

Hemograma e metabolismo oxidativo dos neutrófilos de bovinos da raça Holandesa preta e branca - Influência dos fatores etários.

Hemogram and oxidative metabolism of neutrophils of Holstein-friesian (Bos taurus) calves - Influence of age factors .

PEIXOTO, A.P.C.*; COSTA, J. N.; KOHAYAGAWA, A.; TAKAHIRA, R.K.; SAITO, M.E.

*Instituto de Ciências da Saúde-UFBA Laboratório de Imunologia paulaceixoto@uol.com.br

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar o quadro hematológico e o metabolismo oxidativo dos neutrófilos de bezerros da raça Holandesa preta e branca analisando a influência dos fatores etários. Foram colhidas amostras de sangue da veia jugular de 20 bezerros com idade entre 0 e 90 dias em dois diferentes tubos: 5 mL de sangue total em EDTA e 500 µL em heparina para a determinação respectivamente, do hemograma e do teste da função oxidativa neutrofilica. Os animais foram divididos em dois grupos de 10 bezerros: o Grupo 1 com idade inferior a 30 dias e o Grupo 2 com idades entre 30 e 90 dias. Os valores obtidos para o número total de eritrócitos e de leucócitos foram, respectivamente: $7,61 \pm 1,32 \times 10^6 \mu\text{L}$ e $11,0 \pm 3,87 \times 10^3 \mu\text{L}$ para animais do Grupo 1 e de $7,88 \pm 1,22 \times 10^6 \mu\text{L}$ e $11,9 \pm 2,92 \times 10^3 \mu\text{L}$ para os animais do Grupo 2. A função oxidativa neutrofilica determinada pelo teste de redução do NBT (Nitroblue Tetrazolium) foi superior no Grupo 2.

PALAVRAS CHAVE: bovinos, hemograma, NBT, função de neutrófilos.

SUMMARY: The objective of this study was to evaluate the hematologic picture and the oxidative metabolism of the neutrophils of calves of Holstein-friesian, analyzing the influence of the age factors. Blood was collected of 20 calves with age among 0 and 90 days by jugular venipuncture into two different tubes : 5 mL of total blood in EDTA and 500 µL in heparina for the determination of the hemogram and for the test of the oxidative function of the neutrophils. The animals were divided in two groups of 10 calves, the Group 1 with age inferior to 30 days and the Group 2 between 30 and 90 days. The values obtained for RBC (red blood cells) and WBC (white blood cells) counts were $7,61 \pm 1,32 \times 10^6 \mu\text{L}$ and $11,0 \pm 3,87 \times 10^3 \mu\text{L}$ respectively for animals of the Group 1 and $7,88 \pm 1,22 \times 10^6 \mu\text{L}$ and $11,9 \pm 2,92 \times 10^3 \mu\text{L}$ for the animals of the Group 2. The oxidative function of neutrophils determined by the test of reduction of NBT (Nitroblue Tetrazolium) was higher in the Group 2.

KEYWORDS: Calves, Hematology, Nitroblue Tetrazolium, neutrophil function

Rev. Bras. Saúde Prod. An. 3 (1):16-20, 2002.

Publicação Online da EMV/UFBA – <http://www.rbspa.ufba.br>

INTRODUÇÃO

São inúmeros os fatores que podem influenciar o quadro hematológico dos bovinos destacando-se os etários, os sexuais, raciais, climáticos, nutricionais, infecciosos e parasitários. No Brasil alguns pesquisadores já demonstraram o interesse em estudar a influência de alguns destes fatores sobre o hemograma de bovinos, tendo inclusive, estabelecido alguns padrões hematológicos (NICOLETTI et al. 1981; GARCIA 1989; MARÇAL 1989; BIRGEL JUNIOR 1991; AYRES 1994; COSTA 1994; BIONDO 1998).

O período neonatal na espécie bovina é marcado por rápidas mudanças do quadro hematológico, sendo ainda caracterizado por uma maior susceptibilidade às doenças (TENNANT et al. 1974; RADOSTITS et al. 2000). WALTER TOEWS et al. (1986) estudaram 1968 bezerros durante as primeiras

vinte semanas de idade e verificaram que 60% das mortes ocorreram no primeiro mês de vida.

Os bovinos, logo, após o nascimento, dependem da ingestão do colostro para a obtenção da imunidade passiva, de fundamental importância à sobrevivência durante os primeiros dias de vida (TIZARD 2000). A dificuldade na absorção de uma adequada quantidade de imunoglobulinas, frequentemente, resulta em altas taxas de morbidade e mortalidade pelas enfermidades neonatais (WHITE & ANDREWS 1986; ROBINSON et al. 1988; TODD & WHITE 1995). A capacidade funcional dos neutrófilos presentes na secreção mamária ainda é incerta, sabe-se contudo, que as funções de fagocitose, de motilidade e de explosão respiratória desempenhadas por estas células na secreção mamária, são menos eficientes quando

comparadas com as atividades neutrofílicas no sangue periférico (OZKARAGOZ et al. 1988).

A fagocitose realizada pelo neutrófilo é um importante mecanismo de defesa do hospedeiro contra a invasão de microorganismos. O aumento da produção de substâncias oxidativas no interior do neutrófilo que ocorre por meio do aumento da atividade respiratória desta célula é fundamental para a adequada eficiência deste processo de defesa (TIZARD 2000).

O teste da redução do nitroblue tetrazolium (NBT) foi um método desenvolvido para a determinação da atividade oxidativa dos neutrófilos. A redução da referida substância no interior do neutrófilo é indicativo da ingestão normal e da capacidade bactericida celular permitindo portanto, a detecção de

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais: Foram utilizados 20 bezerros sadios da raça Holandesa, fêmeas e com idades variando entre 0 e 90 dias, procedentes de uma propriedade de exploração leiteira, situada no município de São Pedro, no Estado de São Paulo. Todos os animais receberam após o nascimento o mesmo manejo: quatro litros de colostro, sendo que os dois primeiros foram ingeridos antes de transcorridas às primeiras seis horas após o parto. Posteriormente estes animais foram colocados em baias individualizadas onde receberam quatro litros de colostro por mais dois dias. A partir do quarto dia passaram a receber: quatro litros de leite, feno, ração granulada para bezerros, sal mineral e água à vontade. Os bezerros foram divididos em dois grupos experimentais de 10 animais cada, sendo o Grupo 1 composto por animais com idade inferior a 30 dias e o Grupo 2 por animais com idades compreendidas entre 30 e 90 dias.

Foram obtidos mediante punção da veia jugular 5 mL de sangue total em tubos de sistema à vácuo com anticoagulante EDTA (ácido etileno diaminotetracético, sal dissódico) para realização do hemograma e 500 µL de sangue em tubos ependorf contendo 2,0 µL de heparina

anormalidades do metabolismo oxidativo fagocítico (BAEHNER & NATHAN, 1968). Na espécie bovina, no trabalho realizado por NAGHATA et al. (1986), foram observadas baixas taxas de redução do NBT em neutrófilos de uma novilha com pneumonia recorrente crônica quando comparadas com valores obtidos para vacas normais.

As informações à respeito da evolução da função oxidativa dos neutrófilos em bovinos são escassas, portanto, o objetivo deste trabalho foi determinar e comparar o hemograma e o metabolismo oxidativo dos neutrófilos pelo teste da redução do NBT em bezerros da raça Holandesa preta e branca do nascimento até os 90 dias de idade avaliando as possíveis variações durante este período.

(Liquemine® 5000UI/mL, Roche, São Paulo, Brasil) para determinação do teste de redução do nitroblue tetrazolium (NBT).

As contagens de eritrócitos e leucócitos totais foram feitas em câmara de Neubauer e a contagem diferencial dos leucócitos foi realizada em esfregaços sangüíneos corados pelo método de Leishman, segundo JAIN (1986). A determinação do volume globular (VG) foi efetuada pelo método do microhematócrito (Micron, Americanópolis, São Paulo/SP - Brasil) e a determinação da hemoglobina pelo método da cianometahemoglobina (CELM, Alphaville, São Paulo/SP - Brasil). Para a avaliação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos foram utilizados os testes de redução do NBT pelo método estimulado e não estimulado. As amostras de sangue foram mantidas refrigeradas em caixa de isopor com gelo até o momento das análises, as quais foram realizadas no máximo até duas horas após a colheita. Os testes da redução espontânea e da redução estimulada foram realizados pelo método citoquímico descrito por PARK et al. (1968) com algumas modificações, conforme o seguinte procedimento: momentos antes do uso,

frascos contendo 1 mg de nitroblue tetrazolium tamponado (NBT vial catalog n° 840-10, Sigma Diagnostic, St. Louis - USA) foi reconstituído com 1000 µL de água destilada.

Desta solução de NBT foram pipetados e transferidos 50µL para dois frascos plásticos com capacidade para 1000 µL identificados com o número da amostra e com as letras “NE” destinado ao teste não estimulado e “E” destinado ao teste estimulado. Apenas no frasco “E” do teste estimulado foram então adicionados 2,5µL de estimulante (STIMULANT, catalog N°840-15, Sigma Diagnostic, St. Louis -USA) constituído de estrato bacteriano inativado. Após homogeneização foram pipetados 50µL de sangue total heparinizado no frasco “NE” e 25µL no frasco “E”, misturando-se as amostras com os reagentes dos com suaves movimentos de rotação. Os frascos “NE” e “E” foram

incubados a 37°C por 15 minutos em banho-maria e posteriormente por outros 15 minutos em temperatura ambiente.

Em seguida, o conteúdo dos frascos “NE” e “E” foi homogeneizado com suaves movimentos de rotação. Utilizando-se lâminas desengorduradas prepararam-se três esfregaços que posteriormente foram corados pelo método de Leishman conforme JAIN (1986). Por meio de microscopia, com aumento de 1000X, para cada amostra e para cada prova foram contados 100 neutrófilos, discriminando o percentual de células NBT positivas ou negativas, conforme apresentavam ou não o NBT reduzido (substância enegrecida) no interior do citoplasma. Para comparação entre os grupos utilizou-se o teste não paramétrico de Man Whitney para amostras independentes, conforme SIEGEL (1956).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios obtidos no hemograma podem ser verificados na Tabela 1. Os resultados obtidos para o eritrograma no presente trabalho encontram-se dentro da faixa de normalidade para a espécie bovina (JAIN 1986), estando próximos daqueles obtidos por KOHAYAGAWA (1993) e por FAGLIARI (1998) em bezerros da raça Holandesa com até um mês de idade e por TÁVORA (1997) em bezerros com idade até 3 meses. Não foi verificada a influência significativa dos fatores etários sobre o número de eritrócitos observada por MARÇAL (1989); KOHAYAGAWA (1993); AYRES (1994); BIONDO (1996) e por TÁVORA (1997) que assinalaram uma redução do número de eritrócitos com o avançar da idade. Esta discordância possivelmente seja em função da diferença de idade entre os grupos comparados pelos referidos autores e a faixa etária dos animais estudados no presente trabalho. Nos resultados obtidos para o leucograma número total de leucócitos em ambos os grupos encontram-se dentro dos valores de normalidade para a espécie (JAIN,1986), entretanto acima dos valores encontrados por KOHAYAGAWA (1993) em

animais com até 1 mês de idade e abaixo dos verificados por TÁVORA (1997) em animais com até 3 meses de idade. Verificou-se ainda, o aumento do número total de leucócitos com o avançar da idade e uma predominância de neutrófilos nos animais mais jovem, fato este também verificado por outros autores (JAIN 1986; KOHAYAGAWA 1993; COSTA 1994; BIONDO 1996). Os animais do Grupo 1 apresentaram número absoluto de neutrófilos significativamente superior ($p \leq 0,05$) ao do Grupo 2, sendo que este apresentou maior número absoluto de linfócitos. Os valores obtidos para neutrófilos bastonetes, eosinófilos, basófilos e monócitos não apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados.

Com relação aos resultados obtidos para o teste da função dos neutrófilos foram observados respectivamente, valores de $0,5 \pm 0,8\%$ e $6,0 \pm 12,1\%$, para a prova não estimulada e estimulada nos animais do Grupo 1, enquanto que para os animais do Grupo 2 foram verificados $6,6 \pm 7,8\%$ e $29,9 \pm 29,5\%$. POLI & MANTELLI (1974) determinaram valores

normais do NBT para a espécie bovina encontrando valores entre 4,26% em animais com quinze dias de idades para a prova não estimulada. A diferença significativa ($p \leq 0,05$), observada entre as taxas de redução do NBT em neutrófilos de animais do Grupo 1 e do Grupo 2, está de acordo com os estudos de HAUSER et al. (1986) que verificaram que bovinos mais novos (4 a 5

semanas de idade) possuem uma menor eficiência de redução do NBT do que os animais mais velhos (9 a 11 semanas de idade), salientando ainda, que a redução da função oxidativa neutrofílica poderia aumentar a susceptibilidade de bezerros jovens às doenças.

Tabela 1 – Médias e respectivos desvios padrão do hemograma de bovinos da raça Holandesa com idade variando do nascimento até 90 dias de idade.

HEMOGRAMA	GRUPO 1 (até 30 dias de idade)	GRUPO 2 (30 a 90 dias de idade)
Eritrócitos Totais ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	7,61 \pm 1,32	7,88 \pm 1,22
Hemoglobina (g/dL)	10,6 \pm 1,1	11,4 \pm 1,2
Volume Globular (%)	34,3 \pm 5,3	34,0 \pm 3,2
VCM(fL)	46,2 \pm 7,3	43,8 \pm 3,8
CHCM(%)	31,1 _a \pm 1,8	33,6 _b \pm 2,6
Leucócitos Totais(/ μL)	11.100 \pm 3.871	11.916 \pm 2.927
Neutrófilos Bastonetes(/ μL)	44 \pm 90	0 \pm 0
Neutrófilos Segmentados(/ μL)	4.991 \pm 2.201 _a	3.700 \pm 1.677 _b
Eosinófilos(/ μL)	145 \pm 270	69 \pm 112
Basófilos(/ μL)	0 \pm 0	0 \pm 0
Linfócitos(/ μL)	5376 \pm 2368	7.690 \pm 1.985
Monócitos(/ μL)	544 \pm 381	458 \pm 315

Valores na mesma linha seguidos pelas letras a e b apresentam diferença significativa entre si ($p \leq 0,05$).

CONCLUSÕES

Não foi observada influência significativa dos fatores etários sobre o número total de eritrócitos e leucócitos na espécie bovina nos primeiros três meses de vida, contudo, foi verificada a influência significativa da idade

sobre o número absoluto de neutrófilos. Os animais mais jovens apresentaram maior valor para o número de neutrófilos, no entanto, uma menor eficiência de redução do NBT foi observada nestas células.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ayres MCC. Eritrograma de zebuínos (*Bos indicus*, LINNAEUS, 1758) da raça Nelore criados no Estado de São Paulo: avaliação da influência dos fatores etários, sexuais e do tipo racial [dissertação]. São Paulo (BR): Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 1994.

Baehner RL; Nathan DG. Chronic granulomatous disease. N. Engl. J. Med. 1968; 278:1972-4.

Biondo AW; Lopes STA; Kohayagawa A; Takahira RT; Alencar NX; . Hemograma de bovinos (*Bos indicus*) sadios da raça Nelore, no primeiro mês de vida, criados no Estado de São Paulo. Ciên. Rur. 1998; 28: 251-6.

Birgel Junior EH. O hemograma de bovinos (*Bos taurus*, LINNAEUS, 1758) da raça Jersey criados no Estado de São Paulo: influência dos fatores etários, sexuais, e da infecção pelo vírus da leucose bovina [dissertação]. São Paulo (BR): Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 1991.

Costa JN. Leucograma de zebuínos (*Bos indicus*, LINNAEUS, 1758) da raça Nelore criados no Estado de São Paulo: avaliação da influência dos fatores etários e sexuais (dissertação) São Paulo (BR): Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 1994.

- Fagliari JJ; Santana AE; Lucas FA; Campos Filho E; Curi PR. Constituintes sanguíneos de bovinos recém nascidos da raça Nelore (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*) e de bubalinos (*Bubalis bubalus*) raça Murrah. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec 1998; 50(3):253-62.
- Garcia M. Avaliação do leucograma de fêmeas bovinas da raça Holandesa preta e branca, sadias, naturalmente infectados pelo Vírus da Leucose Bovina [dissertação]. São Paulo (BR): Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 1989.
- Hauser MA ; Koob BS; James AR. Variation of neutrophil function with age in calves. Am.J.Vet.Res. 1986; 47 (1):
- Jain NC. Schalm's veterinary hematology. 4 ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1986.
- Kohayagawa A. Aspectos laboratoriais e testes de imunofluorescência indireta (IFI) para *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em bezerros da raça holandesa (*Bos taurus*) preta e branca naturalmente infectados por Babesiose e Anaplasmosse [tese]. Botucatu (SP): Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP; 1993.
- Marçal WS. Eritrograma de bovinos (*Bos taurus*, LINNAEUS, 1758), fêmeas da raça Holandesa preta e branca, sadias, criadas no Estado de São Paulo [dissertação]. São Paulo (BR): Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo;1989.
- Naghata H; Yatsu A; Noda H. The evaluation of a quantitative assay for estimating the bactericidal activity of bovine neutrophils by nitroblue tetrazolium reduction. Br.Vet. J.1986; 142: 578-84.
- Nicolleti JLM; Kohayagawa A; Gandolf W; Iamaguti P; Quintanilha AMNP. Alguns teores de constituintes séricos e hemograma em vacas da raça Gir, Holandesa preta e branca e mestiças (Girolanda), da região de Botucatu, São Paulo. Arq.Esc.Vet. Univ. Minas Gerais 1981; 33: 19-30.
- Ozkaragoz F; Rudlof HB; Rajaraman S; Mushtaha AA; Schmalstieg FC; Goldman AS. The motility of human milk macrophages in collagen gels. Pediatr. Res. 1988; 23: 449-52.
- Park BH; Fikrig SM; Smithwick EM. Infection and nitroblue tetrazolium reduction by neutrophils. Lancet 1968; 2: 532-4.
- Poli G; Mantelli F. Il test NBT negli animal domestici valori normali. La Clinica Veterinaria 1974; 97 (8) .
- Radostits M; Gay CC; Blood DC. Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs and horses. 9 ed. Londres: Saunders Company; 2000.
- Robinson JD; Stott GH; Denise SK. Effects of passive immunity on growth and survival in the dairy heifer. J. Dairy Sci. 1988; 71: 1283-7.
- Siegel S. Non parametric statistic for the behavioral science. New York: Mac Graw Hill; 1956.
- Távora JPF. Hemograma de bovinos da raça gir, girolando e holandesa criados no Estado de São Paulo. Estabelecimento dos valores de referência e avaliação das influências de fatores de variabilidade raciais, etários e sexuais [tese]. São Paulo(BR): Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 1989.
- Tennant B. Hematology of the neonatal calf: Erythrocytes and leucocytes values of normal calves. Cornell Vet. 1974; 64: 516-32.
- Tizard IR. Veterinary immunology: an introduction. 6 ed. London: Saunders Company; 2000.
- Todd AG; Whyte PBD. The effect of delays in feeding colostrum and the relationship between immunoglobulin concentration in the serum of neonatal calves and their rates of growth. Aust. Vet. J. 1995; 72: 415-7.
- Waltner TD; Martin SW; Meek AH. Dairy calf management, morbidity and mortality in Ontario Holstein herds. Prev. Vet. Med. 1986; 4: 103-171.
- White DG; Andrews AH. Adequate concentration of circulatory colostrum proteins for market calves. Vet. Rec. 1986; 119: 112-4.