 2000).

Os estudos sobre as análises bioquímicas em equinos observam os analitos e suas possíveis variáveis em condições como o exercício e nas enfermidades, como síndrome cólica e alterações musculares (Tadich et al., 1997).

Devido às escassas referências para comparação, frequentemente torna-se difícil a interpretação dos resultados dos exames hematológicos e bioquímicos dos equinos. Desta forma, os esforços nos estudos das análises laboratoriais são intensos a fim de determinar valores de referência levando-se em conta os fatores apontados (Benesi et al., 2009).

2.4. O Sistema Imunológico

O Sistema Imunológico atua por meio de um conjunto de células, tecidos e órgãos com atividades variadas e integradas, responsáveis por evitar e controlar a entrada de diferentes patógenos ao organismo. A resposta imune é dividida em resposta imune Inata e Adaptativa (Murphy et al., 2010; Lopes e Amaral, 2011).

A resposta imune inata realiza o primeiro contato com o patógeno e atua por meio das barreiras microbiológica, química, mecânica e celular, como os neutrófilos, os macrófagos e as células Natural Killer (NK). A resposta imune inata está sempre disponível para combater uma gama de patógenos. Ela não desenvolve uma linha de resposta específica e duradoura, o que a diferencia da resposta imune adaptativa (Lopes e Amaral, 2011). Quando o organismo é invadido pelo microrganismo, a resposta imune inata atua através da fagocitose, realizada pelos neutrófilos e macrófagos, e de sinalizadores inflamatórios como as citocinas e quimiocinas, que incrementam a atividade celular local para auxiliar na fagocitose do microrganismo (Lopes e Amaral, 2011).

A resposta imune adaptativa é conhecida por desenvolver uma resposta específica a um determinado patógeno e, desta forma, haverá uma resposta duradoura por possuir uma “memória” capaz de lembrar o sistema imunológico toda vez que este patógeno for

reconhecido (Murphy et al., 2010). A resposta imune adaptativa também pode ser denominada específica ou adquirida. Adquirida por se desenvolver de acordo com os desafios que o organismo enfrenta ao longo de sua vida (Lopes e Amaral, 2011) e específica por que desenvolve uma resposta para cada patógeno reconhecido. A resposta imune adaptativa trabalha de duas formas diferentes: a resposta imune celular, regida pelos linfócitos T, e uma resposta imune humoral, produzida pelos linfócitos B (Murphy et al., 2010).

Para que a resposta ao microorganismo comece há necessidade do reconhecimento dele pelas células imunes. Na imunidade inata, o reconhecimento comum é devido à presença de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP's) como ácidos nucléicos e lipopolissacarídeos presentes na superfície dos microorganismos (vírus, bactérias, fungos) que serão reconhecidos pelos receptores de reconhecimento padrão presentes em diferentes células como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células endoteliais e epiteliais. Um exemplo de receptor de reconhecimento padrão são os receptores semelhantes a "Toll" (TLRs) que se encontram na superfície celular (TLR's 2, 4 e 5) e reconhecem patógenos extracelulares, que se encontram na membrana endossômica (TLR's 3,7,8 e 9) e se ligam a ácidos nucléicos de microorganismos fagocitados pelas células, e os receptores da família NLR (NOD – domínio de oligomerização ligador de nucleotídeo) que se encontram no citoplasma e reconhecem peptídeo-glicanos bacterianos. Para reconhecer os microorganismos também existem outros receptores de reconhecimento padrão como o grupo das Lectinas tipo "C", os receptores varredores (*scavenger*) e os receptores N-formil Met-Leu-Phe. Após o reconhecimento ocorre uma sequência de eventos intracelulares com recrutamento de proteínas e ativação de fatores de transcrição que levam as células, agora ativadas, a produzir citocinas, quimioscinas, moléculas estimulatórias e moléculas de adesão epitelial que darão sequência ao combate do microorganismo (Abbas et al., 2012).

Os linfócitos T são divididos em linfócitos T auxiliares e citotóxicos. Quando ativados, os linfócitos T auxiliares produzem e liberam interleucinas, denominadas citocinas, auxiliares na diferenciação de linfócitos citotóxicos e linfócitos B. Isto configura uma participação dos linfócitos T auxiliares na resposta imune humoral. Os linfócitos T auxiliares também potencializam macrófagos e neutrófilos para fagocitarem microorganismos. Por sua vez, os linfócitos T citotóxicos, reconhecem células infectadas, a exemplo das células tumorais, e secretam proteínas perforina e granzima, capazes de levar à apoptose da célula opsonizada, e eliminação do microorganismo (Lopes e Amaral, 2011).

Os linfócitos B são os responsáveis pela resposta humoral ao produzirem anticorpos, as imunoglobulinas, logo após o estímulo pelo reconhecimento antígeno-específico. Quando ativados, os linfócitos B se multiplicam formando os plasmócitos, células produtoras de anticorpos, e as células de memória. Os anticorpos funcionam de duas maneiras: a partir da neutralização do microorganismo ou de toxinas e como sinalizadores na marcação da célula alvo para o reconhecimento de macrófagos e neutrófilos que irão fagocitar e destruir a célula infectada (Lopes e Amaral, 2011).

Os linfócitos que não sofrerem apoptose após a resposta imune serão integrantes da memória imunológica, um conjunto de células de memória que gera uma resposta inflamatória muito mais rápida ao segundo contato com o mesmo antígeno (Lopes e Amaral, 2011).

Juntas, as respostas inata e adaptativa fazem parte do conjunto formador de um sistema de defesa eficaz. Muitas infecções são combatidas pela resposta imune inata sem causarem qualquer doença. Aquelas não solucionadas desencadeiam uma resposta imune adaptativa

podendo gerar uma memória imunológica duradoura que impedirá futuras infecções (Murphy et al., 2010).

2.5. Sistema Monocítico Fagocitário

O Sistema Monocítico Fagocitário (SMF) é constituído por células macrofágicas responsáveis pela fagocitose, lise e eliminação de substâncias estranhas, sejam elas vivas ou inertes. O monócito é a célula precursora do macrófago na medula óssea. Na circulação, os monócitos permanecem durante 24 a 72 horas e, em seguida, deslocam-se para os tecidos corporais, principalmente pele, peritônio, pulmão, ossos e sinusóides hepáticos, passando a macrófagos (Veronesi, 2008; Guimarães e Gama Filho, 2009).

As principais funções do SMF incluem a remoção de partículas estranhas provenientes do sangue ou dos tecidos, toxinas e outras substâncias tóxicas; remoção de microagregados de fibrina e prevenção de coagulação intravascular; ingestão do antígeno, seu processamento e posterior entrega aos linfócitos. Estas funções desempenhadas pelo SMF são determinantes para o controle e combate a diferentes processos patológicos, sejam infecciosos, neoplásicos, degenerativos ou autoimunes. Os macrófagos podem ser errantes ou estacionários (tecidos), podendo tornar-se livres para migrar e penetrar na região sede do processo inflamatório (Veronesi, 2008).

De acordo com Stites et al. (2004), sempre que os macrófagos se deparam com mediadores de inflamação ou outros sinais de lesão tecidual, eles passam por um processo de ativação caracterizado pelo aumento da sua atividade fagocítica, aumento do metabolismo e atividade. O macrófago ativado tem sua função fagocítica potencializada. Os estímulos à ativação dos macrófagos são inúmeros, citando o contato direto ao DNA bacteriano, o contato com partículas de degradação do sistema de coagulação sanguínea e o contato com algumas citocinas secretadas por linfócitos vizinhos.

Os macrófagos ativados estimulam a inflamação aguda por meio da liberação de citocinas, removem tecidos mortos e ainda secretam fatores de crescimento. Desta forma, induzem à formação de tecidos de reparo a partir do estímulo à proliferação de fibroblastos, síntese de colágeno e angiogênese (Abbas et al., 2012).

O aumento da produção de fagócitos e consequente estímulo ao sistema imunológico atingem o objetivo final da auto-hemoterapia. Os melhores resultados contra infecções e doenças de difícil cura são alcançados pelo incremento da defesa imunológica do organismo (Moura, 2008).

Os macrófagos são responsáveis pela fase inicial do processo de reparação de tecidos lesionados, horas após a chegada dos neutrófilos no local de inflamação. Os neutrófilos apresentam menor velocidade de resposta, maior habilidade microbicida e possuem diferentes funções, entre realizar a limpeza após a inflamação e ser capaz de ativar a resposta adquirida (Tizard, 2008a). A principal característica dos macrófagos é a sua capacidade de fagocitar material estranho, inerte e antigênico assim como debris celulares oriundos da resposta inflamatória (Dias et al., 2011).

Através de seus receptores, TLR's e NOD, os macrófagos conseguem reconhecer bactérias, vírus e antígenos em geral. Depois deste reconhecimento, os macrófagos respondem liberando citocinas, como IL-1, IL-12, IL23 e TNF- α (fator de necrose tumoral \square) que darão início à resposta mediada pelo macrófago (Tizard, 2008a). Outro produto produzido pelos macrófagos é

o óxido nítrico (NO). Porém, somente a população de macrófagos M1 é capaz de produzi-lo e, desta forma, se relacionam diretamente com a defesa do hospedeiro devido à eficiente eliminação de bactérias, fungos, vírus, protozoários e células tumorais, além de produzirem citocinas pró-inflamatórias. A população M2 tem uma função oposta: a de suprimir as respostas e de produzir citocinas que também suprimam a resposta imunológica. As células M1 são requisitadas no início da inflamação, enquanto as M2 na fase de cicatrização, por promoverem reparação tecidual (Tizard, 2008a).

Os macrófagos utilizam glutamina, aminoácido essencial, para a realização da função fagocítica, citotóxica e metabólica (Leandro et al., 2006). A baixa concentração deste aminoácido está relacionada com uma diminuição na capacidade de apresentar antígenos, produção de ânion superóxido e na produção de citocinas (Woods et al., 2000).

Os macrófagos atuam em praticamente todas as reações imunes (Dias et al., 2011). Esta célula pode ser isolada do sangue (monócitos), de órgãos linfóide-mielóides (baço, timo e rim cefálico) ou da cavidade peritoneal (Dias et al., 2011).

2.6. Neutrófilos

Os neutrófilos correspondem à primeira linha de defesa contra a invasão de microorganismos. Sua ação baseia-se em identificar, fagocitar e destruir bactérias a partir do reconhecimento dos seus receptores de membrana (receptores de anticorpos (Fc – CD32) e receptores de complemento (CD35 e CD11b/CD18)) e através dos pseudópodes de superfície e grânulos intracitoplasmáticos (Appelberg, 2006; Nabity e Ramaiah, 2010).

Os neutrófilos possuem uma variedade de grânulos que contribuem para a defesa contra bactérias, fungos, protozoários e alguns vírus. Esses grânulos possuem inúmeras proteínas responsáveis pela degradação de matriz celular bacteriana, componentes da explosão respiratória, proteínas extracelulares para adesão celular e mediadores inflamatórios. Estas proteínas são armazenadas e liberadas em sequência para prevenir alterações locais ou generalizadas nos tecidos. Alguns exemplos de grânulos são a CD11b/CD18 (adesão), mieloperoxidase (migração), lactoferrina, lisosima, gelatinase e defensinas que realizam a destruição microbiana (Borregaard et al., 1993; Nabity e Ramaiah, 2010).

A função antimicrobiana dos neutrófilos é um processo de muitas etapas. Para ter acesso ao patógeno dentro do foco de infecção no tecido, os neutrófilos devem deixar a circulação a partir de uma sequência de fatos. Inicialmente, ocorre a aderência dos neutrófilos às células endoteliais a partir das selectinas (L-selectina e D-selectina) e rolamento no tecido epitelial permitindo o contato e ativação dos neutrófilos por quimiocinas (CXCL-8). A finalização do processo de migração pelas integrinas (CD11/CD18) possibilitam aos neutrófilos uma forte adesão ao endotélio e, finalmente, ocorre sua invasão ao tecido por entre as células endoteliais (Kishimoto e Rothlein, 1994; Walcheck et al., 1996). Todo o processo é regido por um gradiente quimiotático que orienta os neutrófilos para alcançar o patógeno no local onde há maior quantidade de quimiotáticos/quimioatrativos como as quimiocinas, fatores de complemento e peptídeos (Foxman et al., 1999).

No local de infecção e diante do patógeno, o neutrófilo desempenhará seus mecanismos de destruição de microorganismos. O primeiro processo é a fagocitose. A partir de uma vesícula o neutrófilo engloba e internaliza as partículas microbianas. Em sequência, forma-se o fagossomo

onde os microorganismos serão destruídos por enzimas proteolíticas e radicais reativos de oxigênio (Peyron e Stegmann, 2001).

Sabe-se que o potencial bactericida dos neutrófilos é dividido em dois mecanismos: o dependente e o independente de oxigênio. O primeiro é também conhecido como *Burst* respiratório ou explosão respiratória quando há um rápido consumo de oxigênio e geração de superóxidos (OH) e peróxidos de hidrogênio (H₂O₂), altamente tóxicos para as células e para os microorganismos. O segundo por sua vez desempenha um papel mais importante na destruição dos microorganismos em relação aos mecanismos oxidativos. Esse processo ocorre devido à ação dos grânulos e suas diferentes funções como amplo espectro de ação contra bactérias, fungos, vírus e protozoários (defensinas); aumento da permeabilidade de membrana de bactérias Gram-negativas (BPI); degradação da parede de bactérias (elastase, lisosima); atividade bacteriostática associada ao sequestro de ferro (lactoferrina), entre outros (Lehrer e Ganz, 1990).

Para finalizar todo este processo, após a fagocitose e destruição do microorganismo pelo neutrófilo, este entra em processo de apoptose e é fagocitado por macrófagos (Weiss et al., 2010).

2.7. Fagocitose

A fagocitose desenvolvida por células monocíticas-fagocitárias é o início das atividades biológicas de toda a resposta imunológica. É constituída por várias etapas como aderência ao substrato, quimiotaxia, ingestão de partículas e produção de superóxido, entre outros produtos microbicidas (Brandt et al., 2006).

Após a migração da corrente sanguínea para os tecidos, os antes monócitos agora macrófagos são atraídos por subprodutos do Sistema Complemento (C5a), por produtos bacterianos, por alarminas liberadas pelas células e tecidos danificados e também pelas defensinas e outros peptídeos derivados dos neutrófilos (Tizard, 2008a).

A CCL-2, proteína quimiotática dos macrófagos, é produzida sob influência da IL-6 pelos neutrófilos e células endoteliais ativadas. Os macrófagos ao realizarem a fagocitose, por meio de mecanismos oxidativos e não-oxidativos, são capazes de manter a atividade fagocítica e depois repeti-la (Tizard, 2008a).

Para melhor penetração no tecido lesionado, os macrófagos secretam colagenases, elastases e geram plasmina, a fim de destruir e reduzir a matriz de tecido conjuntivo local, facilitando sua penetração no tecido (Tizard, 2008a).

2.8. Capacidade fagocítica com o uso do fungo/levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Zimosan)

O Zimosan é uma substância derivada da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, sendo constituído predominantemente por cadeias polissacarídicas de alto peso molecular, principalmente β-glucana, mananos e chitina (Frasnelli et al., 2005; Jiang, 2013).

O Zimosan vem sendo utilizado em pesquisas relacionadas à resposta imune inata há mais de cinquenta anos. Tem sido utilizado na produção de fatores pró-inflamatórios, como uma boa alternativa devido à facilidade e consistência das preparações e pelo seu número limitado de componentes moleculares o que garante melhor entendimento da resposta gerada (Underhill, 2003; Souza, 2016).

Segundo Silva et al. (2001), o fungo *Sacharomyces cerevisiae* pode ser marcado por fluorocromos.

De maneira geral, o Zimosan é utilizado para avaliar a atividade de fagócitos. Para Secombes (1994) o β -glucano, polissacarídeo estrutural de fungos, é o principal estimulador à fagocitose. O mecanismo da morte das células fúngicas está relacionado à fagocitose e ação das lisosimas citoplasmáticas que contém enzimas hidrolíticas, fosfatases, β -glucuronidase, proteases, amino peptidases e lípases (Gross et al., 1999).

2.9. Citocinas

As citocinas são proteínas ou glicoproteínas secretadas por diversas células do sistema imune que possuem um importante papel na comunicação celular. São consideradas elementos fundamentais no controle da resposta imunológica, pois regulam a magnitude e definem a natureza destas respostas ao influenciar no crescimento e diferenciação de linfócitos. Elas exercem seus efeitos nas células a partir da interação com receptores de membrana celular que têm a capacidade de transferir a informação das citocinas ao interior das células. Como os receptores de citocinas têm distribuição em um variado número de células, uma citocina é capaz de atuar em qualquer célula que possua receptor para a mesma, sendo, portanto, chamadas de mediadores pleiotrópicos (Vizoni et al., 2008).

O efeito de cada citocina é orientado pelo microambiente tecidual e pela célula portadora do receptor ativado. O efeito final de cada citocina é influenciado pela sua concentração e seus respectivos receptores solúveis, presença de outras citocinas, funcionamento de vias intracelulares de sinalização e transcrição nuclear (Meager, 1998). Deste modo, a atividade de uma citocina reflete o contexto das células em relação a diversos fatores o que pode resultar em efeitos sinérgicos ou antagônicos (Vizoni et al., 2008).

As citocinas são sintetizadas pelos linfócitos T, entre outras células, e são mediadores de processos imunológicos que orquestram a diferenciação, recrutamento, concentração e ativação de células efectoras (Kimber e Dearman, 2002; Holgate, 2002; Faria, et al., 2008).

Os linfócitos T podem ser caracterizados pela sua expressão fenotípica (CD4+, CD8+) ou pelo perfil de citocinas que predominantemente sintetizam. As citocinas IFN- γ , TNF e IL-2 caracterizam o perfil T1 (Th1 e Tc1) enquanto as citocinas IL-4, IL-5 e IL-10 o perfil T2 (Th2 ou Tc2) (Holgate, 2002; Negano et al., 2002; Shirai et al., 2003). O perfil Th1 é estimulado pela IL-12 e produz IFN- γ e IL-2, enquanto o perfil Th2 é estimulado pela IL-1 associada à IL-4 e produz IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e IL-10. Por fim o perfil Th17 é estimulado pela IL-6 e IL-23 e produz IL-17 (Tizard, 2008b).

IL-1 e IL-6 possuem um papel primário em ativar células T. Depois de ativadas, as células T secretarão outras citocinas, predominantemente IL-2 e IFN- γ que induzem respostas de linfócitos T citolíticos, células NK e fagócitos mononucleares a produzirem IL-1 e TNF- α . As citocinas do tipo Th1, principalmente IL-2 e IFN- γ iniciam a cascata de eventos inflamatórios. Elas são contrabalançadas por citocinas Th2, principalmente, IL-10 e IL-4. IL-1, IL-6 e IFN- γ possuem funções inflamatórias e imunoestimuladoras enquanto IL-4, IL-10 e TGF- β são imunorreguladoras. O balanço entre elas mostra-se crítico no desenvolvimento de doenças (Vizoni et al., 2008).

A citocina IFN- γ é produzida principalmente por linfócitos TCD4 Th1, por algumas células TCD8 e por células NK. O IFN- γ age nas células B, T, NK e macrófagos. É um mediador essencial na resposta celular imune mediada e está relacionado com a indução da função efetora de fagócitos mononucleares (Vizoni et al., 2008; Tizard, 2008b). O IFN- γ promove a diferenciação dos linfócitos com perfil Th1 e inibe a diferenciação dos linfócitos Th2 ao atuar nos linfócitos TCD4; promove a diferenciação de células B induzindo a mudança de isotipo para IgG; possui efeitos na maturação dos linfócitos TCD8, e está relacionado com a severidade e hiperreatividade de processos patológicos (Rebordão et al., 2013).

Produzida por células Th2 ativadas, mastócitos e basófilos ativados a IL-4 atua nas células B, T, macrófagos, células endoteliais, fibroblastos e mastócitos. É a citocina responsável por estimular o crescimento e a diferenciação das células B (Tizard, 2008b). Ela promove a diferenciação das células T CD4 *naive* em células produtoras de citocinas com perfil Th2 e em conjunto com a ativação do CD40, promove a proliferação dos linfócitos B induzindo a mudança de isotipo para IgE. A IL-4 possui um efeito inibitório da produção de citocinas pró-inflamatórias sendo antagonista do efeito do IFN- γ (Goldsby et al., 2001).

A IL-6 é produzida por macrófagos, células T e B, mastócitos, células endoteliais vasculares, fibroblastos, queratinócitos e células mesangiais, além das células musculares durante o exercício. Age nas células T e B, hepatócitos e células do cérebro e medula óssea (Tizard, 2008b). É uma citocina pleiotrópica com papel central na defesa imunológica. Embora inicialmente ela fosse descrita como citocina inflamatória, recentemente estudos tem reconhecido que ela possui propriedades antiinflamatórias e imunossupressoras adicionais (Tilg et al., 1997).

A citocina IL-8 ou Quimiocina (CXCL8) é produzida em maior parte por macrófagos e em menor quantidade por células endoteliais, queratinócitos, hepatócitos e condrócitos. Como uma quimiocina, sua principal ação é o grande estímulo migratório para as células do sistema imune, em especial os neutrófilos e, além de atraí-los o ativa-os ao aumentar seu metabolismo oxidativo. Possui como estímulos a IL-1, TNF- α e IFN- γ (Varella e Forte, 2001; Tizard, 2008b). Juntamente à TNF- α e IL-1, a IL-6 e IL-8 podem ser importantes mediadores de desnutrição, febre e outras manifestações inflamatórias (Vizoni et al., 2008)

A IL-10 é uma citocina imunossupressora e anti-inflamatória. Supressora tanto da inflamação quanto das células T, NK e da função dos macrófagos. É produzida, principalmente, pelas células Th2, mas também pelas células M2, NK e algumas células dendríticas. Tem como alvos as células Th1, as células B, os macrófagos, as células NK e os mastócitos (Tizard, 2008b).

A determinação das citocinas em sangue periférico por citometria de fluxo tem a vantagem de associar o fenótipo dos linfócitos T periféricos (CD3, CD4 e CD8) à citocina por eles produzida intracelularmente (Rebordão et al., 2013).

2.10. Citometria de fluxo

A Citometria de Fluxo (CMF) é uma técnica avançada, automatizada e altamente sensível, muito útil para o estudo do imunofenótipo de células normais e anormais através de análises multiparamétricas realizadas por um sistema informático (Hedley e Keeney, 2013). Por meio do uso de anticorpos monoclonais (AcMo) associados a fluorocromos, um elevado número de partículas em suspensão é analisado em um curto período (5.000 células/seg) (Donnenberg e Donnenberg, 2007; Hedley e Keeney, 2013)

A Citometria tem apresentado importante aplicação no diagnóstico, prognóstico e tratamento de doenças. Ela permite realizar o diagnóstico morfológico e definição de estágio de maturação celular dos leucócitos devido à sua capacidade de imunofenotipagem (Suárez, et al., 2015).

O citômetro de fluxo tem como princípio básico a avaliação célula-célula de uma amostra através de uma interceptação por laser que fará a avaliação das características morfológicas e estruturais da célula por meio da emissão da luz (*scatter*). O *Forward scatter* (FSC) se relaciona com o tamanho e o *Side Scatte* (SSC) se relaciona com a granulosidade da célula. A segunda avaliação deste equipamento se baseia no uso de fluorocromos, previamente aplicados nas células e quando excitados pelo laser emitem luz de acordo com suas características fluorescentes e são utilizados para examinar aspectos bioquímicos, biofísicos e moleculares das células. Esses sinais luminosos são filtrados por filtros ópticos a fim de deixar passar somente a luz de comprimento de onda desejado (Bertho, 2017).

Os fluorocromos são substâncias fluorescentes que precisam de um determinado comprimento de onda de luz para serem excitados. São exemplos de fluorocromos Isoticionato de Fluoresceína (FITC) e Fioeritrina (PE) (Bertho, 2017)

Podem ser empregados para análises de antígenos expressos na membrana, no citoplasma e no núcleo. Suárez et al. (2015) utilizaram marcadores para antígenos de células em diferenciação celular e para precursores hematopoiéticos. Os autores sugeriram o uso de anticorpos contra antígenos expressados na maioria dos linfócitos T e B, como o anti-CD3 e anti-CD19, respectivamente.

Observa-se a importância das associações de marcadores para definir com certeza uma linhagem celular. Por exemplos, na definição de linfócitos B, as células devem expressar fortemente o CD19 em associação com os antígenos CD79a, CD22 ambos citoplasmáticos e o CD10 de membrana. Para esta linhagem, os antígenos CD19 e CD22 são sensíveis e específicos para linfócitos B, ao contrário do CD79a que, apesar de apresentar alta sensibilidade, não é absolutamente específico para esta linhagem (Steller-Stevenson et al., 2006; Sedek et al., 2014).

Para definição de linfócitos T as células devem expressar fortemente o CD3 e deve haver associação com pelo menos o antígeno CD2, CD7 ou CD5. Apesar de alta sensibilidade, esses antígenos não são específicos da linhagem T. CD2 e CD7 podem se expressar em percursos mielóides e CD5 em células B maduras (Craig e Foon, 2008; Finn et al., 2009; Sedek et al., 2014).

Dependendo do objetivo, outras linhagens podem ser interessantes como o MPO, considerado marcador específico de linhagem mielóide, o CD14 identifica a linhagem monocítica, CD15 a granulocitária. CD71, glicoforina A e CD36 a linha eritróide e os antígenos CD41 e CD42 a linhagem plaquetária (Dong et al., 2011; Biomed et al., 2014). Outro exemplo, é o CD64, uma glicoproteína de membrana expressa, normalmente, na superfície de monócitos e macrófagos. Pouco expressa na superfície de neutrófilos não ativados e apresentando aumento na sua expressão à medida que os neutrófilos são estimulados pelas citocinas inflamatórias (Barbosa et al., 2015).

O CD3 é um conjunto de proteínas na superfície dos linfócitos T e é o componente de transdução do sinal dessas células. Está diretamente ligado ao TCR (receptor de antígenos do linfócito T) que após sua ligação ao antígeno, envia um sinal que inicia a resposta do linfócito T. Por sua vez, o CD21 está presente na superfície de células B e é um receptor de complemento

(CR2). Está ligado à capacidade em desenvolver resposta humoral pelo linfócito B uma vez que é responsável pela estimulação dessas células (Tizard, 2008a).

A imunofenotipagem por citometria de fluxo é uma ferramenta para análises celulares sendo, cada vez mais, rotineiramente utilizada em estudos e pesquisas hematopatológicas (Rego e Santos, 2009).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de realização do experimento e manejo dos animais

Neste trabalho foram utilizados oito equinos oriundos do Hospital Veterinário da UFMG, situado no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Participaram do estudo quatro machos e quatro fêmeas sendo cinco animais da raça Haflinger e três sem raça definida, com idades entre 2 e 4 anos. Todos os animais receberam o mesmo trato alimentar, à base de ração concentrada (1% peso vivo/dia), feno (3kg/dia) e capim picado, sal mineral e água *ad libitum*. Os animais viviam em piquetes individuais.

Para seleção dos animais, a saúde geral foi avaliada por meio de exames físicos, hematológicos e bioquímicos.

Os animais foram submetidos aos procedimentos experimentais simultaneamente. Todos os procedimentos descritos neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso Animal CEUA – UFMG, sob protocolo No. 351/2017 (Anexo I).

3.2. Avaliação de parâmetros clínicos dos animais submetidos à AHT

Os exames físicos foram realizados por um mesmo avaliador, antes do início do experimento e, durante a coleta de dados diariamente a fim de se acompanhar o estado geral do animal. O exame físico foi constituído de inspeção; mensuração dos índices paramétricos: temperatura corporal (°C), tempo de preenchimento capilar (TPC; em segundos), frequência cardíaca (batimentos por minuto), frequência respiratória (movimentos por minuto) e pulso (pulsações por minuto); avaliação das mucosas e linfonodos; auscultação dos focos cardíacos e respiratórios e auscultação abdominal (Anexo II).

A inspeção é a avaliação visual do animal de frente, de trás e também dos lados direito e esquerdo. O avaliador verificou o comportamento, a postura, o escore corporal, a condição física e as anormalidades anatômicas. Foram avaliadas a coloração e a integridade das mucosas oral, nasal, ocular e vulvar (no caso de fêmeas).

Por meio da palpação, foram examinados os linfonodos submandibular, retrofaríngeo, parotídeo, cervical superficial e subilíaco.

A auscultação foi realizada com o auxílio de um estetoscópio. A auscultação cardíaca foi avaliada do lado esquerdo e direito, onde se quantificou a frequência cardíaca e se observou a qualidade e timbre do som nos focos de auscultação cardíaca (Pulmonar, Aórtico, Mitral e Tricúspide).

A auscultação respiratória foi dividida em traqueal, tráqueo-brônquica e bronco-bronquiolar com focos de auscultação na porção ventral do pescoço, e nos 16°, 14°, 11° e 8° espaços

intercostais, onde se quantificou a frequência respiratória (movimentos por minutos – mpm) e se observou a qualidade do ruído respiratório.

A auscultação abdominal foi realizada em quadrantes (ventrais e dorsais dos lados direito e esquerdo), onde se quantificou o número de borborismos intestinais em cada foco de auscultação além da qualidade destes sons.

3.3. Procedimento da Auto-hemoterapia (AHT)

A AHT foi realizada em três aplicações por animal, a intervalos de uma semana entre elas (Fig. 1). O sangue foi coletado por venopunção da jugular com agulha 40 x 1,12 e seringa de 20mL após prévia antissepsia cuidadosa do local com álcool 70%.

O volume do sangue total aplicado foi calculado de acordo com o peso do animal (20mL de sangue/100 kg peso vivo). O peso médio dos animais foi de $300,1 \pm 50,53$ kg e o volume médio de AHT aplicado foi $59,75 \pm 10,95$ mL.

Foi respeitado o volume máximo de 20mL de sangue total (sem uso de anticoagulante) por aplicação intramuscular em cada sítio de aplicação com uso de agulha 30 x 0,08, seringa de 20mL e após prévia antissepsia cuidadosa do local com álcool 70%. Desta maneira, quatro sítios foram selecionados: músculos serrátil ventral (musculatura do pescoço lados direito e esquerdo) e músculos semitendíneo e semimembranoso (musculatura medial da coxa lados direito e esquerdo) devido à sua indicação farmacológica.

3.4. Coleta de amostras para análises no estudo

Para a realização dos protocolos experimentais descritos a seguir foram coletadas amostras de sangue periférico, por venopunção da jugular de cada animal sendo um tubo de 5mL com EDTA, um de 9mL sem anticoagulante e um de 9mL contendo heparina sódica. Para obtenção dos valores basais dos animais (T0), a primeira amostra foi coletada no dia anterior à realização da primeira aplicação de AHT. As demais amostras (T1, T2 e T3) foram obtidas três dias após a realização da AHT em cada semana (Fig. 1).

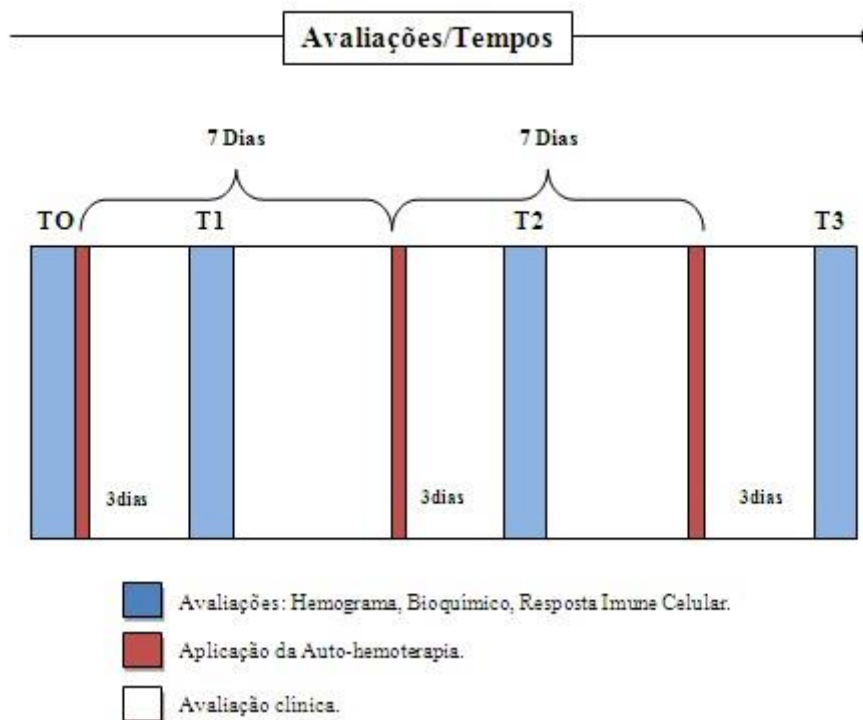


Figura 1: Cronograma de coleta de amostras e aplicação da Autohemoterapia (AHT) em equinos hígdidos.

3.5. Análises dos parâmetros bioquímicos dos animais submetidos à AHT

Para obtenção das amostras para análises bioquímicas, foram coletados 9mL de sangue por venopunção da jugular com sistema em vácuo com tubo sem anticoagulante e centrifugados¹ a 2500rpm, por 10 minutos. O soro foi separado em flaconetes e armazenado a -20°C para posterior avaliação.

As análises foram realizadas em analisador bioquímico automático², a partir de amostras coletadas nos tempos T0, T1, T2 e T3. Os analitos foram mensurados por meio de *kits* comerciais³ utilizando metodologia descrita na bula.

O perfil hepático incluiu a mensuração das concentrações séricas de: aspartato-aminotransferase (AST), transaminase-glutâmico-pirúvica (ALT), gama-glutamiltransferase (GGT) e fosfatase alcalina (FA). Mensurou-se ainda as concentrações séricas da proteína total (PPT) e albumina (ALB). O perfil renal foi baseada na avaliação sérica das concentrações de uréia (URE) e creatinina (CREAT).

¹ Combate, CELM®

² COBAS MIRA PLUS ROCHE®

³ Biotécnica

As concentrações de globulina (GLO) foram obtidas a partir da diferença entre os valores da proteína total (PPT) e albumina (ALB).

A concentração plasmática de fibrinogênio (FIB) foi mensurada a partir das amostras oriundas dos tubos com EDTA. Dois capilares contendo cada amostra foram centrifugados⁴ a 2500 rpm por cinco minutos. Um dos capilares foi utilizado para a avaliação da proteína plasmática total e outro colocado em banho Maria a 56°C, por três minutos, para desnaturação do fibrinogênio e novamente centrifugado a 2500rpm por cinco minutos. A concentração plasmática do fibrinogênio foi adquirida a partir da diferença entre os valores obtidos nas leituras dos dois capilares, no refratômetro de Brix.

3.6. Avaliação dos parâmetros hematológicos dos animais submetidos à AHT

Para obtenção das amostras para as análises hematológicas, foram coletados 9 mL de sangue por venopunção da jugular com sistema em vácuo com tubo com EDTA. As análises foram realizadas por meio do contador hematológico automático⁵ e incluíram a contagem total de hemácias, o hematócrito, a concentração de hemoglobina, valores de volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), a concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), a contagem total de leucócitos e o número total de plaquetas nos tempos T0, T1, T2 e T3. Para contagem do diferencial celular, foram realizadas extensões sanguíneas de cada amostra, logo após a coleta, corados pela técnica de Romanovisk⁶ e a leitura realizada em microscopia de luz. Foram contadas 100 células por lâmina e obtidos os valores percentuais das populações de linfócitos, neutrófilos (segmentados e bastonetes) monócitos, eosinófilos e basófilos. Foi realizada a citomorfologia das células através da identificação de linfócitos reativos, monócitos ativados, neutrófilos hipersegmentados e macroplaquetas.

3.7. Avaliação do perfil de linfócitos T e B através de expressão de marcadores de superfície celular (CD3⁺ e CD21⁺) empregando a citometria de fluxo

Foram coletados 1mL de sangue em tubo contendo EDTA, utilizados para o protocolo. Amostras de 50 µL foram distribuídas em três tubos cônicos de poliestireno⁷ de 5mL: tubo 1, “Branco” (controle/sem anticorpo), tubo 2, “Célula B” contendo 3 µL de CD21(FITC) e o tubo 3 “Célula T” contendo 2 µL de CD3 (A647) (Figura 2). O anticorpo anti-CD3 apresenta marcação intracitoplasmática. Desta maneira, as células do tubo 3 foram primeiramente submetidas à fixação e posteriormente à permeabilização (conforme recomendação do fabricante). Para fixação, foram adicionados 2mL de solução de Lise (FACS LISYING SOLUTION – BECTON DICKINSON) diluída dez vezes em água destilada, sob agitação intensa no vórtex, aguardando sete minutos e em seguida as amostras foram centrifugadas a 1500rpm, por sete minutos à 18°C. Em seguida, os sobrenadantes foram desprezados e foi adicionado 2mL de PBS-P (PBS contendo 0,5% BSA, 0,5% saponina e 0,1% de ázida sódica) e incubados por 10 minutos para permeabilização. Logo após, as amostras foram centrifugadas a 1500rpm, à temperatura ambiente por sete minutos. As células foram ressuspensas suavemente e finalmente as amostras do tubo 3 estavam prontas para adicionar os 3µL do anticorpo anti-CD3 A647.

⁴ DS Diagnóstica

⁵ ADVIA 60®, HEMATOLOGY SYSTEM BAYER

⁶ Panótico®

⁷ FALCON®, Becton Dickinson PA

Marcador	Hospedeiro	Alvo	Fluorocromo	Clone
Anti-CD3	Rato	Humano	A647	UCHT1
Anti-CD21	Rato	Cavalo	FITC	CVS36

Figura 2: Anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de avaliação de linfócitos do sangue periférico de equinos hípidos submetidos à Auto-hemoterapia (AHT).

No momento da marcação, os anticorpos anti-CD3 (A647) e anti-CD21 (FITC) foram adicionados em cada tubo e foram incubados por 30 minutos sob abrigo da luz em temperatura ambiente.

Posteriormente à incubação, nos tubos 1 e 2 foi acrescido 2mL de solução de lise previamente diluída dez vezes em água destilada, sob intensa agitação em vórtex e no tubo 3 foram adicionados 2mL de PBS (0,15m, PH 7.2) sob agitação suave em vórtex. Após cinco minutos de incubação, as amostras foram centrifugadas a 1500rpm, por sete minutos à 18°C. Após descartar o sobrenadante, em todos os tubos foram adicionados 2mL de PBS e novamente centrifugados a 1500rpm, por sete minutos à 18°C. Finalmente, o sobrenadante foi desprezado, as células ressuspensas suavemente em vórtex e fixadas com 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). Logo em seguida, os tubos foram levados para aquisição dos dados empregando o citômetro de fluxo⁸ e um total de 30.000 eventos foram avaliados (Fig. 3). Em todos os experimentos, foram analisados para cada amostra os controles (tubo 1 “Branco”) das reações, que são importantes para avaliação da qualidade do perfil celular e detecções de eventual ocorrência de fluorescências inespecíficas.

⁸ FACSCalibur, Becton Dickson, BD, E.U.A.

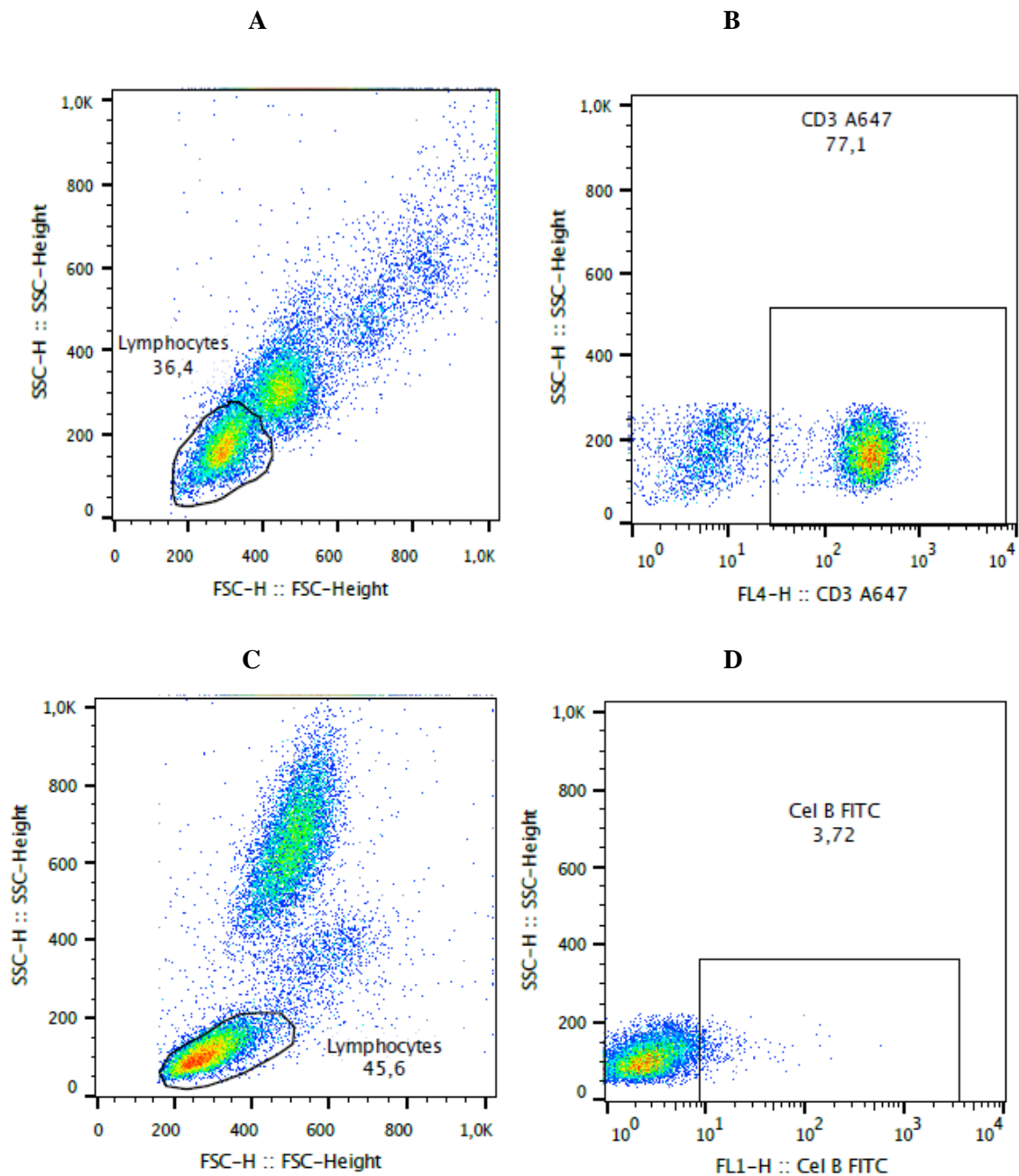


Figura 3: Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de linfócitos T CD3⁺ e linfócitos B CD21⁺ no sangue periférico de equinos hígidos submetidos à Auto-Hemoterapia. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para seleção da população celular de interesse – R1 (linfócitos). (B) Gráfico de distribuição pontual CD3/A647 versus SSC contendo as células selecionadas da região R1, empregado para quantificar o percentual de linfócitos T CD3⁺. (C) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para seleção da população celular de interesse – R1 (linfócitos). (D) Gráfico de distribuição pontual

Células B/FITC versus SSC contendo as células selecionadas da região R1, empregado para quantificar o percentual de linfócitos B CD21⁺.

3.7.1. Avaliação do perfil de expressão de citocinas intracelulares em linfócitos

Inicialmente, após a contagem do valor global de leucócitos pelos hemogramas, foram calculados os ajustes necessários para obtenção de preparações celulares com 5×10^6 leucócitos/mL, a partir das amostras coletadas em tubos com heparina sódica.

Após a obtenção das amostras celulares, estas foram transferidas para dois tubos de polipropileno⁹ de 15mL, um para Cultura Controle (CC) e outro para a cultura estimulada (CE). Os tubos CC receberam o volume em sangue (contendo 5×10^6 leucócitos), 10 µL de Brefeldina A (BFA)¹⁰ (1mg/mL) e o volume restante com meio RPMI para completar o volume final total de 1mL. O tubo CE recebeu o volume calculado em sangue, 25 µL de PMA¹⁰, 1 µL de Ionomicina¹⁰, 10 µL de BFA e o volume restante com meio RPMI até completar o volume final total de 1mL.

Após incubação por quatro horas em estufa (5% CO₂, 37°C) foi acrescentado 110 µL da solução de EDTA 20 mM¹⁰. Após 15 minutos, foram adicionados 4mL de solução de lise para eritrócitos, sob agitação intensa em vórtex e a incubação seguiu por mais 10 minutos ao abrigo da luz à temperatura ambiente. Após incubação as amostras foram centrifugadas por 1500rpm, 7 minutos, 18°C, os sobrenadantes foram descartados e as células ressuspensas em vórtex suave. Foram adicionados 3mL de solução permeabilizante PSP-P anteriormente a mais uma incubação por 10 minutos sob abrigo da luz à temperatura ambiente. Após esta etapa as amostras foram centrifugadas a 1500rpm por 7 minutos a 18°C, sobrenadantes descartados e as células foram ressuspensas com 350µL de PBS-P e submetidas à marcação intracelular. Foi empregado em placas de 96 poços em fundo em U e os anticorpos monoclonais anti-citocinas humanas e bovinas conjugadas com Ficoeritrina (Fig. 4). Foi adicionado 50 µL da suspensão celular em cada poço, o qual já continha 10µL de anticorpo anti-citocina previamente diluído dez vezes em PBS-P.

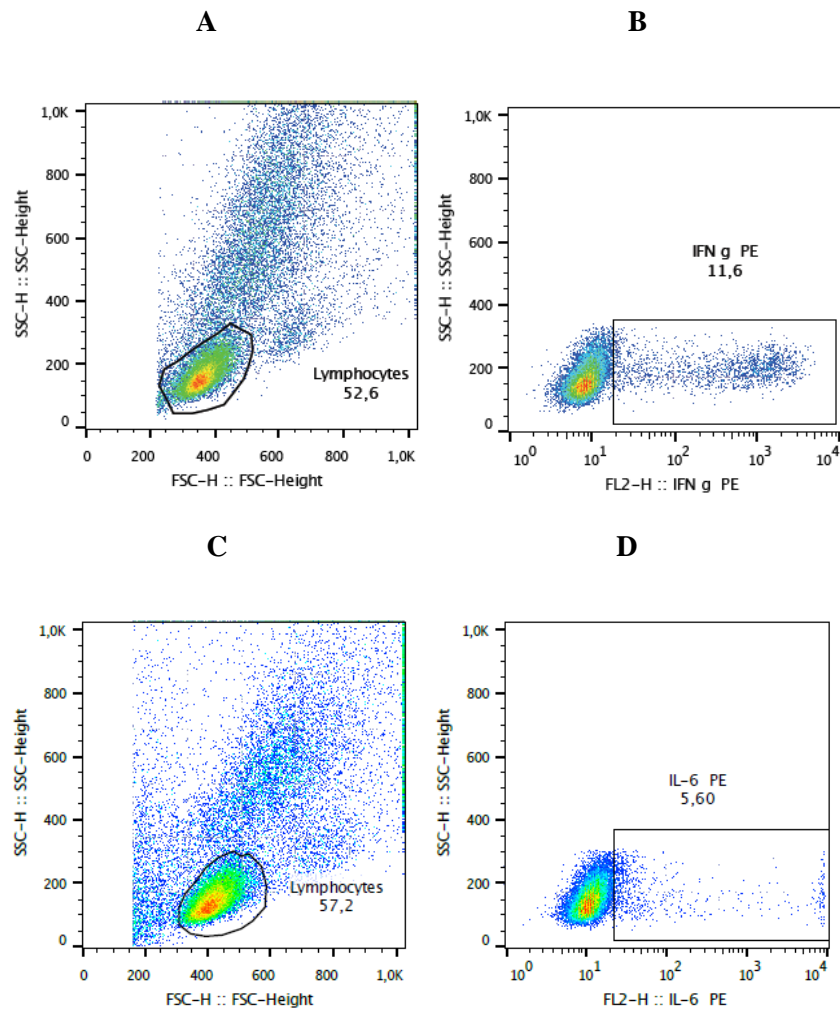
Após a transferência para a placa e incubação por 30 minutos em temperatura ambiente, sob abrigo da luz, foram adicionados 150µL de PBS-P homogêneos levemente em vórtex. As amostras foram centrifugadas com 1500rpm, por sete minutos à 18°C, os sobrenadantes descartados e as células ressuspensas e levemente agitadas em vórtex. Logo após, foram adicionados 200µL de PBS-W (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 (BSA) e 0,1% de azida sódica) gelado, células homogêneas levemente em vórtex antes de serem centrifugadas a 1500rpm, por sete minutos à 18°C. Os sobrenadantes foram desprezados e finalmente foram adicionados 200µL de solução fixadora para citometria MFF para posterior leitura de 20.000 eventos no citômetro de fluxo (Fig. 5 e 6).

⁹ Falcon®, Becton Dickinson

¹⁰ Sigma, E.U.A.

Marcador	Hospedeiro	Clone	Fluorocromo	Alvo
Anti-IFN- γ	Camundongo	CC302	PE	Bovino
Anti IL-6	Rato	MQ2-13A5	PE	Humano
Anti IL-8	Mouse	G265-8	PE	Humano
Anti-IL-4	Camundongo	CC03	PE	Bovino
Anti-IL-10	Rato	JES316T3	PE	Humano

Figura 4: Pannel de anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de avaliação do perfil de expressão de citocinas intracelulares em linfócitos de equinos.



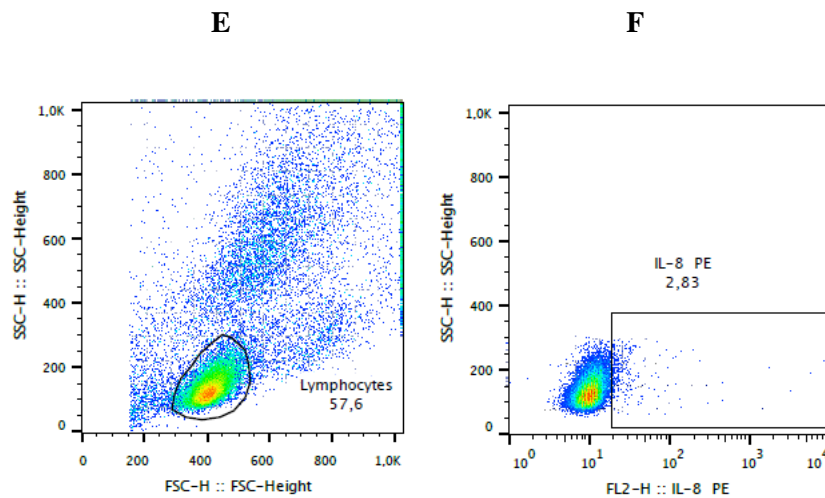


Figura 5: Sequência de procedimentos para quantificar o percentual de linfócitos T/IFN- γ^+ , linfócitos T/IL-6 $^+$ e linfócitos T/IL-8 $^+$ na cultura do sangue total de equinos submetidos à Auto-hemoterapia. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC *versus* SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse. (B) Gráfico de distribuição pontual IFN- γ PE/FL2 *versus* SSC contendo as células na região selecionada, empregado para quantificar o percentual de linfócitos T/IFN- γ^+ em cultura estimulada com PMA. (C) Gráfico de distribuição pontual FSC *versus* SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse. (D) Gráfico de distribuição pontual IL-6 PE/FL2 *versus* SSC contendo as células na região selecionada, empregado para quantificar o percentual de linfócitos T/IL-6 $^+$ em cultura estimulada com PMA. (E) Gráfico de distribuição pontual FSC *versus* SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse. (F) Gráfico de distribuição pontual IL-8 PE/FL2 *versus* SSC contendo as células na região selecionada, empregado para quantificar o percentual de linfócitos T/IL-8 $^+$ em cultura estimulada com PMA.

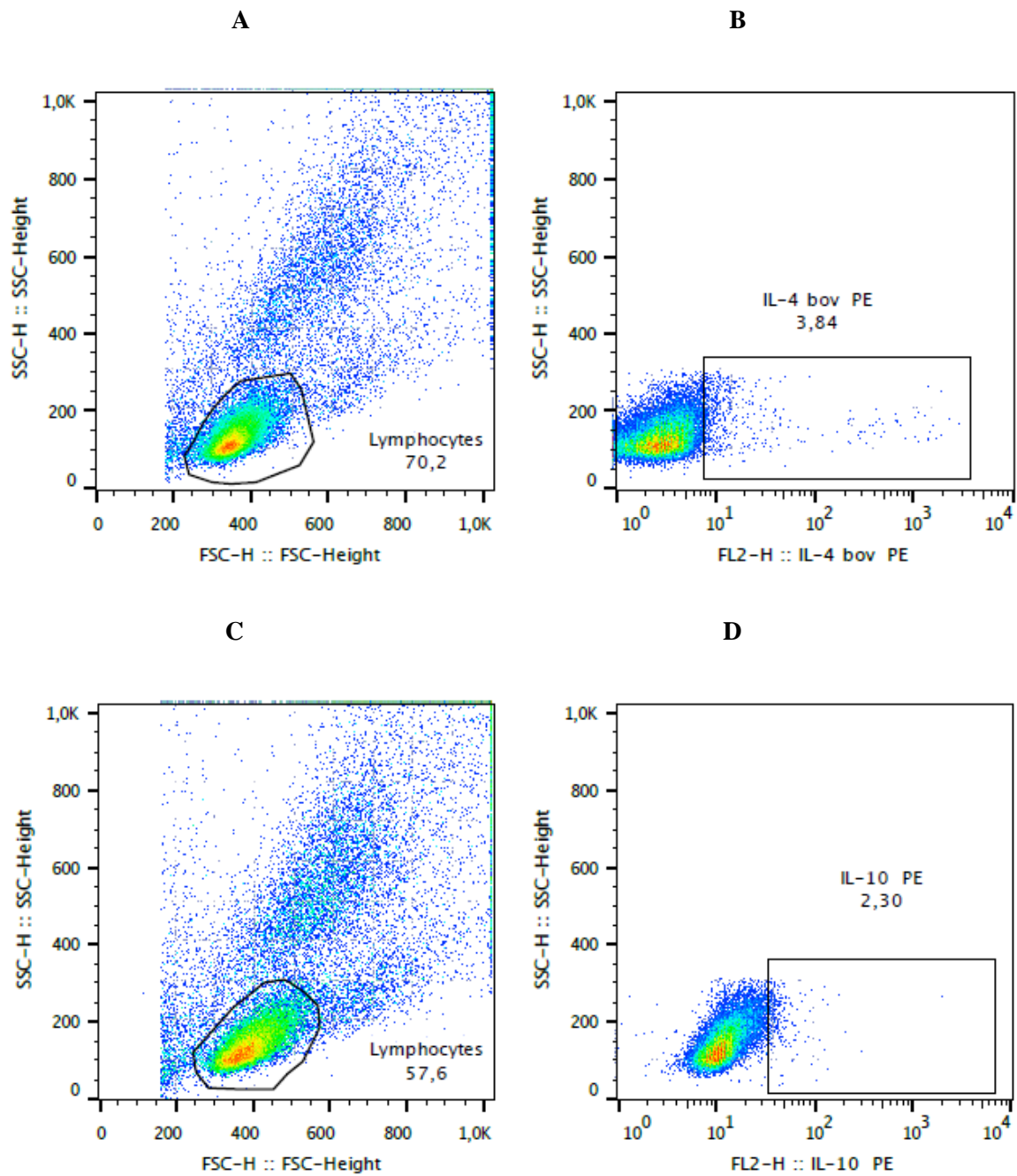


Figura 6: Sequência de procedimentos para quantificar o percentual de linfócitos T/IL-4⁺ e linfócitos T/IL-10⁺ na cultura do sangue total de equinos submetidos à Auto-hemoterapia. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC *versus* SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse. (B) Gráfico de distribuição pontual IL-4 PE/FL2 *versus* SSC contendo as células na região selecionada, empregado para quantificar o percentual de linfócitos T/IL-4⁺ em cultura estimulada com PMA (C)

Gráfico de distribuição pontual FSC *versus* SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse. (D) Gráfico de distribuição pontual IL-10 PE/FL2 *versus* SSC contendo as células na região selecionada, empregado para quantificar o percentual de linfócitos T/IL-10⁺ em cultura estimulada com PMA.

3.8. Ensaios de fagocitose de Zimosan por neutrófilos do sangue periférico

3.8.1. Obtenção do Zimosan

O Zimosan A é obtido da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Para preparação do Zimosan¹¹, 100mg deste foram adicionados em tubo Falcon de 50mL e diluído em 5mL de tampão fosfato salino PBS 0,015M, pH 7,4 - PBS (Sigma, E.U.A) e submetido a aquecimento de 90°C em estufa¹² por 30 minutos. A suspensão foi submetida à centrifugação¹³ a 11 g, 25°C, durante dois minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 20mL de PBS. Posteriormente, a solução foi armazenada em freezer -80°C¹⁴ em alíquotas de 1mL na concentração de 80mg/mL.

3.8.2. Marcação do Zimosan

Para marcação do Zimosan, foi obtida uma alíquota de 300µL contendo 200 x 10⁶ partículas/mL que foi transferida para um flaconete de 2mL com fundo cônico. Foram acrescentados 15µL de AlexaFluór 647 (A647) (1mg/mL) e incubados por 30 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, foi realizada etapa de lavagem com 2mL de PBS e submetido a centrifugação em 5000 rpm (1844 g) durante sete minutos a 18°C. Posteriormente o sobrenadante foi descartado e a alíquota ressuspensionada em vórtex e lavado novamente nas mesmas condições descritas anteriormente por duas vezes. Após a segunda lavagem foi descartado o sobrenadante, as partículas foram ressuspensionadas em PBS de forma a obter uma concentração de 125 x 10⁶ partículas/ml. Uma alíquota de 10ul acrescida de 300ul de PBS foi preparada para avaliação da marcação em citômetro de fluxo a fim de se avaliar a intensidade de fluorescência apresentada pelos Zimosan marcados com A647.

Após definida a concentração, a alíquota foi envolvida em papel alumínio para evitar exposição à luz e acondicionada em geladeira (8°C). Esta alíquota foi utilizada durante todo o experimento com o volume de 20 µL contendo 2,5 x 10⁶ partículas totais (0,5partícula/1 leucócito).

3.8.3. Avaliação da fagocitose de Zimosan por neutrófilos

Inicialmente, após a contagem do valor global de leucócitos pelos hemogramas, foram calculados os ajustes necessários para obtenção de preparações celulares com 5 x 10⁶ leucócitos/mL, a partir das amostras coletadas em tubos com heparina sódica.

¹¹ Sigma- Aldrich

¹² Thelco Model 17, Precision Scientific OS, Bufalo,NY,EUA

¹³ Beckman,Model J-6B, EUA

¹⁴ Ultra Low Temperature Freezer, Eppendorf, New Brunswick Scientific, Hauppauge, NY, EUA

Posteriormente, o sangue coletado foi transferido para dois tubos cônicos de polipropileno de 15mL, sendo um tubo controle e um para fagocitose. Nos tubos controle foi adicionado ao volume de sangue RPMI até alcançar o volume total de 1mL. Nos tubos de fagocitose foram adicionados 20 μ L de Zimosan e meio RPMI até alcançar o volume final total de 1mL. Com uma hora de incubação, 10 μ L foram retirados das amostras para realização de lâminas posteriormente coradas pela técnica de Romanovisk (Fig.7). Após incubação por duas horas (37°C e 5% CO₂) as amostras foram centrifugadas a 1500rpm, por sete minutos a 18°C. Depois de retirado o sobrenadante as amostras foram ressuspensas e agitadas levemente em vórtex. Logo após foi realizada a lise, acrescentando 3mL de solução de lise sob agitação em vórtex. Após dez minutos de incubação em temperatura ambiente, as amostras foram novamente centrifugadas a 1500rpm, por sete minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, células ressuspensas em 3mL de PBS e homogenizadas suavemente em vórtex. As amostras foram novamente centrifugadas a 1500rpm, sete minutos em temperatura ambiente e após descartar o sobrenadante, as células foram ressuspensas e agitadas levemente em vórtex e, finalmente, foram adicionados 300 μ L de solução fixadora para citometria – MFF para leitura de 50.000 eventos em citômetro de fluxo (Fig. 8).

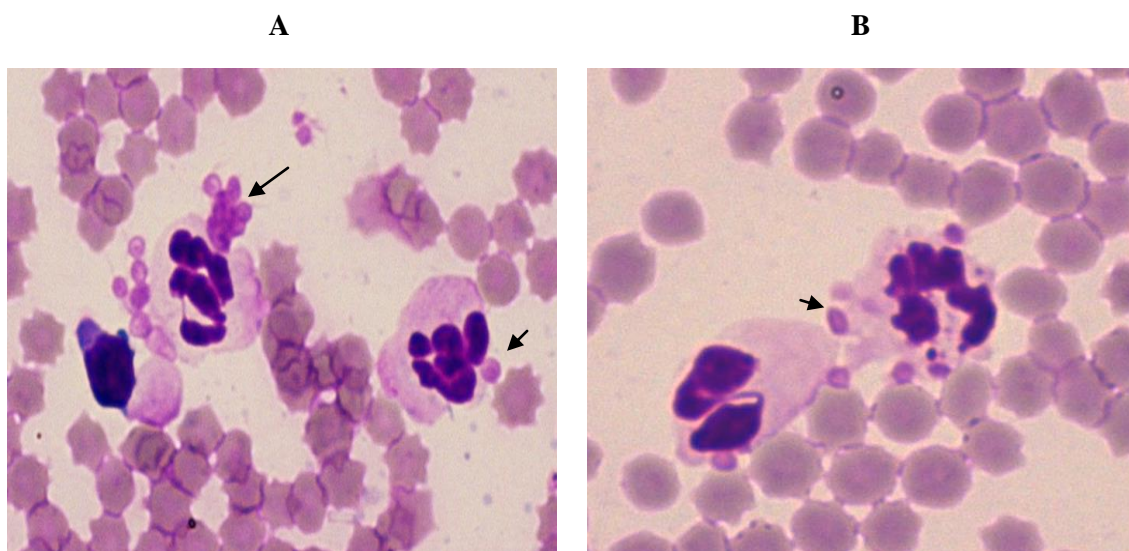


Figura 7: Lâminas de esfregaço sanguíneo em equinos hípidos submetidos à Auto-Hemoterapia após uma hora de cultura de sangue total com Zimosan, este em processo de fagocitose pelos neutrófilos. (A) Aproximação dos neutrófilos e internalização das partículas de Zimosan. (B) Emissão de pseudópodes pelos neutrófilos na captura de partículas de Zimosan. Seta: neutrófilos fagocitando partículas de Zimosan.

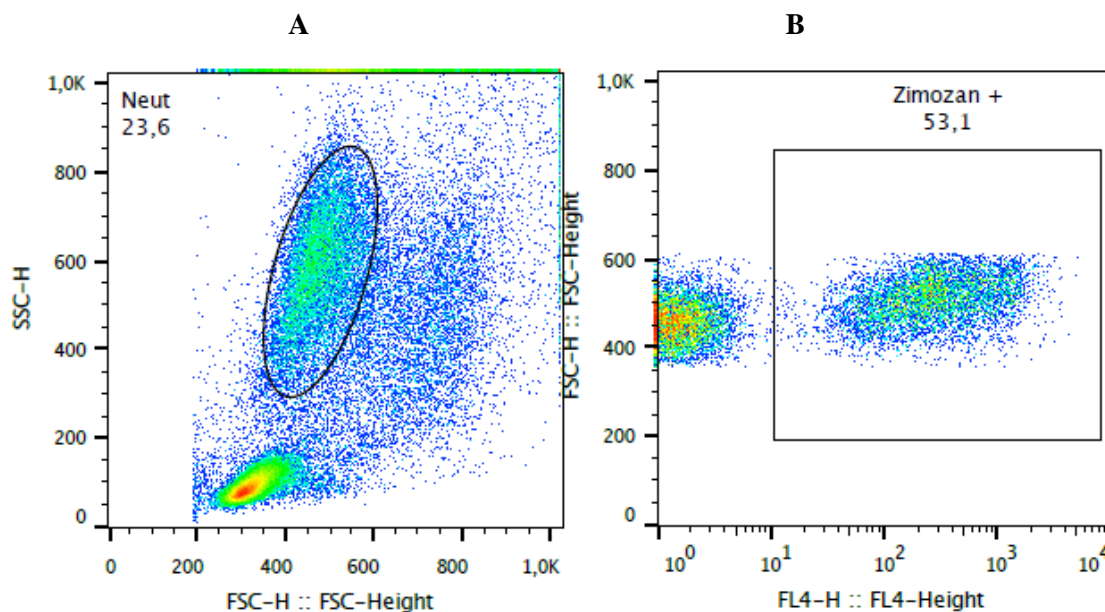


Figura 8: Sequência de procedimentos para quantificar o percentual de neutrófilos/Zimosan+ na cultura de sangue total de equinos hípidos submetidos à Auto-hemoterapia. **(A)** Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população de neutrófilos. **(B)** Gráfico de distribuição pontual Zimosan A647/FL4 versus SSC contendo as células na região selecionada, empregado para quantificar o percentual de Neutrófilos/Zimosan⁺

3.9. Análise Estatística

O estudo foi delineado em blocos ao acaso sendo os blocos (8 animais) e o tempo sendo o fator considerado tratamento (4 tempos). A análise de consistência dos dados foi realizada por meio do software Microsoft Excel®. As avaliações descritivas e testes estatísticos foram realizados por meio do software SAS 9.4 (SAS Institute, 2014). A normalidade e homocedasticidade dos resíduos foram avaliadas. Para as variáveis que seguiram análise paramétrica o teste de F foi realizado. Já as variáveis que seguiram análise não paramétrica, o efeito de tempo foi avaliado por meio do teste de Friedman. As comparações entre tratamentos para as variáveis que apresentaram efeito significativo de tempo foram realizadas por meio do teste de Tukey ou Wilcoxon, para variáveis paramétricas e não paramétricas, respectivamente. O erro tipo I máximo considerado para significância estatística foi igual a 5%.

4. RESULTADOS

4. 1. Parâmetros clínicos dos equinos submetidos à AHT

Os animais apresentaram peso médio ($300,00 \pm 51,53$ kg), em bom estado geral e condição corporal. Não se observou aumento de volume, sensibilidade à palpação, calor, crepitação ou edema, nos pontos de aplicação em nenhum dos animais durante a realização do experimento.

Os valores médios dos índices paramétricos estudados estão descritos na Tabela 1. Não foram observadas alterações ($p > 0,05$) nos valores médios da frequência respiratória, do tempo de preenchimento capilar (TPC) e da temperatura retal, nos diferentes tempos pós-AHT, quando comparados ao T0. Os animais apresentaram $TPC \leq 2$ segundos em todas as avaliações, estando dentro do padrão referencial para a espécie equina (Speirs, 1997).

Tabela 1: Valores médios ($\bar{x} \pm s$) dos índices paramétricos, de acordo com o tempo, em equinos submetidos à auto-hemoterapia (AHT)

Índice paramétrico	AHT			
	T0	T1	T2	T3
Batimento cardíaco (bpm)	43.13 (± 6.0)	39.0^{ad} (± 4.4)	39.73^{ad} (± 3.7)	42.6 (± 5.1)
Frequência respiratória (mpm)	26.5 (± 7.4)	25.63 (± 6.8)	24.8 (± 5.6)	26.26 (± 5.9)
Tempo de preenchimento capilar (TPC)	≤ 2	≤ 2	≤ 2	≤ 2
Temperatura Retal ($^{\circ}$ C)	37.79 (± 0.3)	37.49 (± 0.5)	37.38 (± 0.4)	37.47 (± 0.3)

Médias \pm desvio padrão dos parâmetros clínicos dos cavalos. T0 para encaminhar a análise antes da Auto-hemoterapia (AHT) e T1, T2, T3 realizada três dias após a primeira, segunda e terceira seção do AHT; a, d representam que os valores diferiram ($p < 0,05$) para T0 e T3, respectivamente. Valores de referência: Batimento cardíaco – 28 a 40 bpm; frequência respiratória - 8 a 20 mpm; Tempo de preenchimento capilar - até 2 segundos; Temperatura retal – 37 a 38 $^{\circ}$ C (Speirs, 1997).

A frequência respiratória média foi superior ao padrão de referência para a espécie (6 a 20 movimentos por minuto). Apesar disto, não foram observadas diferenças ($p>0,05$) entre os tempos.

Avaliou-se a frequência cardíaca (bpm), auscultação cardíaca e pulso digital. Durante todos os tempos de avaliação, os animais apresentaram frequência cardíaca próxima ao limite superior do intervalo de referência (28 a 40 bpm). Entretanto, nos tempos T0 e T3 as médias foram superiores ($p<0,05$) às dos tempos T1 e T2. Apesar disto, nenhuma alteração na auscultação cardíaca foi observada em qualquer dos equinos durante os períodos de auscultação cardíaca. Em relação ao exame do pulso, observou-se em todos os animais um pulso amplo e cheio e com frequência semelhante à frequência cardíaca. Observou-se, ainda, ausência do pulso digital patológico, demonstrando saúde dos cascos e adequada circulação periférica.

As mucosas se apresentaram normocoradas (rósea clara) e úmidas durante o período experimental. Durante o exame e palpação dos linfonodos (submandibular, retrofaríngeo, parotídeo, cervical superficial e subilíaco) não foram observadas alterações, tais como reatividade, sensibilidade, aumento de volume ou de temperatura.

Em relação à auscultação respiratória, nenhum ruído respiratório anormal foi observado nos sítios de auscultação laringo-traqueal, tráqueo-brônquico e bronco-bronquiolar. A auscultação abdominal também não apresentou alteração nos indivíduos avaliados durante todo o experimento. Neste período, os animais apresentaram motilidade normal em qualidade e frequência nos quatro quadrantes de avaliação demonstrando um quadro geral de normalidade no funcionamento do trato gastrointestinal.

4.2. Perfil bioquímico de enzimas hepáticas, renais e proteinograma de equinos submetidos à AHT

Os resultados referentes à avaliação bioquímica de sangue estão demonstrados na Tabela 2, de acordo com o tempo de avaliação. Os valores de referência dos analitos foram de acordo com a literatura (Kaneko et al., 1997; Latimer, 2003).

Não foram observadas variações ($p>0,05$) entre os tempos na avaliação das médias das enzimas Aspartato Transaminase (AST), Gama Glutamil Transpeptidase (GGT), Fosfatase Alcalina (FA). Os valores médios observados para a AST durante todo o estudo apresentaram-se abaixo dos níveis de referência para equinos (226-366 U/L). Em contrapartida, os valores médios da FA apresentaram-se acima do valor de referência para a espécie (FA – 86-295 U/L). Os valores médios da enzima Alanina aminotransferase (ALT) observados apresentaram um crescimento gradual até o T2, quando apresentou diferença significativa ($p<0,05$), retornando a valores normais no T3.

As concentrações séricas de uréia e creatinina apresentaram variação ($p<0,05$) entre os tempos sem sair do intervalo de referência para a espécie.

Tabela 2. Valores das análises bioquímicas do sangue, de acordo com o tempo, de equinos submetidos à Auto-hemoterapia (AHT)

Análises Bioquímicas	Padrão da Espécie	T0	T1	T2	T3
AST (U/L)	226-366	199.37 (±30.4)	199.37 (±30.4)	199.37 (±30.4)	199.37 (±30.4)
ALT* (U/L)	3-23	26.78 (±12.48)	26.78 (±12.48)	26.78 (±12.48)	26.78 (±12.48)
GGT (U/L)	6-32	30.70 (±3.88)	30.70 (±3.88)	30.70 (±3.88)	30.70 (±3.88)
FA (U/L)	86-295	329.37 (±47.84)	329.37 (±47.84)	329.37 (±47.84)	329.37 (±47.84)
Uréia* (mg/dL)	21,4-51,5	30.04 (±2.84)	30.04 (±2.84)	30.04 (±2.84)	30.04 (±2.84)
Creatinina* (mg/dL)	0,4-2,2	0.95 (±0.09)	0.95 (±0.09)	0.95 (±0.09)	0.95 (±0.09)
PPT* (g/dL)	6-8	6.36 (±0.45)	6.36 (±0.45)	6.36 (±0.45)	6.36 (±0.45)
Albumina (g/dL)	2,4-4,1	3.55 (±0.39)	3.55 (±0.39)	3.55 (±0.39)	3.55 (±0.39)
Globulina* (g/dL)	2,6-4,0	2.80 (±0.61)	2.80 (±0.61)	2.80 (±0.61)	2.80 (±0.61)
Relação A : G	0,6-0,9	1.36 (±0.55)	1.36 (±0.55)	1.36 (±0.55)	1.36 (±0.55)
Fibrinogênio (mg/dL)	0-400	150 (±207)	150 (±207)	150 (±207)	150 (±207)

Médias \pm desvio padrão dos valores da análise bioquímica dos cavalos. T0 para encaminhar a análise antes da Auto-hemoterapia (AHT) e T1, T2, T3 realizada três dias após a primeira, segunda e terceira seção do AAT; a.b.c.d representam que os valores diferiram ($p < 0,05$) para T0, T1, T2 e T3, respectivamente. (AST) aspartato aminotransferase; (ALT) transaminase de glutamato-piruvato; (GGT) gama glutamil transferase; (FA) fosfatase alcalina; (A: G) Albumina: Globulina. Valores de referência (Kaneko et al., 1997; Latimer, 2003)

Os valores médios de proteína total (PPT) e globulina, apesar de apresentarem variações entre os tempos ($p < 0,05$), apresentaram valores dentro do intervalo de referência para a espécie. Por sua vez, as médias obtidas para a albumina e relação albumina:globulina não apresentaram diferença ($p > 0,05$) entre o tempo anterior à AHT (T0) e os tempos pós-AHT (T1, T2, T3). Os valores de albumina encontraram-se dentro do valor de referência para equinos, por sua vez, os valores da relação albumina:globulina apresentaram-se superiores ao valor de referência em todos os tempos.

A concentração plasmática de fibrinogênio apresentou pouca variação ($p > 0,05$) entre os tempos e os valores médios observados se apresentaram dentro dos valores de referência (0-400mg/dL).

4.3. Perfil hematológico dos equinos submetidos à AHT

Os valores médios referentes à avaliação hematológica estão demonstrados na Tabela 3. Os valores de referência adotados estão de acordo com a literatura (Jain, 1993; Meyer et al., 1995).

O número total de hemácias, a concentração de hemoglobina e o volume globular não diferiram entre os tempos ($p > 0,05$). Apesar disto, o valor médio tanto do número de hemácias quanto da concentração de hemoglobina e do volume globular se apresentaram abaixo dos valores de referência para equinos adultos, em todos os tempos estudados. Em relação aos índices hematimétricos, os valores de volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tempos e os valores mantiveram-se dentro do intervalo de referência para equinos.

Os valores médios do número total de leucócitos se apresentaram dentro do valor de referência para a espécie equina e não diferiram entre os tempos ($p > 0,05$). Nos esfregaços sanguíneos, foi avaliada cada população celular e seus resultados foram expressos em valores absolutos (mm^3). Não foi observada diferença ($p > 0,05$) nos valores médios percentuais de linfócitos, neutrófilos segmentados e bastonetes, monócitos e basófilos quando comparado o tempo pré AHT (T0) com os tempos pós AHT (T1, T2 e T3). Além disso, observou-se ao longo do estudo, aumento gradual na população de eosinófilos ($p > 0,05$). Apesar deste incremento, as médias se mantiveram dentro do valor de referência para a espécie.

Durante as avaliações morfológicas, foram observados linfócitos reativos nos tempos T2 e T3 com diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao T0. Não foram observados monócitos ativados em nenhum dos tempos estudados.

Também em relação à contagem das plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) não foi observada diferença significativa entre os tempos. Os valores observados durante todo o estudo apresentavam-se dentro da faixa dos valores de referência da espécie equina (100 - 308 $\times 10^3/\mu\text{L}$).

Tabela 3. Valores das análises hematológicas, de acordo com tempo, de equinos submetidos à Auto-hemoterapia (AHT)

Análises Hematológicas	Padrão da Espécie	T0 ¹	T1 ¹	T2 ¹	T3 ¹
Eritrócitos (x10 ⁶ céls/μL)	6,4 – 10,0	5.47 (±0.52)	5.58 (±0.76)	5.67 (±0.63)	5.77 (±0.57)
Hemoglobina (g/dL)	11 -17	9.18 (±1.84)	9.10 (±1.35)	9.10 (±1.0)	9.76 (±1.34)
Leucócitos (céls./μL)	5.200 –13.900	7.85 (±0.84)	7.60 (±1.62)	7.52 (±1.43)	7.36 (±1.02)
Linfócitos (mm ³)	1.500-7.700	3.831 (±970)	4.030 (±1.207)	3.540 (±817)	3.383 (±630)
Linfócito Reativo* (mm ³)		0.5 (±0.92)	0.25 (±0.70)	2.37^{ab} (±1.59)	2.62^{ab} (±1.68)
Neutrófilos Segmentados (mm ³)	2.200-8.500	3.545 (±614)	3.019 (±735)	3.382 (±1.065)	3.250 (±705)
Bastonetes (mm ³)	0-100	37.5 (±40)	64.2 (±82)	72.8 (±87)	27.5 (±52)
Monócitos (mm ³)	100-1000	302 (±204)	210 (±218)	94^{ab} (±88)	120^{ab} (±83)
Eosinófilos (mm ³)	100-1000	104 (±103)	243 (±119)	280^a (±219)	368^a (±282)
Basófilos (mm ³)	0-290	75 (±104)	26 (±36)	16 (±30)	8 (±23)
Plaquetas (x10 ³ /μL)	100-308	224.50 (±123)	241 (±136)	241.50 (±48)	220.50 (±51)

Média \pm desvio padrão dos valores do exame hematológico dos cavalos. T0 para encaminhar a análise antes da Auto-hemoterapia (AHT) e T1, T2, T3 realizada três dias após a primeira, segunda e terceira sessão da AHT; a.b representam que os valores diferiram ($p < 0,05$) para T0 e T1, respectivamente. Valores de referência (Jain, 1993; Meyer et al., 1995).

4.4. Perfil de fenótipos de linfócitos T(CD3⁺) e B(CD21⁺) no sangue periférico de equinos submetidos à AHT

A frequência média da população de linfócitos T(CD3⁺), no sangue periférico de equinos submetidos à AHT, pode ser visualizada na Figura 9A. Foi observado aumento ($p < 0,05$) na população dos linfócitos T (CD3⁺) nos tempos T1(73,63 \pm 4,89) e T2 (74,67 \pm 5,30) quando comparados aos valores obtidos dos animais anteriormente à AHT - T0 (68,64 \pm 3,60) ($p < 0,05$). Por outro lado, o tempo T3 (73,24 \pm 5,85) quando comparado a T0, não apresentou diferença ($p > 0,05$).

A frequência média da população de linfócitos B(CD21⁺) no sangue periférico de equinos hígidos submetidos à AHT pode ser visualizada na Figura 9B. Houve diminuição ($p < 0,05$) da população dos linfócitos B(CD21⁺) nos tempos T1 (3,22 \pm 0,53), T2 (2,35 \pm 0,65) e T3 (2,90 \pm 0,99) quando comparados aos valores obtidos dos animais anteriormente à AHT T0 (3,9 \pm 0,77) ($p < 0,05$).

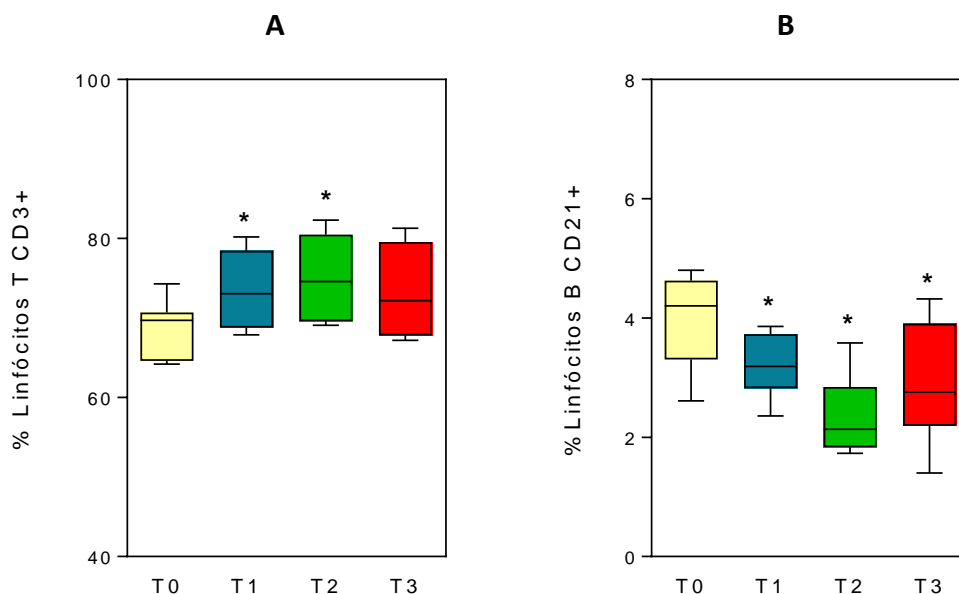


Figura 9. Percentual de linfócitos T (CD3⁺) e B (CD21⁺) no sangue periférico de equinos submetidos à Auto-hemoterapia. (A) Percentual da população de linfócitos T(CD3⁺) nos tempos T0, T1, T2 e T3. (B) Percentual da população de linfócitos B(CD21⁺) nos tempos T0, T1, T2 e T3. Os resultados estão expressos sob a forma de percentual médio \pm desvio padrão da

população de linfócitos T CD3⁺ e linfócitos B CD21⁺. Diferenças (p<0,05) estão expressas sob forma de (*) em relação ao T0.

4.5. Perfil da razão da frequência de linfócitos T(CD3⁺) e B(CD21⁺) no sangue periférico de equinos submetidos à AHT

Com o objetivo de se investigar o balanço do envolvimento da resposta imune adaptativa celular e humoral durante o tratamento com a AHT, calculou-se a razão entre os valores percentuais de linfócitos T e linfócitos B (Figura 10). Observou-se um aumento (p<0,05) nos tempos T1 (33,43±9,69) e T2 (24,8±7,35) em relação aos valores basais obtidos em T0 (18,11±3,51). Esta diferença não foi observada (p>0,05) em T3 (23,56±5,05).

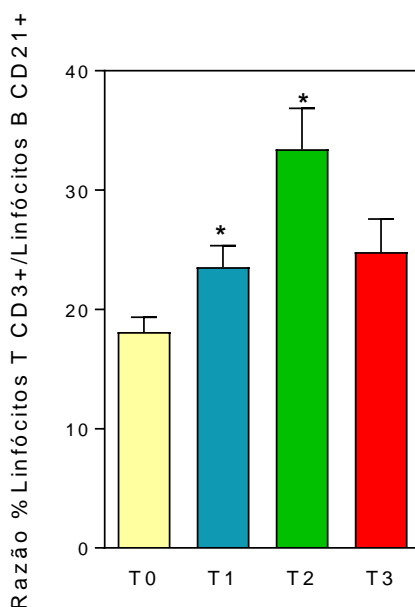


Figura 10. Razão entre Linfócitos T CD3⁺/Linfócitos B CD21⁺ no sangue periférico dos equinos submetidos à Auto-hemoterapia nos tempos T0, T1, T2 e T3. Os resultados estão expressos sob a forma de percentual médio ± desvio padrão da razão entre linfócito T CD3⁺/Linfócitos B CD21⁺. Diferenças significativas (p<0,05) estão expressas sob forma de (*) em relação a T0.

4.6. Perfil da expressão de citocinas intracelulares (IFN- γ , IL-6, IL-8, IL-4, IL-10) em linfócitos do sangue periférico de equinos submetidos à AHT

O perfil de expressão das citocinas intracelulares dos linfócitos foi avaliado de acordo com seu perfil pró (Figura 11) ou anti-inflamatório (Figura 12)

4.6.1. Perfil da expressão de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , IL-6, IL-8)

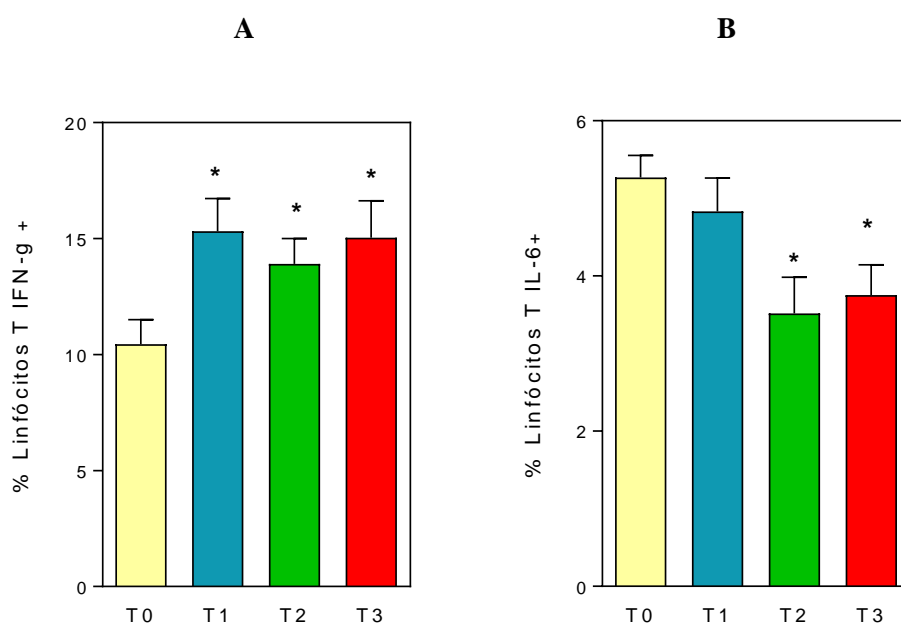
Verificou-se aumento médio ($p < 0,05$) na expressão da citocina IFN- γ em todos os tempos (T1 - $15,31 \pm 3,75$; T2 - $13,91 \pm 2,89$; T3 - $15,04 \pm 4,19$) em relação aos valores basais observados em T0 ($10,45 \pm 2,79$) (Figura 11A)

Em relação à IL-6, os valores médios demonstraram diminuição ($p < 0,05$) da expressão nos tempos T2 ($3,52 \pm 1,31$) e T3 ($3,75 \pm 1,11$) em relação ao T0 ($5,27 \pm 0,80$). (Figura 11B). Já a IL-8 apresentou uma diminuição ($p < 0,05$) em sua expressão em T2 ($2,31 \pm 0,72$) quando comparada ao T0 ($3,61 \pm 0,82$), enquanto T1 ($2,90 \pm 0,74$) e T3 ($3,06 \pm 0,68$) não diferiam ($p > 0,05$) em relação a T0 (Figura 11C).

4.6.2. Perfil da expressão de citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10)

O valor percentual médio da expressão da citocina IL-4 não apresentou variação em relação ao valor basal (T0 - $3,18 \pm 0,66$) em nenhum dos tempos avaliados (T1 - $3,45 \pm 0,84$; T2 - $3,02 \pm 0,59$ e T3 - $3,27 \pm 2,17$) (Figura 12A).

A expressão de IL-10 foi maior ($p < 0,05$) nos tempos T2 ($2,37 \pm 0,34$) e T3 ($2,82 \pm 0,65$) quando comparados ao T0 ($1,84 \pm 0,45$). Já em T1 ($1,69 \pm 0,34$) não foi observada variação de sua expressão, em relação ao T0 (Figura 12B).



C

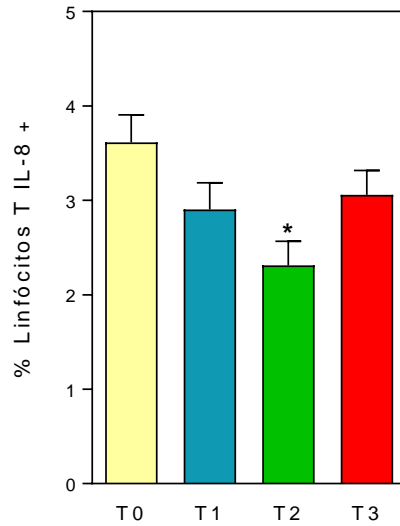
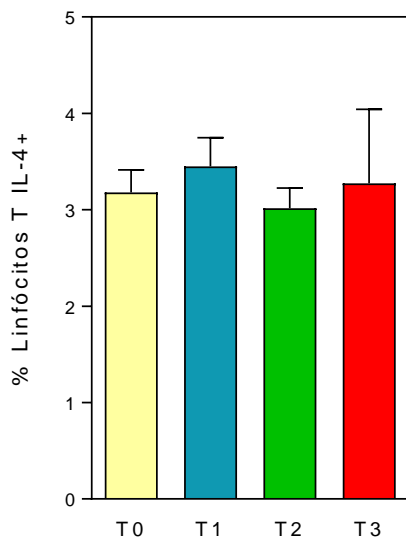


Figura 11. Perfil de expressão de citocinas pró-inflamatórias por linfócitos T do sangue periférico de equinos submetidos à Auto-hemoterapia. (A) Perfil da expressão da citocina IFN- γ produzida por linfócitos T. (B) Perfil da expressão da citocina IL-6 produzida por linfócitos T. (C) Perfil da expressão da citocina IL-8 produzida por linfócitos T. Os resultados estão expressos sob a forma de percentual médio \pm desvio padrão de células T. Diferenças ($p < 0,05$) estão expressas sob forma de (*) em relação ao T0.

A



B

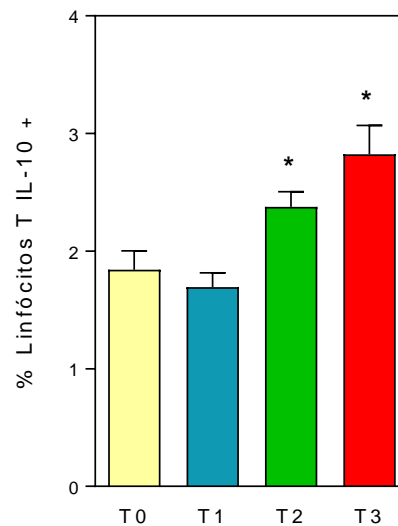


Figura 12. Perfil de expressão de citocinas anti-inflamatórias por linfócitos T do sangue periférico de equinos submetidos à Auto-hemoterapia. **(A)** Perfil da expressão da citocina IL-4 produzida por linfócitos T. **(B)** Perfil da expressão da citocina IL-10 produzida por linfócitos T. Os resultados estão expressos sob a forma de percentual médio \pm desvio padrão. Diferenças ($p < 0,05$) estão expressas sob forma de (*) em relação ao T0.

Ainda em relação ao perfil de citocinas sintetizadas pelos linfócitos T após a AHT, foi realizado um resumo do comportamento desta produção de acordo com os tempos para cada animal como observado nas figuras 13 A, 13B e 13C.

Figura 13. Análise do comportamento da produção de citocinas intracitoplasmáticas em linfócitos do sangue periférico de cavalos submetidos à Auto-hemoterapia (AHT) após as células serem cultivadas *in vitro* sob estimulação.

Fig. 13 A) Gráficos de dispersão representativos utilizados para o estabelecimento das arestas globais de corte do índice (citocina de linfócitos + cultura estimulada / controle) de cada citocina (IL-10, IL-4, IL-6, IL-8 e IFN- γ) utilizadas para segregar os cavalos que apresentavam níveis de citocinas Baixo (\square) ou Alto (\blacksquare).

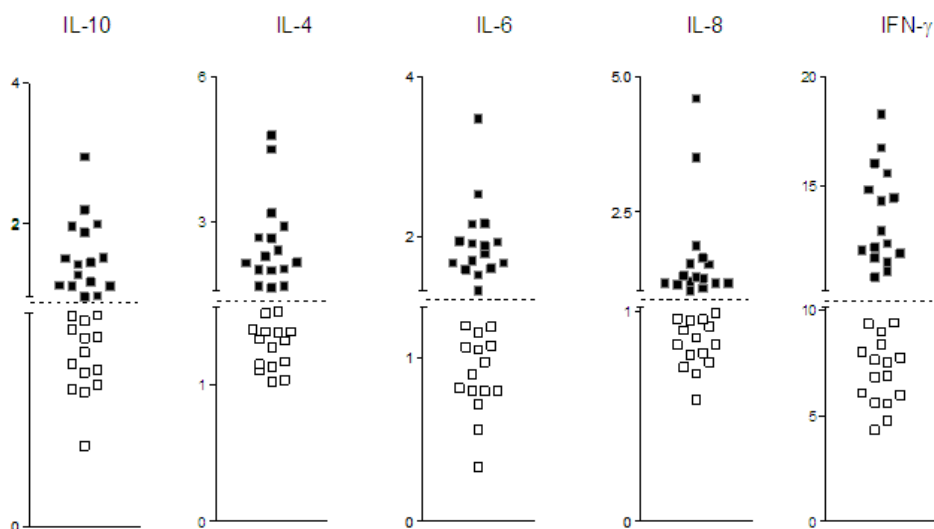


Fig.13 B) Diagramas em escala preta usados para compilar a frequência (%) da citocina de maior produção.

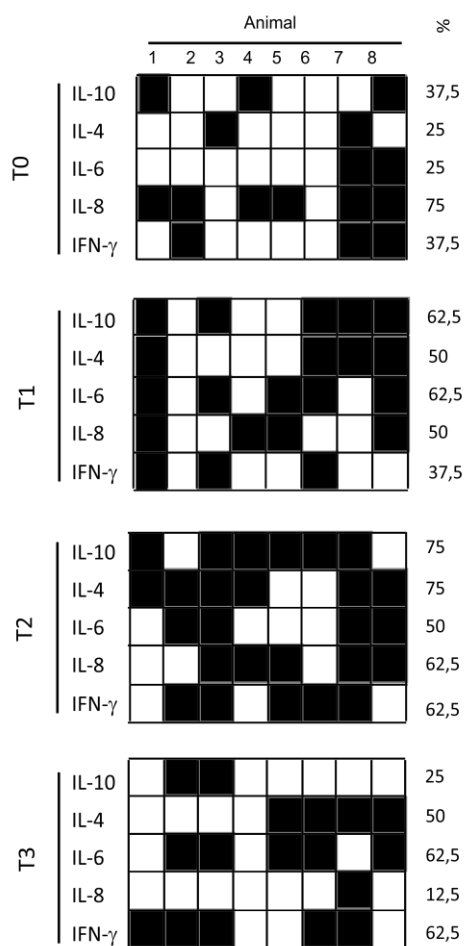
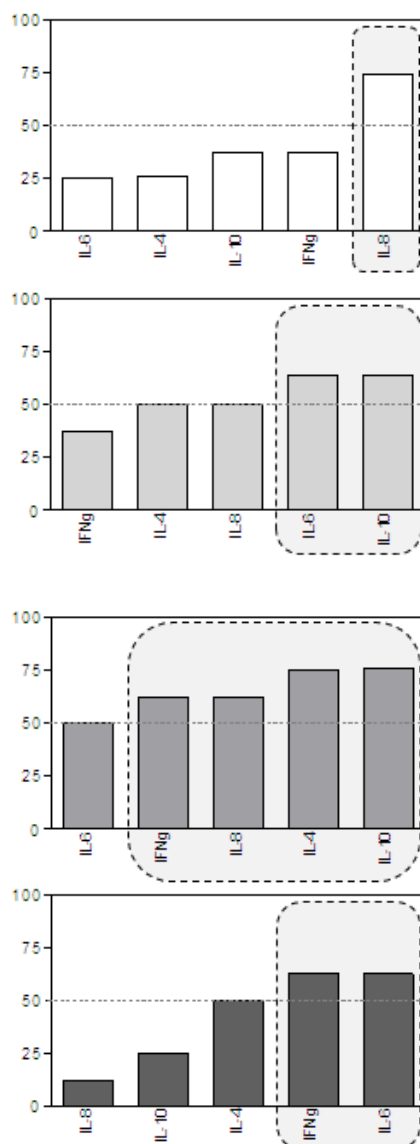


Fig. 13 C) O gráfico de barras mostra o índice ascendente de citocinas e foi montado para cada tempo pré (T0) e após a AHT (T1, T2 e T3). As frequências de alta produção foram consideradas relevantes quando estas se mostraram acima de 50%. Essa informação foi destacada pelo quadro cinza com borda pontilhada. T0 se refere ao tempo de análise anterior à AHT enquanto T1 T2 e T3 referem-se às análises realizadas três dias após a primeira, segunda e terceira seção do AHT, respectivamente.



4.7. Atividade fagocítica anti-Zimosan em neutrófilos do sangue periférico de equinos submetidos à AHT

Os resultados referentes à atividade fagocítica anti-Zimosan em neutrófilos do sangue periférico de equinos submetidos à AHT, foram expressos em percentual (%) de células (Zimosan⁺/A647) considerando a atividade fagocítica dos neutrófilos em cada tempo (Figura 14). Não foram observadas diferenças ($p>0,05$) na atividade fagocítica quando comparada aos valores basais T0 (47,36±8,0). Os percentuais médios nos tempos T1, T2 e T3 foram, respectivamente, 45,24±8,44, 46,61±6,91 e 52,23±6,68.

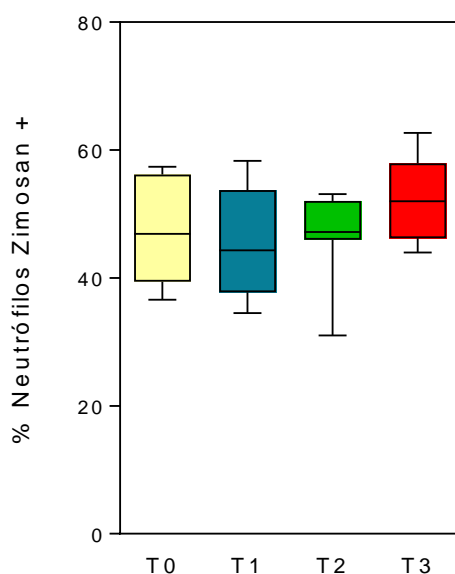


Figura 14. Atividade fagocítica anti-Zimosan em neutrófilos do sangue periférico de equinos hígidos submetidos à Auto-hemoterapia. Os resultados estão expressos sob a forma de percentual médio ± desvio padrão de neutrófilos Zimosan+ ($p>0,05$).

5. DISCUSSÃO

Uma questão relevante sobre a aplicação da AHT é a possibilidade de causar uma reação tóxica, causando desconforto ao paciente. Com o objetivo de elucidar esta questão, foi realizado exame clínico completo nos animais baseado na indicação de Speirs (1997). De um modo geral, aplicações de substâncias irritativas ou de maneira inadequada, podem trazer sinais de inflamação local e/ou sistêmicas como dor, calor e rubor nos locais e febre. Considerando as alterações nos parâmetros clínicos ou possíveis “injúrias” causadas a pacientes humanos após o emprego da AHT, Moraes e Ota (2017) descreveram que ao entrevistar pacientes submetidos à AHT, apenas 7% relataram o aparecimento de hematoma e dor no local de aplicação. Os pacientes que realizaram a técnica pela primeira vez relataram não terem sentido mudanças. Corroborando com estes e com o presente estudo, Lopes (2016) não observou alteração local após aplicação de AHT em um equino. O autor utilizou exames de termografia e a

ultrassonografia no local da aplicação e não observou qualquer variação de temperatura ou ecogenicidade, digna de lesão muscular. A importância do exame físico e acompanhamento dos animais, diariamente, permitiram que uma avaliação dos locais de aplicação da AHT e da saúde geral dos animais fosse realizada de forma acurada.

A respeito do volume de sangue, tempo de tratamento e via de aplicação a serem usados na AHT, não há consenso nem na medicina nem na veterinária. O volume de sangue e o local de aplicação (subcutâneo, intramuscular ou intravenoso) não são pré-determinados. Mettenleiter (1936) citou cinco diferentes formas de realizar o procedimento e confirmou, no paciente humano, o uso de até 40 mL de sangue total, por via intramuscular sem sinais de desconforto. Em relação ao volume de aplicação, em pacientes humanos, Moura (2008) e Trevisanil (2015) utilizaram valores entre 10 e 20mL. Em equinos, Lopes (2016) utilizou 20 mL de sangue total em paciente de 500kg. O volume de sangue utilizado de acordo com peso do paciente, vai ao encontro do sugerido por Borges et al. (2014) e Rodrigues et al. (2016). Baseados na literatura existente e práticas de profissionais, este estudo sugeriu o volume de 20mL para cada 100kg de peso vivo devido ao protocolo comum em pacientes humanos com volume de aplicação de 10mL para um paciente com peso médio de 50kg. O volume médio de sangue total, equivalente a $59,75 \pm 10,95$ mL, em animais com peso médio de $300,1 \pm 50,53$ kg não provocou alterações clínicas ou inflamatórias locais. Os sítios de aplicação selecionados: músculos serrátil ventral (musculatura do pescoço lados direito e esquerdo) e músculos semitendíneo e semimembranoso (musculatura medial da coxa lados direito e esquerdo), se mostraram adequados para o emprego da técnica.

Em relação ao uso e indicação da AHT nas enfermidades, não há consenso em qual tipo de doenças ela é recomendada. Diante disto, há poucos relatos sobre o uso da AHT em paciente hígidos, com o objetivo de se observar a ação da AHT e seus reflexos nos exames hematológicos, bioquímicos e da resposta imune.

Na prática da clínica equina, devido à ampla diversidade de referências dos exames laboratoriais Benesi et al. (2009) concluíram ao analisar as enzimas AST, FA e GGT de potras da raça Brasileiro de Hipismo que todas elas sofreram variações influenciadas pelo fator etário. Desta forma, sugere-se que a variação dos valores médios em relação aos de referência, encontrados neste estudo possam ter sido influenciados pela raça e idade dos indivíduos estudados. O valor basal (T0), utilizado para as comparações, é de fundamental importância no estudo comparativo após o uso da AHT.

Em relação às variações observadas nas avaliações bioquímicas, diante dos valores que apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) como uréia e creatinina, proteína total e globulina, estes achados não apresentam relevância clínica uma vez que os valores mantiveram-se dentro do intervalo de referência da espécie associado à ausência de qualquer alteração clínica destes animais, comprovado pelo acompanhamento clínico diário. Desta maneira, a variação significativa não mostrou relevância na interpretação clínica em relação aos analitos citados.

A AST está presente nas células do fígado e musculares, logo seu uso é indicador de danos nestes tecidos. Sugere-se que a normalidade desta isoenzima pré-AHT e entre os tempos de tratamento é mais um indicativo que a terapia não ocasiona danos no local da aplicação, em acordo com Lopes (2016). Por sua vez, a isoenzima ALT tem pouco valor diagnóstico em equinos, uma vez, que esta é encontrada em concentrações muito baixas no fígado dessas espécies. Sugere-se que o aumento na concentração da ALT no T2 deve-se à possível variação individual em algum animal neste período, porém também não trouxe relevância clínica uma

vez que alterações em níveis hepáticos possuem associação de outras enzimas como AST, GGT e FA, o que não ocorreu. Adicionalmente, o valor apresentou retorno à normalidade no T3, mais um fator que demonstra ausência de lesão hepática nos animais sob AHT.

Da mesma maneira, em relação aos resultados do hemograma, Moraes e Ota (2017), ao realizarem a análise hematológica de pacientes após AHT, não observaram diferenças significativas no decorrer dos tempos de análise: pré-AHT (T1), três dias após a AHT (T2) e sete dias após a aplicação (T3). Em acordo com os achados desse estudo, não houve diferença significativa entre os tempos ao avaliar eritrócitos, hemoglobina e volume globular. Lopes (2016) também não observou diferenças no hemograma completo de um equino ao comparar os efeitos da aplicação da AHT e da aplicação de Soro Fisiológico. Por sua vez, Fontenelle (2008) afirmou que a auto-hemotransfusão é utilizada em atletas para aumentar o transporte de oxigênio para o corpo. Tal aumento é relacionado à elevação da taxa do volume globular (VG) e volume corpuscular médio (VCM), uma vez que o tamanho da hemácia é um fator determinante para o carreamento de oxigênio. No presente estudo, a variação dos valores de VG e VCM foram mínimas e a realização da técnica não foi a mesma não obtendo assim correlação ao estudo citado.

Ao coletar conteúdo vesicular inflamatório de pacientes e realizar análises, Teixeira (1940) observou aumento de 5% para 22% após oito horas da aplicação de AHT na população de monócitos, com decorrente diminuição na população para 20% após 72 horas e retorno aos 5% após sete dias. Outro teste realizado pelo autor foi determinar o índice bactericida em tumores notando-se após a AHT um alcance máximo do índice bactericida e de monócitos nas oito primeiras horas, provando a estimulação de defesa do SMF. Neste estudo, foi observada diminuição no percentual médio dos monócitos ao longo dos tempos, em acordo com Muller e Petterson (1926), que afirmam haver migração dessas células para os órgãos e tecidos, o que entra em acordo com Teixeira (1940) que avaliou o infiltrado de monócitos da lesão local e não da população total circulatória. Como observado, a avaliação da ação da AHT em Teixeira (1940) foi local enquanto, no presente estudo, na circulação dos animais o que implicará diferenças de interpretação. Para haver incremento celular no tecido há necessidade de diminuição de sua circulação periférica, desta maneira, sugere-se que os estudos podem apresentar resultados complementares.

Em relação aos resultados no aumento da população de eosinófilos, este incremento não foi considerado como eosinofilia por permanecer dentro dos valores de referência da espécie. Por outro lado, uma vez que os animais estavam devidamente vermifugados e a presença de eosinófilos ser relacionada à presença de parasitos, reações de hipersensibilidade e alergia em equinos (Latimer e Meyer, 1992; Lopes e Cunha, 2002), de acordo com Gomes et al. (2014) sugere-se que o achado pode ser decorrente ao estímulo da AHT. E desta maneira, devido às características dos eosinófilos de células efetoras na fase terminal de processos alérgicos (Tizard, 2008b), em acordo com Lopes (2016), sugere-se que a AHT traga benefícios a pacientes em processos alérgicos. Os eosinófilos são apropriados para destruir grandes parasitas extracelulares cobertos com imunoglobulina E (IgE) e são produtores de citocinas do tipo Th2 inibindo a resposta Th1. Como observado neste estudo, o perfil de citocinas Th2 nos tempos T2 e T3 pode ser devido à presença expressiva desta célula.

Em relação aos linfócitos reativos observados nos tempos T2 e T3, estes também foram observados por Lopes (2016) ao observar reatividade dos linfócitos na segunda semana de tratamento e em diferentes tempos de coleta. Este achado foi considerado primordial para despertar o interesse pela reatividade dos linfócitos e sua participação na resposta da AHT uma

vez que linfócitos reativos representam tanto linfócitos T quanto B estimulados (Scott e Stockham, 2011). Segundo Veronesi (2008), o sistema Monocítico Fagocitário tem íntima interdependência dos linfócitos T e B ao influenciarem na sua fisiologia através de citocinas por eles secretadas. As citocinas linfocitárias podem tanto estimular como inibir o SMF. Em relação aos resultados gerados para linfócito B (CD21⁺), estes foram considerados insatisfatórios, uma vez que a resposta observada de linfócitos B nos animais é mais expressiva do que a apresentada pelo marcador nos equinos estudados. De acordo com o protocolo e bula do produto (MOUSE ANTI-HORSE PAN-B CELLS: FITC/BIO-RAD) (Bio Rad, 2018), este é um anticorpo monoclonal IgG presente nos linfócitos do sangue periférico e capaz de reconhecer todas as células B equinas a partir do reconhecimento de antígenos presentes na superfície destas células. A partir destas informações, foi seguido o protocolo proposto pelo fabricante, porém nossos resultados não se apresentaram condizentes com a expressão de linfócitos B esperada nos equinos (17-38%) (Tizard, 2008a). Apesar da indicação para leitura em citômetro de fluxo, as pesquisas do fabricante foram realizadas através do método ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática) o que poderia trazer diferentes interpretações da marcação celular (Schneider, 2010). Desta maneira, poucas conclusões puderam ser definidas na expressão de linfócitos B (CD21⁺) em equinos pós-estímulo da AHT.

Como observado, os monócitos ativados na avaliação estatística apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$). Este fato deve-se à presença de valores diferentes de zero anteriores à Auto-hemoterapia nos indivíduos, valores estes ainda dentro do intervalo normal de monócitos ativados para os equinos. Este fato não foi observado após a AHT, ou seja, todos os valores de monócitos ativados apresentados pelos animais foram iguais a zero nos tempos T1, T2 e T3. Desta forma, sugere-se que a Auto-hemoterapia não influenciou a população de monócitos ativados.

Em relação ao incremento imunológico, a AHT apresenta diferentes resultados na literatura. Silva (2009) observou que, após dois dias da aplicação da AHT em ratos Wistar, o leucograma apresentou diferença em quase duas vezes no quantitativo leucocitário no primeiro dia, o que sugeriu reação imunológica decorrente da AHT. Barbosa Lopes et al. (2017) observaram leucocitose em cães diagnosticados com gastroenterite hemorrágica 48 horas após o tratamento com AHT associada a tratamento sintomático à doença. Por sua vez, Rodrigues et al. (2016) sugeriram que a AHT provoca efeito de diminuição de leucócitos circulantes, e que esse efeito está diretamente relacionado ao volume de sangue aplicado, quanto maior o volume, maior a redução no número de leucócitos. Observaram queda mais acentuada às 48 horas após a AHT. De acordo com Widal (1921) e Muller e Petterson (1926), a diminuição gradativa do número de leucócitos na circulação após a AHT é decorrente da migração dessas células para órgãos e tecidos aumentando sua função. Os resultados observados neste estudo concordam parcialmente aos citados anteriormente uma vez que os monócitos apresentaram diminuição ao longo dos tempos sem trazer alterações significativas no valor de leucócitos totais nos equinos submetidos à AHT. Acredita-se que a não alteração nos valores dos leucócitos pode estar relacionado ao fato de que os animais avaliados não apresentavam qualquer quadro patológico. Por outro lado, Moraes e Ota (2017) também observaram mínimas variações no leucograma no decorrer dos tempos de avaliação. Em contra partida, Trevisanil et al. (2015) observaram aumento no número de monócitos em 90% dos pacientes humanos saudáveis analisados, além do aumento das Imunoglobulinas IgG, IgA e IgE. Estes aumentos descritos por Trevisanil et al. (2015) não foram observados neste estudo. Isto se dá ao fato de que as características de resposta leucocitária são diferentes entre animais e humanos. Apesar de não terem sido

diferenciadas as subclasses das imunoglobinas, foi verificado, de forma geral, que não houve variação no valor total das globulinas ao longo dos tempos.

Ao definir este perfil de resposta pode-se orientar o uso da AHT para determinadas enfermidades, ou seja, aquelas que necessitam de um padrão de resposta de linfócitos Th1 e produção de IFN- γ . Sabe-se que as citocinas influenciam a natureza de resposta do linfócito T auxiliar. Baseando nestas informações e nos resultados obtidos, sugere-se que a resposta gerada pela AHT seja uma resposta inicial de perfil inflamatório devido à intensidade de expressão do IFN- γ em comparação às demais citocinas estudadas. Em um segundo momento, ela tende a ser modulada, pois pôde ser observado um aumento da IL-10 ao decorrer das avaliações levando a um perfil regulador. Desta maneira, presume-se que a AHT possa de alguma forma conduzir um padrão de resposta imune celular, acarretando a ativação de macrófagos e gerando imunidade contra microorganismos intracelulares, como protozoários, bactérias e vírus. Outro achado que reforça esta hipótese de ativação do sistema imune, com perfil de resposta celular ativada em um primeiro momento, foi que os resultados mostraram um aumento da expressão dos linfócitos TCD3⁺ em relação ao linfócito B CD21⁺, consecutivamente o aumento da razão entre linfócitos T e B. Por outro lado, apesar da presença do IFN- γ no momento inicial sugeriu-se que a AHT a partir do T2 apresente um perfil modulatório devido ao aumento da citocina antiinflamatória IL-10, o que consequentemente poderia levar à uma resposta humoral mais efetiva. Este achado foi também observado por El-Sharkawi et al. (2007) ao observar que o uso do PRP intra-articular diminui a dor articular devido à ação dos fatores de crescimento em inibir moléculas pró-inflamatórias como a IL-1 e o TNF- α . Corroborando, ainda, Caron (2003) afirmou que o uso de citocinas reguladoras está em ativa pesquisa para seu uso no controle de Osteoartrites em equinos uma vez que as citocinas reguladoras IL-4, IL-10 e IL-13 diminuem os efeitos degradantes das citocinas pró-inflamatórias.

Relacionando o uso da AHT a determinadas enfermidades de acordo com o perfil de suas respostas imunológicas, diante dos nossos resultados, a AHT pode ter seu uso associado ao tratamento do *Rhodococcus equi* uma vez que, Liu et al. (2009) sugeriram que os mecanismos de imunidade mediada por células são importantes na resistência contra microorganismos, como a bactéria *Rhodococcus equi*, e demonstrou que a resistência contra esta requer tanto mecanismos inatos quanto adaptativos com desenvolvimento da resposta com perfil Th1. De acordo com Hines et al. (2001 e 2003) o perfil celular de lavado bronco-alveolar de pneumonias por *R.equi* está relacionado à uma intensa resposta linfoproliferativa tanto de células TCD4⁺ como TCD8⁺.

Ainda destacando o perfil inflamatório inicial de citocinas observado neste estudo e seu potencial uso em potros, a menor expressão de IFN- γ leva à redução na atividade fagocítica já que essa citocina promove a ativação dos neutrófilos e consequente ativação da via de morte microbiana (Dawson et al., 2010), o IFN- γ se mantém em menor expressão até os três meses de idade o que justifica a baixa capacidade do mecanismo de destruição bacteriana (Demmers, 2001). Estes estudos demonstram a importância do IFN- γ nos processos patológicos dos equinos remetendo a um benefício da AHT para estas enfermidades uma vez que o aumento do IFN- γ foi observado em todos os tempos após a AHT. Adicionalmente, Narren et al. (2009) citaram outros eventos na defesa contra *Rhodococcus equi*, como a expressão de diversas citocinas pró-inflamatórias como o IFN- γ pelos neutrófilos após estimulação *in vitro*. A partir do perfil da resposta dos linfócitos e das citocinas secretadas pode-se extrapolar e sugerir a AHT e seu uso diante de respostas imunológicas geradas relacionadas aos antígenos. Por exemplo, os linfócitos expostos ao helminto *Toxocara canis* desenvolvem uma resposta Th2 e secretam IL-4 e IL-5, ao

contrário, os linfócitos expostos ao *Mycobacterium tuberculosis* formam uma resposta Th1 caracterizada pela secreção de IFN- γ (Tizard, 2008c). Coombs et al. (2006) apontaram que a imunidade contra o herpesvírus equino tipo 1 em cavalos adultos é caracterizada por uma resposta de IFN- γ em detrimento à uma resposta por interleucina 4 (IL-4). Por outro lado, a proteção contra nematódeos intestinais como *Strongylus vulgaris* depende de uma resposta de IL-4 (Swiderski et al., 1999). Diversos estudos têm confirmado que a imunidade celular exerce papel central contra *Rhodococcus equi* e que a ativação de macrófagos por mediadores, principalmente IFN- γ , é essencial para a morte da bactéria (Porto et al., 2011). Diante dos resultados do nosso estudo e da literatura citada, sugere-se que a AHT traga benefícios à resposta imunológica de cães expostos ao *Mycobacterium tuberculosis*, e de cavalos expostos ao Herpesvírus tipo 1 e ao *Rhodococcus equi*.

Em relação aos métodos de avaliação destas respostas, Bertone et al. (2001) empregaram o imunoenensaio enzimático humano (ELISA) para quantificar a presença de TNF- α em equinos com endotoxemia induzida por LPS, e não obtiveram resultados fidedignos demonstrando que a técnica ainda necessita de maior aperfeiçoamento para dosagem de citocinas. A citometria de fluxo utilizada neste estudo apresentou alta sensibilidade na identificação das citocinas intracitoplasmáticas dos equinos além de se mostrar como excelente ferramenta na identificação de subpopulações celulares demonstrando grande importância em estudos imunológicos.

Considerando que a atividade fagocítica tem um papel importante durante a resposta imune, alguns fatores podem influenciar negativamente na taxa de fagocitose e consecutivamente no papel das células como apresentadoras de antígenos. Batista et al. (2009) concluíram que a função fagocítica pode ser prejudicada por medicamentos antimicrobianos disponíveis no mercado. Nascimento et al. (2004) apontaram o estresse agudo como fonte de diminuição da fagocitose devido à presença de corticoesterona (Moinard et al., 1999) e a realização de exercícios físicos como incremento à atividade fagocítica. Estes fatores corroboram com os de Moura (2006) que apóia o uso da AHT associado a medicamentos a fim de evitar os efeitos colaterais dos mesmos. Diante da literatura apresentada observamos outro benefício dos nossos resultados uma vez que a AHT não interferiu na fagocitose por neutrófilos nos equinos estudados. Ainda abordando a importância da preservação da resposta imune, os neutrófilos possuem importante papel na proteção contra bactérias. Chaffin et al. (2004) demonstraram que a menor concentração sanguínea de neutrófilos está relacionada com a maior propensão ao desenvolvimento de pneumonias em potros. De acordo com a literatura os neutrófilos se ligam aos microorganismos, os fagocitam e diante dos animais previamente avaliados, os neutrófilos não foram desafiados por um agente patológico, desta maneira, os seus resultados de normalidade eram esperados.

6. CONCLUSÕES

Como conclusão, os resultados obtidos em nossas avaliações relativas aos parâmetros clínicos, bioquímicos, hematológicos e resposta imune de equinos submetidos à AHT foram:

- A AHT não acarreta alterações nos parâmetros clínicos dos animais, que pudessem estar relacionadas com dano ou injúria local ao animal;
- O volume de sangue da AHT proposto de 20 mL/100kg com aplicação em diferentes sítios musculares não trouxe prejuízos ao animal e mostrou-se suficiente para fazer as avaliações desejadas.

- A partir do protocolo utilizado, não foram observadas alterações bioquímicas e hematológicas nos animais. Estes fatos demonstram que a AHT não traz efeitos colaterais aos sistemas hepático e renal.
- Foi observada a presença de linfócitos reativos a partir da segunda aplicação da AHT (T2).
- O perfil de linfócitos T CD3⁺ Th1 foi predominante em relação aos linfócitos B CD21⁺ como reflexo do estímulo à AHT.
- Dez dias após a aplicação da AHT (T2) há o pico da resposta celular com presença predominante de citocinas inflamatórias e com 17 dias de AHT há predomínio de citocinas anti-inflamatórias e resposta humoral.
- O perfil de citocinas apresentado após o estímulo da AHT mostrou um predomínio do IFN- γ , nos três tempos, seguido de elevação da citocina IL-10 a partir do T2 o que representa um efeito modulatório desta citocina frente ao IFN- γ .
- A AHT não acarretou interferência na fagocitose realizada por neutrófilos estimulados por Zimosan.
- A citometria de fluxo permitiu fidedignas e múltiplas análises da resposta imune de equinos submetidos à AHT.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

A Auto-hemoterapia é uma terapia antiga com muitas lacunas para o futuro principalmente em relação às suas indicações, resultados clínicos, benefício e contra-indicações e maiores pesquisas devem ser estimuladas para definirmos qual é sua real ação dentro sistema imunológico. Desta maneira, estudos empregando novos marcadores de resposta imune devem ser realizados a fim de trazer maiores subsídios que possam confirmar que a AHT seja uma técnica com resultados cientificamente factíveis.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Associação Brasileira de Medicina Complementar (ABMC). *Auto-Hemoterapia*. Disponível em <<http://www.medicinacomplementar.com.br/tema130206.asp>>. Acesso em 12/09/2016.

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. Células e tecidos do sistema imune. ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier Saunders, 2012, p. 15-19.

APPELBERG, R. Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. *Trends Microbiology*, n.15. p.87-92, 2006.

BARBOSA, G.G.A.; FARIAS, M.G.; LUDWIG, H.C. et al. Could CD64 expression be used as a predictor of positive culture results in children with febrile neutropenia? *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. v.37, n.6, p.395-399, 2015.

BATISTA, C.F.; BLAGITZ, M.G.; AZEDO, M.R. et al. Efeito de medicamentos indicados para o tratamento de mastite bovina no período seco sobre os índices de fagocitose. *Ciência Animal Brasileira*, v.10, n.2, p.574-580, 2009.

BARBOSA LOPES, R.R.F.; QUESSADA, A.M.; FREIRE, L.D.S. et al. Leucócitos totais em cães com gastroenterite hemorrágica tratados por autohemoterapia. *Jornal Interdisciplinar de Biociências*, v.2, n.1, p. 1-5, 2017.

BIO-RAD. Mouse anti-Horse Pan-B cells: FITC. Disponível em: <bio-rad-antibodies.com>
Acesso em : 17 de setembro de 2017. 2018.

BENESI, F.J.; HOWARD, D.L.; LEAL, M.L.R. et al. Perfil bioquímico de algumas enzimas no plasma de potras da raça Brasileiro de Hipismo (BH) criadas em Colina, estado de São Paulo. *Braz. J. Vet. Res. Anim*, v.46, n.4, p.288-295, 2009.

BERTONE, A.L.; PALMER, J.L.; JONES, J. et al. Synovial fluid cytokines and eicosanoids as markers of joint disease in horses. *Veterinary Surgery*, v.30, p.528-538, 2001.

BERTHO, A.L. Citometria de fluxo. Disponível em: < <http://picf.ioc.fiocruz.br/ncfm.htm>>. Acesso em: 20 de novembro de 2017.

BORGES, O.M.M.; SOUZA, A.P.; SOUZA MENDES, R. et al. Clinical Effectiveness of Autohemotherapy as an adjunct treatment of canine parvovirus. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.42, p.1-7, 2014.

BORREGAARD, N.; LOLIKE, K.; KJEDSEN, L. et al. Human neutrophil granules and secretory vesicles. *Eur J. Haematology*, n.51, p.187-198, 1993.

BRANDT, C.T.; CASTRO, C.M.M.B. et al. Fagocitose e viabilidade monocitária de pacientes com equistossomose mansônica na forma hepatoesplênica submetidos à esplenectomia e ao auto-implante esplênico. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.39, n.5, p.439-445, 2006.

CARON, J.P. Osteoarthritis. In: ROSS, M.W. e DYSON, S.J. *Diagnosis and management of lameness in the horse*. 2 ed. Philadelphia: Saunders Company. p.572-594, 2003.

CESARINO, M.; ÁVILA, D.F.; FERNANDES, C.C. et al. Efeito da autohemoterapia associada com Clorambutanol no tratamento da papilomatose oral em cão (*Canis familiaris*)- relato de caso. In: Anais da XX Semana Científica de Medicina Veterinária de Uberlândia e V mostra de pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária- UFU, p.62, 2008.

CHAFFIN, M.K. Hematologic and immunophenotypic factors associated with development of *Rhodococcus equi* pneumonia of foals at equine breeding farms with endemic infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 100, n.1-2, p.33-48, 2004.

COOMBS, D.K. Cytokine responses to EHV-1 infection in immune and non-immune ponies. *Veterinary Immunology Immunopathology*, v.111, n.1-2, p.109-116, 2006.

CRAIG, F.; FOON, K. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*, v.111, n.8, p.3941-67, 2008.

COPPO, J.A. Fisiopatologia Hepática. *Aporte diagnóstico Del laboratorio veterinário*. CIVEPAC, Corrientes, 1980.

COPPO, J.A.; MUSSART, N.B. Apoyatura bioquímica al diagnóstico veterinario. Casuística registrada tras 25 años de funcionamiento de in servicio de análisis clínicos. *Revista Veterinaria*, v.10, n.11, p-1-2, 2000.

- DAWSON, T.R.M.Y. Current understanding of the equine immune response to *Rhodococcus equi*. An immunological review of *R. equi* pneumonia. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.135, n.1-2, p.1-11, 2010.
- DEMMERS, S. Neutrophil functions and serum IgG in growing foals. *Equine Veterinary Journal*, v.33, n.7, p.676-680, 2001.
- DIAS, D.C.; TACHIBANA, L.; SERIANI, R. et al. Tempo de migração dos macrófagos em matrinxã, *Brycon amazonicus*, por meio da técnica de inoculação de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Amazonica*, v. 4, n.3, p. 421- 424, 2011.
- DONNENBERG, A.D.; DONNENBERG, V.S. Rare event analysis in flow cytometry. *Clin Lab. Med.*, v.27, p.627-652, 2007.
- ESCODRO, P.B.; JOAQUIM, J.G.F.; MARIZ, T.M.A. et al. Autohemotherapy at acupuncture points post orchietomy surgery in cart horses – eight cases report. *Veterinária e Zootecnia*, n. 19, v.4, p. 502-506, 2012.
- EL-SHARKAWY, H; KANTARCI,A.; DEADY,J. et al. Platelet-rich plasma growth factors and pro- and anti-inflammatory properties. *J. Periodontol.*, v.78, n.4, p.661-669, 2007.
- FARIA, B.A. ; SILVA, S.M.; ABREU, M.T. C.I. et al. Ação dos linfócitos T regulatórios em transplantes. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v.30, n.4, p. 309-315, 2008.
- FINN, W.; CARTER, K.; RAICH, R.; STOOLMAL, H.A. Analysis of Clinical Flow Cytometric Immunophenotyping Data by Clustering on Statistical Manifolds: Treating Flow Cytometry Data as High-Dimensional Objects. *Cytometry*. p.1-7, 2009.
- FONTENELLE, A. O DNA da fraude. Disponível em: <<http://revistaepoca.globo.com/revista/epoca/0EMI97081529400=O+DNA+DA+FRAUDE.htm>> 01/08/2008. Acesso em: 10 de janeiro de 2018.
- FOXMAN, E.F.; KUNKEL, E.J.; BUTCHER, E.C. Integrating conflicting chemotactic signals. The role of memory leukocyte navigation. *J. Cell. Biol.*, v.147, p. 577-588, 1999.
- FRASNELLI, M.E; TARUSSIO,D.; CHOBZ-PECLAT,V.; BUSSO, N. TLR2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. *Arthritis Research & Therapy*,v.7, n.2, p. 370-379, 2005.
- GOLDSBY, R.; KINDT, T.; OSBORNE, B. et al. *Kuby Immunology*. New York: Freeman and Company, p. 308-311, 2001.
- GOMES, V.C.L.; MOREIRA, F.M.; REZENDE, J.V. et al. Auto-hemoterapia como tratamento auxiliar para melanocitoma em equino: relato de caso. In: CONFERÊNCIA ANUAL DA ABRAVEQ, 15. Anais, Campos do Jordão, trab. 235, 2014.
- GROSS, P.S.; AL-SHARIF, W.Z.; CLOW, L.A.; SMITH, L.C. Echinoderm immunity and the evolution of the complement system. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 23, p.429-442, 1999.

- GUEDES, A.R.M.; PRADO, L.G.; SILVA, G.F. O uso de auto-hemoterapia no tratamento da papilomatose juvenil em potro: relato de caso. In: VII Congresso de Iniciação Científica da FEPI, Itajubá, outubro/2016.
- GUIMARÃES, M.C.C.; GAMA FILHO, R.V. Diferenciação de monócitos-macrófagos de *Gallus gallus*: uma abordagem morfológica. *Perspectivas Online*, v.3, n.9, 2009.
- HEDLEY, B.; KEENEY, M. Technical issues: flow cytometry and rare event analysis. *Int J Lab Hem.*, v. 35, p.344-350, 2013.
- HINES, T.M. Immunity to *Rhodococcus equi*: antigen specific recall responses in the lungs of adult horses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.79, n.1-2, p. 101-112, 2001.
- HINES, S.A. Clearance of virulent but not avirulent *Rhodococcus equi* from the lungs of adult horses is associated with intracytoplasmic gamma interferon production by CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v.10, n.2, p.208-215, 2003.
- HOLANDA, L.C.; VAZ, S.G.; ALMEIDA, T.L.A.C. et al. Variáveis hematológicas de equinos (*Equus caballus*, Linnaeus, 1758) da raça Mangalarga Marchador. *Revista Medicina Veterinária*, v.7, n.3, p.1-6, 2013.
- HOLGATE, S.T. Today's science- tomorrow's practice: basic mechanisms of allergy and their clinical implications. *Clin. Exp. All. Rev.*, v.2, p.48-54, 2002.
- IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Efetivo dos rebanhos equinos, 2014. Disponível em: <seriesestatisticas.ibge.gov.br> Acesso em: 10 de novembro de 2017.
- JAIN, N.C. *Essentials of veterinary hematology*. Wiley. 1ed., p. 100-132.1993.
- JIANG, L.I.; STERNWEIS, P.C.; WANG, J.E. Zymosan activates protein kinase A via adenylyl cyclase VII to modulate innate immune response during inflammation. *Molecular Immunology*. v.54, n.1, p.14-22, 2013.
- KANEKO, J.J., HARVEY, J.W., BRUSS, M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. San Diego : Academic Press, p.130-145, 1997.
- KIMBER, I; DEARMAN, R.J. Allergic contact dermatitis: the cellular effectors. *Contact Dermatitis*, v.46, p.1-5, 2002.
- KISHIMOTO, T.K.; ROTHLEIM, R. Integrins, ICAMs and selectins: role and regulation of adhesion molecules in neutrophil recruitment to inflammatory sites. *Adv. Pharmacol.*, v.25, p. 117-169, 1994.
- LATIMER, K.S. Duncan and Prasse's *Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology*. 5.ed. Wiley-Blackwell. p.70-82, 2003.
- LATIMER, K.S.; MEYER, D.J. Os leucócitos na Saúde e na Moléstia. In: ELFINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. *Tratado de Medicina Interna Veterinária*. 3 ed. São Paulo: Manole, v.4, 1992, p.2616-2664.

- LEANDRO, C.G.; NASCIMENTO, E.; AZEVEDO, M.M. et al. Efeito da L-Glutamina sobre perfil leucocitário e a função fagocítica de macrófagos de ratos estressados. *Revista de Nutrição*, v.19, n.4, p. 437-444, 2006.
- LEITE, D. F.; BARBOSA, P. F. T.; GARRAFA, V. Auto-hemoterapia, intervenção do estado e bioética. *Revista Associação Med. Bras.*, v. 54, n. 2, p.183-188, 2008.
- LEHRER, R.I.; GANZ, T. Antimicrobial polypeptides of human neutrophils. *Blood.*, v.76, p. 2169-2181, 1990.
- LIU, T. Basal and stimulus-induced cytokine expression is selectively impaired in peripheral blood mononuclear cells of newborn foals. *Vaccine*, v.27, n.5, p.674-683, 2009.
- LOPES, C.; AMARAL, F. *Explorando o Sistema Imunológico*. Disponível em: <http://www1.pucminas.br/imagdb/documento/DOC_DSC_NOME_ARQUI20130912164902.pdf?PHPSESSID=79cc7fe47e3e88d4676e77be2f4224e2>. Acesso em: 04 set. 2017.
- LOPES, P. Auto-hemoterapia no tratamento de dermatose em equino: relato de caso. Trabalho de Conclusão de Residência apresentado à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 28p. 2016.
- LOPES, S.T.A.; CUNHA, C.M.S. *Patologia Clínica Veterinária*. Centro de Ciências Rurais, Universidade de Santa Maria, 125p. 2002.
- MEAGER, A. In: *The molecular biology of cytokines*. Inglaterra: Wiley J. & Sons, v.11, 1998, p.1-415.
- MEYER, D.J.; COLES, E.H.; RICH, L.J. In: MEYER, D.J.; HARVEY, J.W. *Medicina de Laboratório Veterinário*. 1.ed. São Paulo: Roca, 1995, p.23-36.
- METTENLEITER, M.W. Autohemotransfusion in preventing postoperative lung complications. *American Journal of Surgery*, v.32, n.2, p.321-323, 1936.
- MOINARD, C.; CHAUVEAU, B.; WALRAND, S et al. Phagocyte functions in stressed rats: comparison of modulation by glutamine, arginine and ornithine 2-oxoglutarate. *Clin Sci (Lond.)*, v.97, n.1, p.59-65, 1999.
- MONDO, N.D.; CARVALHO, W. Efeito da auto-hemoterapia no tratamento de cães portadores de patologias persistentes após terapia convencional. *Revista Multidisciplinar da saúde*, ano IV, n.8, p. 63-64, 2012.
- MORAES, M.R.; OTA, C.C.C. Estudo científico da Auto-hemoterapia. Disponível em: <<http://tcconline.utp.br/?tag=mirian-regina-de-moraes>>. Acesso em: 10 de dezembro de 2017.
- MOURA, Luiz. Transcrição do DVD: *Auto-hemoterapia, conversa com o Dr. Luiz Moura*. 01/01/2008. Disponível em: <<http://www.rnsites.com.br/auto-hemoterapia-dvd.htm>>. Acesso em: 05 out. 2017.
- MUELLER, E.F.; PETERSON, W. The mechanism of insulin action. *Arch. of Int. Med.*, n. 37, v.4, 1926.

- MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. In: MURPHY, K.P.; JANEWAY, C. *Imunobiologia de Janeway*. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010, p. 1-39.
- NABITY, M.B.; RAMAIAH, S.K. Neutrophil Structure and Biochemistry. In: *Schalm's Veterinary Hematology*. Wiley-Blackwell. 6 ed., 2010, p.263-267.
- NARREN, J.R. Age related changes in cytokine expression by neutrophils of foals stimulated with virulent *Rhodococcus equi* in vitro. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 15, n.127, p. 212-219, 2009.
- NASCIMENTO, E. ; CAVALCANTE, T.; PEREIRA, S. et al. O exercício físico crônico altera o perfil leucocitário e a taxa de fagocitose de ratos estressados. *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto*, v.4, n.3, p.26-33, 2004.
- NEGANO, Y.; RONDO, M.; TAMAOKI, J. et al. Peripheral blood Th1 and Th2 profile in patients with moderate asthma: effect of inhaled corticosteroid. *J. Asthma*, n.39. p.274-253, 2002.
- OTONI, A.O.M.J. Avaliação do efeito de receptores purinérgicos em neutrófilos cultivados in vitro com formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania braziliensis*. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. 89p. 2015.
- PEYRON, M.P.I.; STEGMANN, T. Fusion of human neutrophil phagosomes with lysosomes in vitro: involvement of tyrosine kinases of the Src family and inhibition by micobacteria. *J. Biol. Chem.*, v.276, p.35512-35517, 2001.
- PORTO, A.C.R.C.; FERNANDES, W.R.; BARREIRA, M.C.R. *Rhodococcus equi*. Parte 2 – Imunologia e Profilaxia. *Ciência Rural*, v.41, n.12, p.2151-2158, 2011.
- QUESSADA, A.M.; CARVALHO, C.J.S.; OLIVEIRA, R.N. et al., Auto-hemoterapia como adjuvante no tratamento de mastocitoma em cão: relato de caso. *R. Brás. Ci. Vet.*, v.17, p. 108-110, 2014.
- REBORDÃO, M.; SILVA, M.; REMÉDIOS, A. et al. Estudo de citocinas de linfócitos T e de Imunoglobulinas E e G em doentes atópicos candidatos à imunoterapia. *Revista Portuguesa de Imunoalegologia*, v.XI, p. 370-379, 2003.
- REGO, E.M.; SANTOS, G.A.S. Papel da imunofenotipagem por citometria de fluxo no diagnóstico diferencial das pancitopenias e das linfocitoses. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v.3, n.5, p.1-8, 2009.
- ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMAR, V. In: ROBBINS, S.L. *Robbins: Patologia estrutural e funcional*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.83-84, 1994.
- RODRIGUES, D.S.A.; ALENCAR, D.F.; MEDEIROS, B.L.N.; et al. Efeito da auto-hemoterapia sobre a concentração de leucócitos totais em cães. In: *Anais Anclivepa*, v.37, p. 0138-0143, 2016.
- ROSENOW, E. C. Mouth infection as a source of systemic disease. *JAMA*, v. 63, n. 23, p. 2024-2025, 1914.

- SANTIN, A.P.I.; BRITO, L.A.B. Estudo da papilomatose cutânea em bovinos leiteiros: comparação de diferentes tratamentos. *Ciência Animal Brasileira*. v.5.n.1.p.39-45, 2004
- SCOTT, M.A.; STOCKHAM, S.L. Lymphocytes. In: SCOTT, M.A.; STOCKHAM. *Fundamentals of veterinary clinical pathology*. 3 ed. Ames: Blackwell, 2011, p.230-236.
- SECOMBES, C.J. Enhancement of fish phagocyte activity. *Fish Shellfish Immunol.*, v.4, p.421-436, 1994.
- SEDEK, L.; BULSA, A.; SONSOLA, A.; TWARDUCH, M.; WICCORCK, M.; MALINOWSKA, L. The immunophenotypes of blast cells in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: How different are they from their normal counterpart? *Cytometry*, v.86, p. 329-339, 2014.
- SHAKMAN, S.H. *Auto-hemoterapia, a picada mágica?* Disponível em: <www.instituteofscience.com/autohemoterapia_a_picada_mágica_stuart_shakman.pdf>. Acesso em: 15 out. 2017.
- SHIRAI, T.; SUZUKI, K.; INUI, N. et al., Th1/Th2 profile in peripheral blood in atopic cough and atopic asthma. *Clin. Exp. Allergy*, n. 33. p.84-89, 2003.
- SCHENEIDER, R. Analysis of antibody subtypes and T lymphocyte activation following vaccination of healthy foal against West Nile Virus. In: M.Sc. thesis University of Pennsylvania, Chapter 3, p.34-45, 2010.
- SILVA, J.R.M.C.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F.J.; PORTO-NETO, L.R. et al. Comparative study of in vivo and in vitro phagocytosis including germicide capacity in *Odontaster validus* (Koehler, 1906) at 0°C. *J Invertebr Pathol*, v. 77, p.180-185, 2001.
- SILVA, C.H.; SOUZA, L.J.; PAPA-MARTINS, M. Avaliação dos efeitos da auto-hemoterapia sobre a cicatrização e presença de leucócitos séricos em ratos wistar. *Revista eletrônica de enfermagem do Unieuro*, v.2, p- 39-57, 2009.
- SOUZA, C.R.M. Efeito anti-inflamatório do extrato metanólico de *Caulerpa mexicana* em modelo murino de inflamação generalizada induzida por zimosan. Dissertação de Mestrado do Programa de pós-graduação em Biologia Parasitária da UFRN. 77f, 2016.
- SPEIRS, V.C. *Exame clínico de equinos*. Porto Alegre: Artes Médicas, 365p, 1997.
- STELER-STEVENSON, M.; DAVIS, B.; WOOD, B.; BRAYLAN, R. 2006 Bethesda International Consensus Conference on Flow Cytometry Immunophenotyping of Hematolymphoid Neoplasia. *Cytometry B. Clin Cytom*, 72B:S3, 2007.
- STITES, D.P.; ABBA, I.; TRISTAM, G. et al., *Imunologia médica*. 10.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 152-163, 2004.
- SUÁREZ, V.M.; PÉREZ, L.O.V.; DOMÍNGUEZ, G.D., ABRAHAM, C.M. Metodología y aplicaciones de la citometria de flujo para el inmunofenotipaje de las leucemias agudas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, v.3, n.3, p.242-253, 2015.

- SWIDERSKI,C.; KLEIT,T.; FOLSOM,R. et al. Vaccination against *Strongylus vulgaris* in ponies: comparison of the humoral and cytokine responses of vaccinates and nonvaccinates. *Adv.Vet.Med.*, v.41, p.389-404, 1999.
- TADICH, N.; MENDEZ,G.; WITTWER,F.; MEYER, K. Valores Bioquímicos do sangue de cavalos de carga na cidade de Valdivia (Chile). *Arquivos de Medicina Veterinária*, v.29, n.1, 1997.
- TAKEUCHI, K.; UMEKI, I; MATSUMOTO N. et al. Severe neutrophil-mediated lung inflammation in myeloperoxidase-deficient mice exposed to zymosan. *Inflamm. Res.*, v.67, p.197-205, 2012.
- THOMASSIAN, A. In: *Enfermidades dos cavalos*. 4 ed. São Paulo : Varela, 2005, p. 42-43.
- TILG, H.; DINARELLO, C.A.; MIER, JW. IL-6 and APPs: anti-inflammatory and imunossuppressive mediators. *Immunol. Toda*. v.18, n.9, p. 428-432, 1997.
- TIZARD, I.R. In: *Imunologia Veterinária, uma introdução*. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008a, p.1-355.
- TIZARD, I.R. Linfócitos T auxiliares e sua resposta aos antígenos In: *Imunologia Veterinária, uma introdução*. 8 ed. Rio de Janeiro:Elsevier, 2008b, p.143-155.
- TEIXEIRA, J. Complicações pulmonares pós-operatórias. *Revista Brasil-Cirúrgico*, v. 2, 1940.p. 213-230. Disponível em: <http://www.rnsites.com.br/artigo_jesse_teixeira.pdf>. Acesso em: 25 set. 2017.
- TREVISANIL, A.C.; HERMES-ULIANA, C.; OBIKAWA,C.Y. Análise dos níveis de imunoglobulinas séricas e monócitos de pacientes em tratamento com auto-hemoterapia. *Arq. Cienc. Saúde UNIPAR*, Umuarama, v.19, n.2, p.101-107, 2015.
- UNDERHILL,D.M. Macrophage recognition of zymosan particles. *Journal of Endotoxin Research*, v.9, n.3, p. 176-180, 2003.
- VADJA, G. et al. Data concerning the mechanism of autohaemotherapy in pilyarthritic patients. *Z. Immunitatsforsch Allerg Klin Immunol*. v. 133, n. 1, p. 1-6, 1967.
- VARELLA, P.P.V.; FORTE,W.C.N. Citocinas: revisão. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia*, v.24, n.4, p.146-154, 2001.
- VASCONCELOS, R.M.; LEITE, F.C.; LEITE, J.A. et al. Synthesis, acute toxic and anti-inflammatory effect of bornyl salicilate, a salicylic acid derivative. *Immunopharmacol Immunotoxicol.*, v.34, p. 1028-1038, 2012.
- VERONESI, R. Imunologia, o impacto médico do século. *Medicina de hoje*, 01/08/2008, p.6. Disponível em: <<http://www.medicinacomplementar.com.br/convertido/do-0426.htm>>do-0426.pdf 2008. Acesso em: 25 set. 2017.
- VIZONI, S.L.; LIEBERr, S.R.; SOUZA, C.A. et al.. Papel das citocinas na imunopatogênese da Doença do Enxerto contra o hospedeiro. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v.30, n.2, p 142-152, 2008.

WALCHECK,B.; MOORE,K.L.; MCEYER, R.P. et al. Neutrophil-neutrophil interactions under hydrodynamic shear stress involve L-selectin and PSGL-1. A mechanism that amplifies initial leukocyte accumulation of P-selectin in vitro. *Journal Cli. Invest.*, v.98, p. 1081-1087, 1996.

WIDAL, F. L`anaphylaxie. *Presse Med.*, v.79, p.781, 1921.



WEISS,D.J.; RAMAIAH, S.K.; WALCHECK,B. Neutrophil distribution and function. In: WEISS, D.J; WARDROP, K.J. *Schalm`s Veterinary Hematology*. 6ed. Wiley-Blackwell, p.268-274, 2010.

WOODS,J.A.; LU Q.; CEDDIA, M.A.; LOWDER,T. Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: exercise-induced modulation of macrophage function. *Int J Sports Med.*, v.21, n.1, p.24-30, 2000.

9. ANEXOS

Anexo I. Certificado CEUA/UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 351/2017

Título do projeto:

Avaliação de marcadores de resposta imune no sangue periférico em equinos submetidos à Auto-hemoterapia

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Maristela Silveira Palhares

Unidade: Escola de Veterinaria

Departamento Departamento de Clinica e Cirurgia Veterinaria

Situação atual: **Decisão Final - Aprovado**

Aprovado na reunião do dia 04/12/2017. Validade: 04/12/2017 à 03/12/2022

Belo Horizonte, 04/12/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/
Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

Decisão Final - Aprovado - Protocolo CEUA: 351/2017 (CEUA-UFMG)

Anexo II. Parâmetros físicos avaliados no exame clínico realizado na Clínica de Equinos da Escola de Veterinária da UFMG.

Parâmetro Físico/ Dia
Comportamento
Condição física
Alterações anatômicas
Mucosas
TPC
Linfonodos
Frequência cardíaca (bpm)
Auscultação cardíaca
Pulso (ppm)
Frequência respiratória (mpm)
Auscultação respiratória
Auscultação abdominal
Temperatura retal (°C)
Pulso Digital Patológico