

## Imunidade celular em caninos neonatos – do nascimento ao 45° dia de idade

[Cellular immunity in canine newborns – from birth to the 45<sup>th</sup> day of life]

R.P. Klein<sup>1</sup>, M.L.G. Lourenço<sup>2</sup>, F.Q. Moutinho<sup>2</sup>, R.K. Takahira<sup>2</sup>, R.S. Lopes<sup>2</sup>, R.R. Martins<sup>3</sup>,  
L.P. Machado<sup>1</sup>, V.F. Silveira<sup>4</sup>, H. Ferreira<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária – UFPI – Teresina, PI

<sup>2</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu, SP

<sup>3</sup>Faculdade de Medicina Veterinária – UEM – Umuarama, PR

<sup>4</sup>Faculdade de Medicina Veterinária – UFRB – Cruz das Almas, BA

### RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi acompanhar o desenvolvimento imunológico dos neonatos caninos, a fim de avaliar a imunidade celular pela análise dos leucócitos e linfócitos totais e das subpopulações de linfócitos T (CD4+ e CD8+) pela técnica de citometria de fluxo. Foram utilizados 30 cães neonatos de ambos os sexos, sem raça definida, aos três, 10, 17, 24, 31, 38 e 45 dias de idade. A contagem de leucócitos totais aos 45 dias ( $11.639 \pm 3.574$ ) foi significativamente maior que no terceiro dia de idade ( $8.740 \pm 1.812$ ) ( $P < 0,05$ ); não houve diferença entre a contagem total de linfócitos aos 45 dias em relação ao terceiro dia de idade. Quanto às subpopulações de LT CD4+ e LT CD8+, os percentuais de LT CD4+, aos três dias de idade ( $24,9 \pm 16,8\%$ ), foram inferiores quando comparados à média entre o 10°, o 24° e o 31° dia ( $35,5\%$ ), e os de CD8+, ao terceiro dia, menores em relação às médias do 10° e do 31° dia de idade. Pode-se concluir que as subpopulações de LT CD4+ e CD8+ sofrem oscilações durante o desenvolvimento pós-natal, sendo estas crescentes em relação aos níveis obtidos aos três dias de idade. A relação CD4+:CD8+ mostrou superioridade para o primeiro tipo celular, sendo que a maior relação entre CD4+ e CD8+ ocorreu no terceiro dia de idade. Com base nos resultados obtidos neste estudo, notaram-se as diferenças semanais nas populações linfocitárias, o que demonstra a dinâmica dessas células durante o período neonatal.

Palavras-chave: caninos, células linfocíticas, neonatologia

### ABSTRACT

*The aim of this study was to evaluate the immune development of newborn canines, evaluating the cellular immunity by analysis of leukocyte and lymphocyte totals and sub-population of T lymphocytes (CD4+ and CD8+) by the flow cytometry technique. Thirty neonatal mongrel dogs of both sexes were used, at 3, 10, 17, 24, 31, 38 and 45 days of age. The total leukocyte count to 45 days ( $11639 \pm 3574/\mu\text{L}$ ) was significantly greater than on the third day of age ( $8740 \pm 1812$ ) ( $p < 0.05$ ); There were no differences between the total count of lymphocytes at 45 days in relation to the third day of age. As for the subpopulations of CD4+ and CD8+, CD4+ cell percentages, at three days of age ( $24.9 \pm 16.8$ ) they were inferior when compared to the average between the 10<sup>th</sup>, 24<sup>th</sup> and 31<sup>st</sup> day ( $35.5$ ), and CD8+ cells, on the third day, were lower compared with averages from the 10<sup>th</sup> and 31<sup>st</sup> day of age. It can be concluded that the subpopulations of CD4+ and CD8+ cells undergo oscillations during development, with growing postnatal levels obtained at three days old. The CD4:CD8 ratio showed superiority to the first cell type, and the largest relationship between CD4+ and CD8+ occurred on the third day of age. Based on the results obtained in this study, the differences noted in lymphocyte populations weekly showed the dynamics of these cells during the neonatal period.*

Keywords: canines, lymphocytic cells, neonatology

---

Recebido em 18 de julho de 2012

Aceito em 20 de dezembro de 2013

E-mail: mege@uol.com.br

## INTRODUÇÃO

A importância do conhecimento sobre o desenvolvimento pós-natal do sistema imune em cães é indispensável para a avaliação da imunocompetência, com vistas aos possíveis efeitos em seu desempenho. Após o nascimento, os cães neonatos são imediatamente expostos a um ambiente rico em microrganismos, sendo vulneráveis às invasões microbianas. A proteção pelos anticorpos maternos adquiridos pelas vias placentária e colostrar deverá ser capaz de debelar, em um curto espaço de tempo, qualquer infecção que se estabeleça (Landim-Alvarenga, 2006; Morein *et al.*, 2007a; Morein *et al.*, 2007b). O acesso dos neonatos ao colostro nas primeiras 48 horas de vida é indispensável, pois este, além de conter os nutrientes para o crescimento dos filhotes, possui, também, anticorpos, células e proteínas específicas, que vão desempenhar proteção inicial contra doenças infecciosas (Poffenbarger *et al.*, 1991; Bouchard *et al.*, 1992; Salmon, 1999; Hoskins, 2001; Grundy, 2006; Day, 2007; Morein *et al.*, 2007).

No colostro e no leite está presente um número significativo de linfócitos T (LT) e B (LB), macrófagos e células polimorfonucleares, que executam a importante função de prevenir e controlar infecções, limitar a multiplicação bacteriana e eliminar os microrganismos da própria glândula mamária (Opdebecg, 1982; Poffenbarger *et al.*, 1991; Evermann e Wills, 2011). Essas células, precocemente absorvidas pela via gastrointestinal após a ingestão do colostro nas primeiras 24 horas após o nascimento, podem também auxiliar os recém-nascidos no estabelecimento da imunidade celular local (Poffenbarger *et al.*, 1991; Chappuis, 1998; Day, 2007).

O sistema imunológico adaptativo mediado por células, após a estimulação antigênica, sofre expansão clonal, e uma grande população de LT específicos ao antígeno é formada. A proliferação de linfócitos é, portanto, um dos pré-requisitos para que o organismo desenvolva uma imunidade funcional. Os LT *helper* desempenham um papel central na promoção e regulação da resposta imune. Quando um antígeno exógeno processado pelos macrófagos, células dendríticas ou por células B é apresentado aos LT *helper*, estes são ativados e secretam uma variedade de citocinas

fundamentais na ativação de LB, LT citotóxicos e dos próprios macrófagos. Os LT citotóxicos ativados desempenham uma função vital ao monitorarem as células do organismo e destruírem antígenos endógenos, como no caso de células infectadas por vírus e células tumorais (Lydyard e Grossi, 1994; Williams, 1997; Tizard, 2008).

As pesquisas sobre os valores normais de leucócitos e linfócitos de neonatos caninos são bastante escassas. Em gatos e em cães, a imunofenotipagem tem sido também utilizada com a finalidade de se caracterizar a influência da idade nas distribuições das subpopulações de LT.

Um dos primeiros estudos publicados sobre a dinâmica da população linfocitária em cães neonatos da raça Beagle (Earl, 1973) verificou que, na primeira semana de vida, o valor absoluto dos linfócitos apresentava-se mais elevado quando comparado ao primeiro dia de idade. Progressivamente, com o passar das semanas, uma leve diminuição foi observada, sendo intercalada com flutuações nas semanas subsequentes. Thoman e Weigle (1989) e Jain (2000) descreveram predominância de linfócitos em relação aos neutrófilos na primeira semana de idade em cães neonatos da mesma raça.

Além de alterações nas concentrações de imunoglobulinas séricas durante o desenvolvimento neonatal em cães, há alterações no número e na proporção dos leucócitos do sangue e tecidos (particularmente linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e linfócitos B) que perduram durante o primeiro ano de vida.

A natureza qualitativa do sistema imunológico no recém-nascido é reflexo dos diversos fatores *in utero* que deliberadamente modulam o sistema imunológico para que a prenhez e o desenvolvimento fetal progridam. Tais eventos modulatórios durante a prenhez, particularmente o desequilíbrio entre os subgrupos de linfócitos CD4<sup>+</sup> (LT *helper* 1 e 2), estendem-se ao período neonatal (Day, 2007).

O período neonatal é caracterizado por uma fase crítica de desenvolvimento dos diversos sistemas, particularmente o imunológico. A imaturidade imunológica predispõe o filhote a uma série de infecções e à alta taxa de

mortalidade. A vacinação durante as primeiras semanas de vida tem sido atualmente investigada, na tentativa de se obter sucesso frente à imaturidade imunológica e à presença de anticorpos maternos. Os estudos quanto ao desenvolvimento imunológico celular em cães são escassos, a despeito da alta taxa de mortalidade neonatal nesta espécie. Objetivou-se, portanto, com o presente estudo, descrever a cinética do desenvolvimento imunológico em cães neonatos, a fim de se caracterizar a resposta imune celular-mediada demonstrada durante o período neonatal em cães, quantificando as subpopulações de LT CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no sangue periférico.

### MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 30 cães neonatos, compreendendo 14 machos e 16 fêmeas, sem raça definida, com média de peso de 334g ao nascimento e 1,267g aos 45 dias de idade, provenientes de cinco cadelas, a partir do terceiro dia de vida até 45 dias de vida.

Todos os animais, a partir do terceiro dia de idade até o 10º dia, foram submetidos ao exame físico neonatal indicado por Peterson (2011) e Casal (2010) e posteriormente, uma vez por semana, até completarem 45 dias de idade. O acompanhamento do desenvolvimento dos neonatos quanto ao ganho de peso, por meio de pesagem em balança com escala em gramas, foi realizado do terceiro ao 10º dia do nascimento e após, semanalmente, até 31 dias de idade.

Do nascimento até o 25º dia de idade, os filhotes foram mantidos em companhia de suas respectivas mães em maternidades. A amamentação exclusivamente materna foi realizada até o 20º dia de idade. A partir do 21º dia de idade, foi iniciado o desmame com uma dieta pastosa à base de leite desnatado e farináceo fornecidos três vezes ao dia (Hoskins, 2001). Os filhotes foram desverminados com anti-helmíntico fembendazole (50 mg/kg), uma vez ao dia, durante três dias consecutivos, conforme proposto pelo *Companion Animal Parasite Control Guidelines* (CAPC) (Peterson, 2011).

Aos 28 dias de idade, foi iniciada a alimentação com leite desnatado e ração comercial para filhotes em crescimento, intercalados com as mamadas. Aos 35 dias, completamente

desmamados e separados de suas mães, passaram a receber apenas a ração para filhotes em crescimento, oferecida quatro vezes ao dia. Todos os neonatos selecionados para este trabalho tiveram as mesmas condições de manejo. Durante o experimento, estes permaneceram com suas respectivas mães e receberam todos os cuidados de acomodação.

Os neonatos foram imobilizados por contenção manual em superfície aquecida e macia, e amostras de sangue foram colhidas pela veia jugular com seringa de 1mL e agulha 22 G, aos três, 10, 17, 24, 31, 38 e 45 dias de vida dos neonatos, correspondendo aos momentos um a sete (M1 a M7). As amostras foram colocadas em frascos identificados contendo o anticoagulante ácido etilenodiamonotetracético (EDTA) a 10% (Paxton *et al.*, 1989). Todas as amostras foram colhidas pela manhã para eliminarem-se os efeitos da variação diurna (Malone *et al.*, 1990). Após as colheitas, foram realizados o leucograma e as determinações das imunofenotipagens das subpopulações linfocitárias T. As contagens de leucócitos totais foram realizadas no contador eletrônico de células. As contagens de linfócitos foram realizadas em esfregaços sanguíneos corados pelo método panótico (Laborclin, Brasil).

Para as quantificações dos LT CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> foram usados, respectivamente, os testes *rat anti-canine CD4/FITC* (Serotec Ltda. Kidlington, Oxford, Inglaterra), na concentração de 0,1mg/mL de IgG diluído para uso, e *rat anti-canine CD8/RPE* (Serotec Ltda. Kidlington, Oxford, Inglaterra). Os controles negativos (isotipos) utilizados foram o *rat IgG2a negative control/FITC* (Serotec Ltda. Kidlington, Oxford, Inglaterra), diluído para uso, na concentração de 10mg/mL de IgG, e o *rat IgG1 isotype control/ control/RPE* liofilizado (Serotec Ltda. Kidlington, Oxford, Inglaterra), que foi reconstituído com 1mL de água destilada, de acordo com a técnica descrita por Dean *et al.* (1991) e Wheeless (1991).

Para as análises em citômetro de fluxo das subpopulações linfocitárias do sangue periférico canino, as concentrações de leucócitos da amostra sanguíneas encontravam-se entre 5.000 a 10.000 leucócitos/ $\mu$ L. As duas medidas celulares foram representadas em um histograma (ou gráfico de pontos), estando registrado na

ordenada o *Forward Scatter* (FSC) e na abscissa o *Side Scatter* (SSC). Os valores obtidos dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> foram expressos em porcentagens (Wheless, 1991; Nakage *et al.*, 2005).

Para obtenção das estatísticas descritivas para as variáveis dos exames hematológicos, utilizou-se o procedimento computadorizado PROC MEANS. Adotou-se o procedimento PROC ANOVA do programa supracitado, e, quando verificados efeitos significativos ( $P < 0,05$ ) nas análises de variância entre os efeitos principais, aplicou-se o teste de Tukey para discriminar as possíveis igualdades ou diferenças entre os momentos.

## RESULTADOS

O acompanhamento dos neonatos quanto ao ganho de peso, do terceiro ao 10<sup>o</sup> dia do nascimento, e após, semanalmente, até 31 dias de vida, revelou elevação contínua tanto na fase de amamentação, como após o início da alimentação pastosa, que ocorreu no 21<sup>o</sup> dia do nascimento. A partir da primeira pesagem (334g) até a última, realizada aos 31 dias de vida (1267g), o ganho médio de peso foi próximo dos 379g.

A contagem de leucócitos totais nas amostras de sangue periférico de neonatos de três a 45 dias de idade foi semelhante aos três e aos 17 dias (média entre dois momentos = 8.785 leucócitos/ $\mu$ L), contudo menores que aos 24 e 45 dias de idade (média entre dois momentos = 11.601 leucócitos/ $\mu$ L). Ressalta-se que, aos 45 dias (11.639 $\pm$ 3.574), a contagem foi significativamente maior que no terceiro dia de idade (8.740 $\pm$ 1.812) ( $p = 0,004$ ) (Tab. 1) (Fig. 1).

Os valores de CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> foram expressos em porcentagens de células positivas marcadas em histograma (Fig. 3) provenientes dos filhotes, visando, assim, à comparação dos percentuais obtidos no citômetro com os valores absolutos calculados com base no número total de linfócitos (Tab. 2).

Na análise dos linfócitos totais, foram observadas diferenças significativas entre alguns momentos. Assim, no terceiro e no 17<sup>o</sup> dias de idade, o número absoluto de linfócitos foi semelhante (média entre dois momentos = 2.486 linfócitos/ $\mu$ L), embora menor, quando comparado ao 10<sup>o</sup>, 24<sup>o</sup> e 31<sup>o</sup> dias (média entre dois momentos = 3.617 linfócitos/ $\mu$ L). No 45<sup>o</sup> dia (3.194 $\pm$ 1.197), não houve diferença ( $p = 0,123$ ) em relação ao terceiro dia de idade (2.340 $\pm$ 740) (Tab. 1) (Fig. 2).

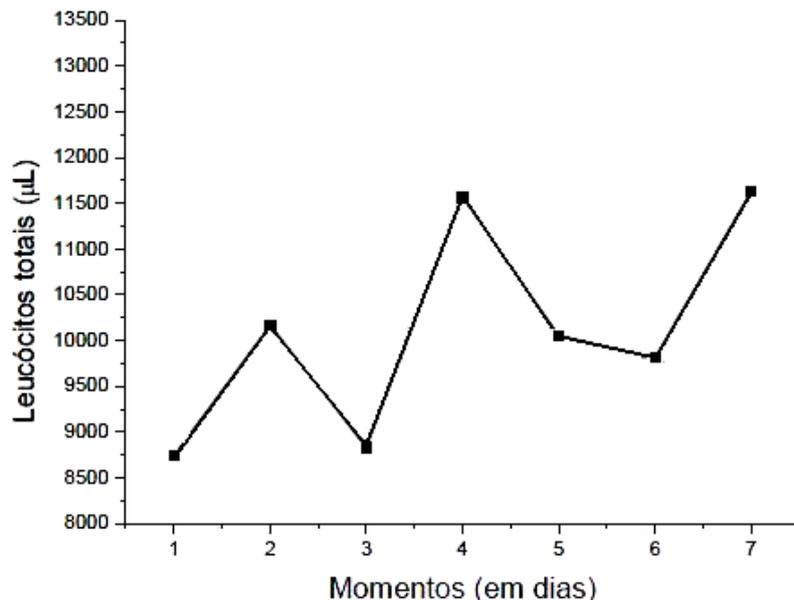


Figura 1. Representação gráfica da evolução das médias dos leucócitos totais ( $\mu$ L) do sangue periférico de cães neonatos aos três, 10, 17, 24, 31, 38 e 45 dias de idade.

*Imunidade celular em caninos...*

Tabela 1. Médias e desvios-padrão da contagem de leucócitos totais ( $\mu\text{L}$ ), dos linfócitos totais ( $\mu\text{L}$ ), dos percentuais das subpopulações de linfócitos T  $\text{CD4}^+$  e  $\text{CD8}^+$  e das relações das subpopulações de linfócitos T  $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$  do sangue periférico de cães neonatos aos três, 10, 17, 24, 31, 38 e 45 dias de idade

	Momentos							p
	3 dias	10 dias	17 dias	24 dias	31 dias	38 dias	45 dias	
Leucócitos totais ( $\mu\text{L}$ )	8.740 $\pm$ 1812b	10.170 $\pm$ 2.442ab	8.831 $\pm$ 2.014b	11.563 $\pm$ 2.640a	10.058 $\pm$ 2.392ab	9.815 $\pm$ 2.156ab	11.639 $\pm$ 3.574a	p=0,014
Linfócitos totais ( $\mu\text{L}$ )	2.340 $\pm$ 740b	3.449 $\pm$ 942a	2.632 $\pm$ 992b	3.957 $\pm$ 1.526a	3.447 $\pm$ 1.293a	3.178 $\pm$ 884ab	3.194 $\pm$ 1.197ab	p=0,017
Linfócitos T $\text{CD4}^+$ (%)	24,9 $\pm$ 16,8	36,8 $\pm$ 8,4	35,1 $\pm$ 10,4	35,5 $\pm$ 5,9	34,2 $\pm$ 19,4	33,5 $\pm$ 9,9	30,2 $\pm$ 9,7	
$\text{CD4}^+$ (células/ $\mu\text{L}$ )	565 $\pm$ 426b	1267 $\pm$ 413a	915 $\pm$ 407ab	1375 $\pm$ 544a	1207 $\pm$ 912a	1075 $\pm$ 485ab	996 $\pm$ 530ab	p=0,039
Linfócitos T $\text{CD8}^+$ (%)	2,7 $\pm$ 1,4	8,2 $\pm$ 3,7	12,1 $\pm$ 3,6	12,8 $\pm$ 4,7	7,2 $\pm$ 4,1	10,7 $\pm$ 5,2	10,5 $\pm$ 3,0	
$\text{CD8}^+$ (células/ $\mu\text{L}$ )	58 $\pm$ 31c	285 $\pm$ 140b	315 $\pm$ 129a	516 $\pm$ 320a	246 $\pm$ 144b	330 $\pm$ 191ab	348 $\pm$ 179ab	p<0,001
$\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$	10 $\pm$ 5a	5 $\pm$ 3ab	3 $\pm$ 1b	3 $\pm$ 1b	5 $\pm$ 5ab	4 $\pm$ 2b	3 $\pm$ 1b	p<0,001

\*Médias seguidas por letras minúsculas distintas na linha apresentam diferenças entre si (Tukey  $P<0,05$ ). M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7= três, 10, 17, 24, 31, 38 e 45 dias de idade.

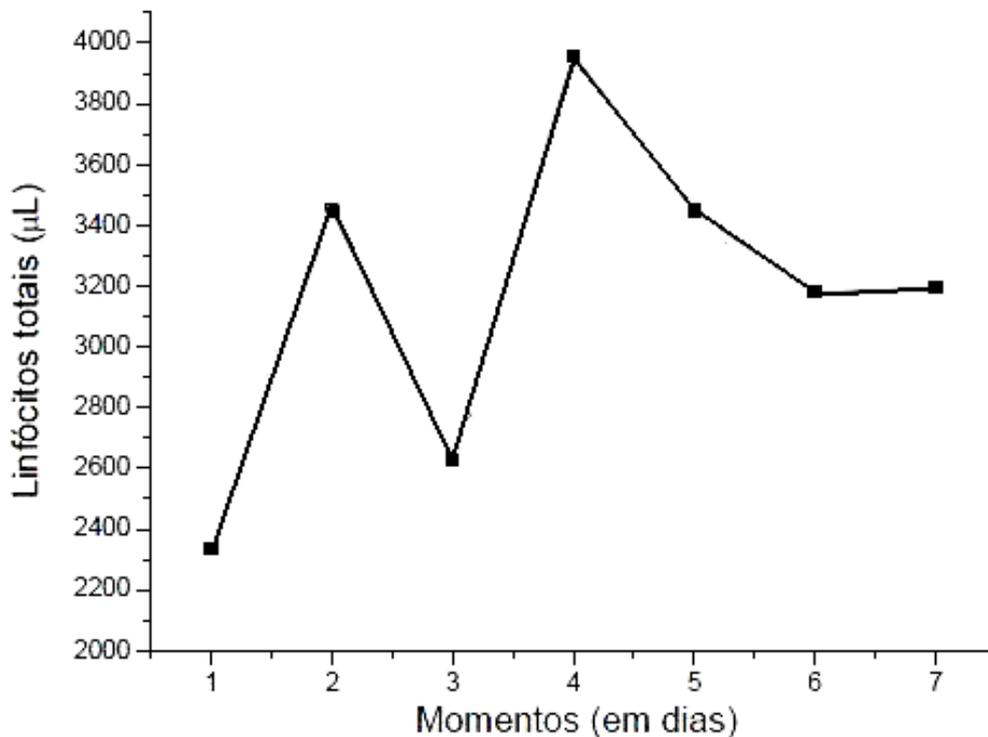
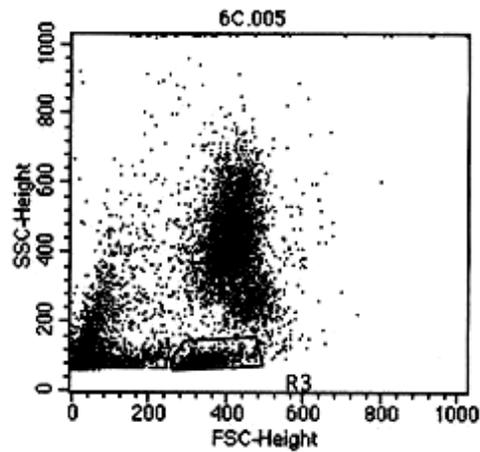
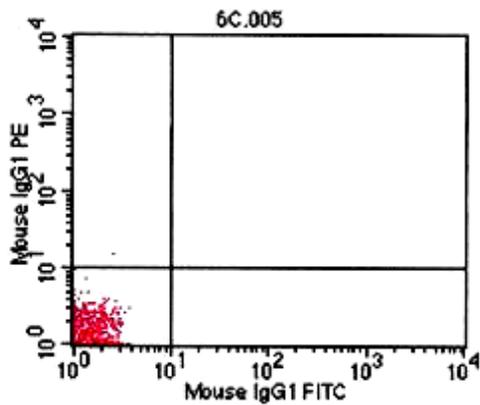


Figura 2. Representação gráfica da evolução das médias dos linfócitos totais ( $\mu\text{L}$ ) do sangue periférico de cães neonatos aos três, 10, 17, 24, 31, 38 e 45 dias de idade.



**A**

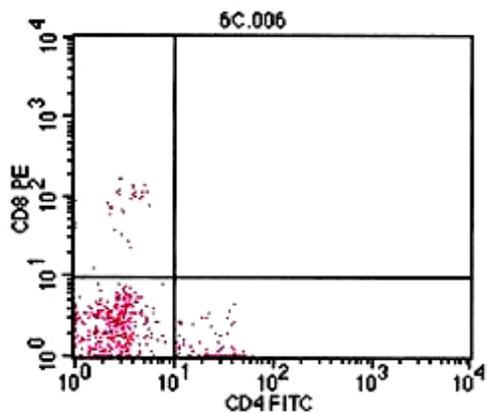


**B**

Sample ID: 6C  
Tube: controle IgG1

Gate: G3  
Gated Events: 658

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	1	0.15	0.01
UR	0	0.00	0.00
LL	657	99.85	6.57
LR	0	0.00	0.00



**C**

Sample ID: 6C  
Tube: CD4/CD8

Gate: G3  
Gated Events: 465

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	31	6.67	0.31
UR	1	0.22	0.01
LL	320	68.82	3.20
LR	113	24.30	1.13

Figura 3. Representação gráfica da análise por citometria de fluxo do sangue periférico do neonato canino. Histograma de FSC x SSC para delimitar as populações leucocitárias e *gating* em região de linfócitos (A). Divisão do histograma em quatro quadrantes (*UL*: *upper left*, superior esquerdo; *UR*: *upper right*, superior direito; *LL*: *lower left*, inferior esquerdo e *LR*: *lower right*, inferior direito) e região marcada de negatividade (LL) (B). Histograma de parâmetros de linfócitos marcados com dois anticorpos monoclonais expressos nos quadrantes superior esquerdo (UL) e inferior direito (LR), correspondendo, respectivamente, aos linfócitos T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> (C).

Tabela 2. Comparação das médias e desvios-padrão ( $\pm$ ) das relações das subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup>, do sangue periférico, marcados com anticorpos monoclonais *rat anti-canine* CD4<sup>+</sup> conjugados ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) e *rat anti-canine* CD8<sup>+</sup> conjugados à ficoeritrina (PE) e analisadas no citômetro de fluxo, de cães neonatos aos três, 10, 17, 24, 31, 38 e 45 dias de idade

T CD4 <sup>+</sup> :CD8 <sup>+</sup>	Momentos							p
	3 dias	10 dias	17 dias	24 dias	31 dias	38 dias	45 dias	
<b>1</b>	10 $\pm$ 5	5 $\pm$ 3	3 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1	5 $\pm$ 5	4 $\pm$ 2	3 $\pm$ 1	p = 0,448
<b>2</b>	10 $\pm$ 5	5 $\pm$ 2	3 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1	7 $\pm$ 7	4 $\pm$ 2	3 $\pm$ 1	

1 Calculados utilizando-se as médias das relações CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup> de cada animal

2 Calculados utilizando-se o número total de linfócitos (células/ $\mu$ L) com base nos percentuais obtidos na citometria de fluxo.

Quanto ao comportamento dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e à evolução da relação CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup>) do sangue periférico, os resultados demonstraram diferenças ( $P < 0,05$ ).

O número absoluto de LT CD4<sup>+</sup>, aos três dias de idade (565 $\pm$ 426 células/ $\mu$ L) (Tab. 1), foi inferior à média entre o 10<sup>o</sup> (1267 $\pm$ 413 células/ $\mu$ L; p=0,006), o 24<sup>o</sup> (1375 $\pm$ 544 células/ $\mu$ L; p=0,002) e o 31<sup>o</sup> dia (1207 $\pm$ 912 células/ $\mu$ L; p=0,012), semelhantes entre si (Fig. 4).

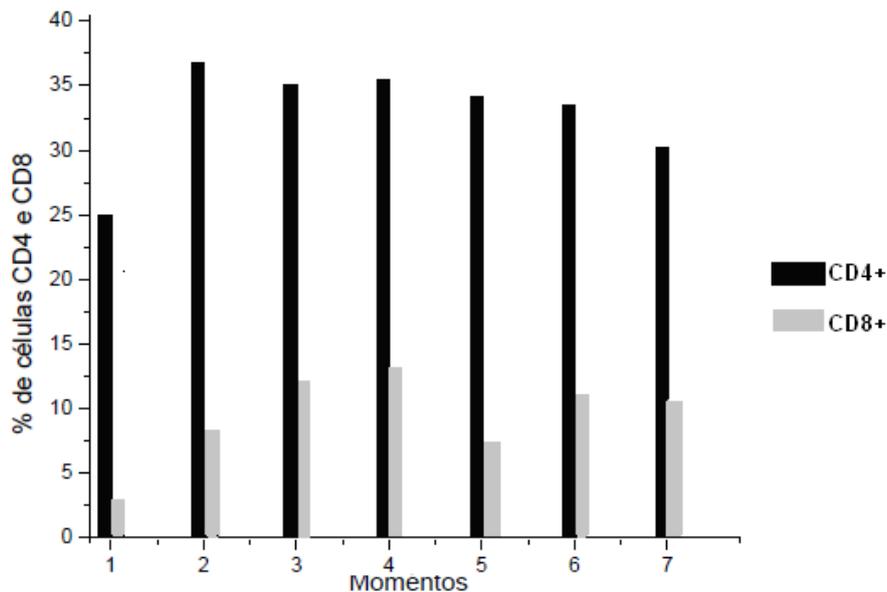


Figura 4. Representação gráfica da evolução das médias dos percentuais das subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, do sangue periférico, marcados com anticorpos monoclonais *rat anticanine* CD4<sup>+</sup> conjugados ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) e *rat anti-canine* CD8<sup>+</sup> conjugados à ficoeritrina (PE) e analisadas no citômetro de fluxo, de cães neonatos aos três, 10, 17, 24, 31, 38 e 45 dias de idade correspondendo, respectivamente, aos momentos M1 a M7.

Com relação aos LT CD8<sup>+</sup>, também ocorreu diferença significativa, sendo a média no terceiro dia (58 $\pm$ 31 células/ $\mu$ L) (Tab. 1) menor do que as médias do 10<sup>o</sup> (285 $\pm$ 140 células/ $\mu$ L; p = <0,001) e do 31<sup>o</sup> dia (246 $\pm$ 144 células/ $\mu$ L; p = 0,003), que foram semelhantes e menores que no 17<sup>o</sup> (315 $\pm$ 129 células/ $\mu$ L; p <0,001) e no 24<sup>o</sup> dia de idade (516 $\pm$ 320 células/ $\mu$ L; P<0,001) (Fig. 4).

Na análise da relação CD4:CD8 entre momentos, constataram-se diferenças significativas (p<0,001). Ao terceiro dia de idade, a relação CD4:CD8 (10 $\pm$ 5) (Tab. 1) foi maior que aos 17, 24, 38 e 45 dias que apresentaram médias iguais (média entre quatro momentos = 3,5) (Fig. 5).

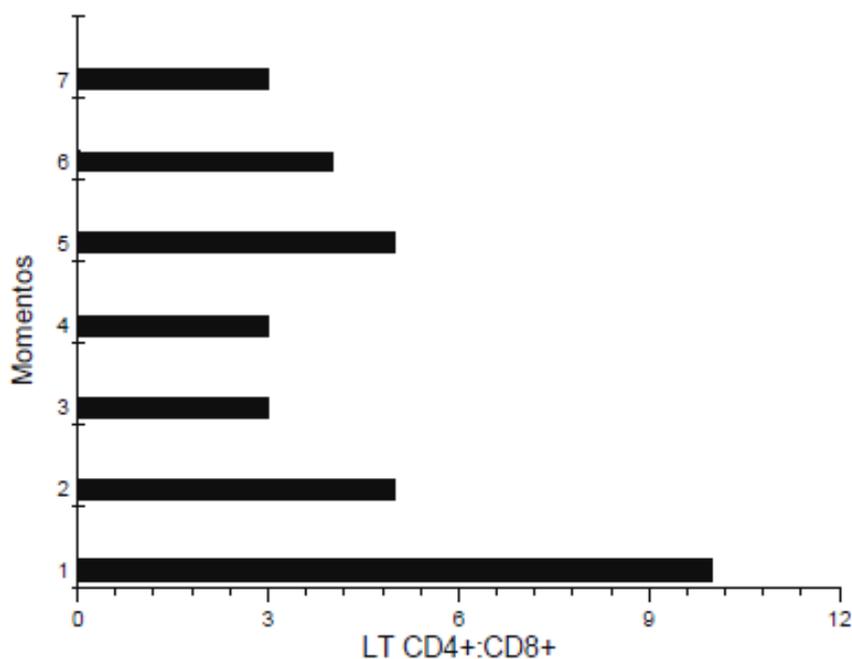


Figura 5. Representação gráfica das relações das subpopulações de linfócitos T CD4+ e CD8+, do sangue periférico, marcados com anticorpos monoclonais *rat anti-canine* CD4+ conjugados ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) e *rat anti-canine* CD8+ conjugados à ficoeritrina (PE) e analisadas no citômetro de fluxo, de cães neonatos aos três, 10, 17, 24, 31, 38 e 45 dias de idade, correspondendo, respectivamente, aos momentos M1 a M7.

No desenvolvimento pós-natal das subpopulações linfocitárias a partir do 10º dia, a população de LT CD4+ demonstrou um processo de elevação significativa ( $p=0,006$ ), quando comparada ao terceiro dia, mantendo-se sempre acima até o 45º dia (Tab. 1) (Fig. 4). Quanto ao LT CD8+, a elevação foi também significativa ( $p<0,001$ ) em relação ao terceiro dia, contudo caracterizada por oscilações nas médias dos momentos de três pontos percentuais (Tab. 1) (Fig. 4).

## DISCUSSÃO

Ao se analisar o comportamento dos leucócitos totais em cada momento, pôde-se verificar a ocorrência de oscilações dos leucócitos e linfócitos totais durante as avaliações semanais, porém sempre superiores aos níveis basais.

O desenvolvimento imunológico do cão neonato é pobremente compreendido, sendo a maioria dos estudos realizados em animais com mais de 12 meses de idade, considerados imunocompetentes (Day *et al.*, 2007). Durante o período fetal, as regulações imunológicas materna e placentária inibem a função dos

linfócitos T *helper* 1 e amplificam a função dos linfócitos T *helper* 2. Este delicado balanço envolve a liberação e a inibição de uma série de citocinas, permitindo que a prenhez prossiga e o feto se desenvolva (Morein *et al.*, 2007a; Hodgins e Shewen, 2012).

A modulação da resposta imunológica materno-placentária-fetal perdura durante o período neonatal, sendo a resposta imune celular mediada em neonatos aquém daquela detectada no cão adulto. Os linfócitos neonatais apresentam uma resposta incipiente diante da estimulação antigênica. A imaturidade imunológica caracteriza-se pela capacidade reduzida da expressão de receptores e marcadores das células apresentadoras de antígenos (células dendríticas) bem como dos antígenos de histocompatibilidade maior (MHC II) e consequente sinalização e estimulação para expansão clonal linfocítica. As variações na contagem absoluta de leucócitos e de linfócitos encontradas no presente estudo refletem a incapacidade do sistema imune neonatal até os 45 dias de idade frente à exposição antigênica de aumentar o número absoluto de linfócitos de

forma consistente. De acordo com Day *et al.* (2007), durante os primeiros três meses de idade, os filhotes apresentam uma elevada contagem de linfócitos, superior aos valores descritos para adultos; é provável, portanto, que isto ocorra com mais de 45 dias de idade e sob estímulo vacinal.

Os valores descritos por Faldyna *et al.* (2001), em neonatos caninos de cinco a seis dias de vida da raça Beagle (45,6% para CD4 e 7,7% para CD8), e por Toman *et al.* (2002), em neonatos da mesma raça com um dia de vida (36,9% para

CD4 e 2,7% para CD8), foram superiores quando comparados aos valores encontrados no presente estudo. Entretanto, a relação CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup> dos neonatos deste estudo (sem raça definida) no terceiro dia de idade foi superior à obtida por Faldyna *et al.* (2001) e não descrita por Toman *et al.* (2002) (Tab. 3). De acordo com Faldyna *et al.* (2001) e Evermann e Wills (2011), além da idade e do número de animais avaliados, principalmente, as diferenças genóticas entre raças podem provocar variação na atividade do sistema imune.

Tabela 3. Médias e desvios-padrão da contagem de linfócitos totais (µL), dos percentuais das subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e das relações das subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> do sangue periférico em cães neonatos do presente estudo e segundo os diferentes autores

Autores	Idade	Linfócitos (/µL)	CD4 <sup>+</sup> (%)	CD8 <sup>+</sup> (%)	CD4 <sup>+</sup> :CD8 <sup>+</sup>
Klein <i>et al.</i> (2014)	3 dias	2.340±740	24,9±16,8	2,7±1,4	10±5
	10 dias	3.449±942	36,8±8,4	8,2±3,7	5±3
	17 dias	2.632±992	35,1 ±10,4	12,1±3,6	3±1
	24 dias	3.957±1.526	35,5 ±5,9	12,8±4,7	3±1
	31 dias	3.447±1.293	34,2 ±19,4	7,2±4,1	5±5
	38 dias	3.178±884	33,5±9,9	10,7±5,2	4±2
	45 dias	3.194±1.197	30,2±9,7	10,5±3,0	3±1
Toman <i>et al.</i> (2002)	1 dia	-	36,9±5,2	2,7±0,4	-
	7 dias	-	48,8±8,0	5,9±3,6	-
	14 dias	-	42,3±6,8	9,5±2,3	-
	21 dias	-	35,6±9,5	13,8±2,5	-
	28 dias	-	42,1±6,3	10,1±3,6	-
	2 meses	-	42,1±6,1	13,4±5,2	-
	3 meses	-	39,4±7,9	12,8±3,5	-
Adultos	-	45,9±7,4	18,9±3,3	-	
Faldyna <i>et al.</i> (2001)	5-6 dias	5.510±1.200	45,6±7,9	7,7±3,4	7,0±3,3
	2 meses	5.020±920	42,2±8,9	7,4±3,2	6,6±3,1
	6 meses	3.930±610	45,4±2,0	12,2±2,5	3,8±0,7
	1-2 anos	2.960±540	45,9±7,4	18,9±3,3	2,5±0,6
	3-5 anos	3.440±1200	45,5±7,5	17,5±5,8	2,8±0,8
	> 5 anos	2.760±940	40,3±4,2	23,1±3,8	1,8±0,5

Valores percentuais de CD4<sup>+</sup> superiores aos de CD8<sup>+</sup>, que sempre ocorreram durante o estudo, no entanto, devem ser considerados como dentro dos padrões de normalidade para neonatos (Greeley *et al.*, 1996; Sellon *et al.*, 1996; Faldyna *et al.*, 2001; Toman *et al.*, 2002; Evermann e Wills, 2011). Este fato deve ser considerado importante, uma vez que a subpopulação de linfócitos T *helper* CD4<sup>+</sup> desempenha papel fundamental na regulação da resposta imunológica (Williams, 1997; Hoskins, 2001; Lydyard e Grossi, 2003; Tizard, 2008),

justificando, assim, a sua presença em níveis superiores aos de LT CD8<sup>+</sup>, ocorrida em toda a fase de avaliação. De acordo com Day *et al.* (2007), embora a porcentagem de CD4<sup>+</sup> permaneça relativamente estável em cães até um ano de idade, CD8<sup>+</sup> apresenta-se mais baixo ao nascimento e sofre elevação com o progredir da idade.

Ao se compararem os percentuais de LT CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> encontrados com os descritos por Toman *et al.* (2002), Day (2007) e Evermann e Wills

(2011) em neonatos entre a primeira e a quarta semanas de idade, verificou-se que os percentuais dessas células, ao longo das semanas avaliadas, foram inferiores quando comparados aos adultos, porém a ocorrência de variações das subpopulações linfocitárias foi demonstrada também em ambos os estudos. Este aspecto denota que a função imunológica específica é geneticamente determinada de acordo com a raça, sendo os padrões de resposta antigênica variáveis de acordo com a raça em questão (Kennedy *et al.*, 2005).

É importante salientar que a influência da idade nas distribuições das subpopulações de LT CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, demonstradas nas pesquisas realizadas principalmente em gatos e cães adultos (English *et al.*, 1994; Greeley *et al.*, 1996; Faldyna *et al.*, 2001; Nakage *et al.*, 2005), mostrou padrões de diminuição dos LT CD4<sup>+</sup> e aumento de CD8<sup>+</sup>, promovendo a queda da relação CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup>. Segundo alguns autores, isto sugere uma relação entre o envelhecimento do animal, a involução do timo e o declínio da resposta imunológica que resultaram na depressão da atividade dos LT CD4<sup>+</sup>, importante por desempenhar um papel central na promoção e regulação da resposta imune (Makinoden e Kay, 1980; Gillis *et al.*, 1981; Murasko *et al.*, 1987; Thoman e Weigle, 1989; Beckman *et al.*, 1991; Song *et al.*, 1993). Contudo, a involução tímica no cão ocorre durante o primeiro ano de idade, sendo o declínio progressivo entre seis e 23 meses de idade (Ploeman *et al.*, 2003).

Neste aspecto, nas avaliações realizadas, bem como nas de Toman *et al.* (2002), em concordância ao proposto anteriormente, observou-se uma diminuição discreta dos LT CD4<sup>+</sup> e elevação de CD8<sup>+</sup> no final do período neonatal. Portanto, acredita-se que tal fato decorra da imaturidade da função linfocitária, uma vez que os linfócitos T expressam moléculas de MHC II em sua superfície, contudo essa expressão se desenvolve de forma mais proeminente com o progredir da idade no cão, de acordo com Holmes e Lunn (1994).

A obtenção das quantificações das subpopulações de LT CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, apesar de recente, tem sido utilizada tanto em estudos de mapeamento dos padrões normais quanto no auxílio de uma melhor caracterização de enfermidades em seres humanos (Nakage *et al.*,

2005), sendo já praticada com certa rotina em laboratórios humanos. Na veterinária, no entanto, a técnica de citometria de fluxo apresenta-se em franco desenvolvimento em diversas pesquisas, o que demonstra sua aplicabilidade no conhecimento do comportamento dos linfócitos em algumas enfermidades dos animais domésticos (May *et al.*, 1992; Chabanne *et al.*, 1995).

Durante o período neonatal, a imunidade passiva materna, transferida por meio da ingestão do colostro nas primeiras horas de vida, confere proteção aos neonatos até que seu sistema imune esteja apto. Embora o neonato seja capaz de responder imunologicamente a um estímulo antigênico, a magnitude da resposta é inferior quando comparada à do adulto. O *status* imunológico e a magnitude da resposta aos diversos estímulos antigênicos apresentam-se adequados somente acima de um ano de idade, particularmente no que se refere aos níveis de anticorpos. A quantificação das subpopulações de linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> obtidos neste estudo, inferiores aos descritos para animais adultos, demonstra que, durante o período neonatal, a resposta imune mediada por células também necessita de maior tempo hábil para seu desenvolvimento e atuação.

Nas falhas de transferência de imunidade passiva, a vacinação precoce faz-se necessária para a proteção do filhote, contudo o entendimento do desenvolvimento imunológico do filhote e da resposta à estimulação antigênica de forma tão precoce é fundamental.

O peso corporal é um dos aspectos mais importantes do exame físico dos animais jovens (Hoskins, 2001; Casal, 2010). O desenvolvimento dos neonatos tendo como base o ganho de peso relativo ao período do terceiro ao 10º dia do nascimento e após, semanalmente, até 31 dias de vida, mostrou-se adequado para esta fase. Mesmo se considerando a variabilidade de pesos obtidos, por se tratarem de animais sem raça definida e de paternidade desconhecida, o ganho de peso médio diário encontrou-se dentro da faixa dos padrões gerais para filhotes caninos de 1 a 2g/dia (Hoskins, 2001). De acordo com Chappuis (1998) e Day *et al.* (2007), a taxa de crescimento dos neonatos correlaciona-se à velocidade de degradação dos anticorpos maternos adquiridos, sendo superior nas raças

com crescimento mais rápido. Este fato, portanto, deve ser considerado e mais efetivamente pesquisado, particularmente a imunização do filhote, em raças de grande porte que apresentam maior taxa de crescimento.

### CONCLUSÕES

As subpopulações de LT CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> sofrem oscilações, sendo a quantificação durante o desenvolvimento pós-natal imediato (aos três dias de vida) e durante todo o período neonatal inferior ao descrito para cães adultos. Há elevação em relação aos níveis obtidos aos três dias de idade, no entanto níveis semelhantes aos dos adultos não ocorrem durante o período neonatal, fato que deve ser considerado particularmente quando há necessidade de imunização precoce do neonato com falha de transferência de imunidade passiva.

### REFERÊNCIAS

- BECKMAN, I.; DIMOPOULOS, K.; XU, X.; AHERN, M. *et al.* Age related changes in the activation requirements of human CD4<sup>+</sup> T cell subsets. *Cell. Immunol.*, v.132, p.17-25, 1991.
- BOUCHARD, G.; PLATA-MADRID, H.; YOUNGQUIST, R.S. *et al.* Absorption of an alternate source of immunoglobulin in pups. *Am. J. Vet. Res.* v.53, p.230-233, 1992.
- CASAL, M. Clinical approach to neonatal conditions. In: ENGLAND, G.; HEIMENDAHL, A.V. (Eds). *Canine and feline reproduction and neonatology*. Gloucester: BSAVA, 2010. p.147-154.
- CHABANNE, L.; MARCHAL, T.; DENEROLLE, P. *et al.* Lymphocyte subset abnormalities in German shepherd dog pyoderma (GSP). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.49, p.189-198, 1995.
- CHAPPUIS, G. Neonatal immunity and immunization in early age: lessons from veterinary medicine. *Vaccine*, v.16, p.1468-1472, 1998.
- DAY, M.J. Immune system development in the dog and cat. *J. Comp. Pathol.*, v.137, p.S10-S15, 2007.
- DEAN, G.A.; QUACKENBUSH, S.L.; ACKLEY, C.D. *et al.* A Flow cytometric analysis of T-lymphocyte subsets in cats. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.28, p.327-335, 1991.
- EARL, F.L.; MELVEGER, B.E.; WILSON, R.L. The hemogram and bone marrow profile of normal neonatal and weanling beagle dogs. *Lab. Anim. Sci.*, v.23, p.690-695, 1973.
- ENGLISH, R. V. *et al.* Development of clinical disease in cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. *J. Infect. Dis.*, v. 170, p. 543-552, 1994.
- EVERMANN, J.F.; WILLS, T.B. Immunologic development and immunization. In: PETERSON, M.E.; KUTZLER, M.A. (Eds). *Small animal pediatrics: the first 12 months of life*. Missouri: ELSEVIER, 2011. p.104-112.
- FALDYNA, M.; LEVÁ, L.; KNOTIGOVÁ, P. *et al.* Lymphocyte subsets in peripheral blood of dog- a flow cytometric study. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.82, p.23-37, 2001.
- GILLIS, S.; KOZAK, R.; DURANTE, M. *et al.* Immunological studies of aging decreased production of and response to T cell growth factor by lymphocytes from aged humans. *J. Clin. Invest.*, v.67, p.937-942, 1981.
- GREELEY, E.H.; KEALY, R.D.; BALLAM, J.M.; The influence of age on the canine immune system. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.55, p.1-10, 1996.
- GRUNDY, S.A. Clinically relevant physiology of the neonate. *Vet. Clin. North Am. Small An. Pract.* v.36, p.443-459, 2006.
- HODGINS, D.C.; SHEWEN, P.E. Vaccination of neonates: Problem and issues. *Vaccine.*, v.30, p.1541-1559, 2012.
- HOSKINS, J.D. The physical examination. In: HOSKINS, J.D. *Veterinary pediatrics: dogs and cats from birth to six months*. Philadelphia: SAUNDERS, 2001. p.1-7.
- HOLMES, M.A.; LUNN, D.P. Variation of MHC II expression on canine lymphocytes with age. *Tissue Antigens.*, v.43, p.179-183, 1994.
- JAIN, N.C. Comparative hematology of common domestic animals. In: FELDMAN, B.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. (Eds). *Schalm's Veterinary Hematology* Baltimore: LIPPINCOTT, WILLIAMS & WILKINS, 2000. p.19-53.

- KENNEDY, L.J.; BARNES, A.; HAPP, G.M. *et al.* Extensive interbreed, but minimal intra breed, variation of DLA class II alleles and haplotypes in dogs. *Tissue Antigens.*, v.59, p.194-204, 2002.
- LANDIM-ALVARENGA, F.C. Manejo do neonato. In: PRESTES, N.C., LANDIM-ALVARENGA, F.C., (Eds). *Obstetrícia veterinária*. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN, 2006. p.158-77.
- LYDYARD, P.; GROSSI, C. Células envolvidas nas respostas imunes. In: ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. (Eds). *Imunologia*. São Paulo: MANOLE, 2003. p.2.2-2.20.
- MAKINODEN, T.; KAY, M.M.B. Age influence on the immune system. *Adv. Immunol.*, v.24, p.287-330, 1980.
- MALONE, J.L.; SIMMS, T.E., GRAY, G.C. *et al.* Sources of variability in repeated T-helper lymphocyte counts from human immunodeficiency virus type 1-infected patients: total lymphocyte count fluctuations and diurnal cycle are important. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, v.3, p.144-151, 1990.
- MAY, C.; HUGHES, D.E.; CARTER, S.D. *et al.* Lymphocyte populations in the synovial membranes of dogs with rheumatoid arthritis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.31, p.289-300, 1992.
- MOREIN, B.; ABSUGRA, I.; BLOMQUIST, G. Immunity in neonates. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.87, p.207-213, 2007.
- MOREIN, B.; BLOMQUIST, G.; HU, K. Immune responsiveness in the neonatal period. *J. Comp. Path.*, v.137, p.S27-S31, 2007.
- MURASKO, D.M.; WEINER, P.; KAYE, D. Deline in mitogen-induced proliferation of lymphocytes with increasing age. *Clin. Exp. Immunol.*, v.70, p.440-448, 1987.
- NAKAGE, A.P.M.; SANTANA, A.E.; CAPUA, M.L.B. *et al.* Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. *Cienc. Rural.*, v.35, p. 966-973, 2005.
- OPDEBEECK, N.L. Mammary gland immunity. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.181, p.1057-1060, 1982.
- PAXTON, H.; KIDD, P.; LANDAY, A.; GIORGI, J. Results of the flow cytometry ACTG quality control program: analysis and findings. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, v.52, p.68-84, 1989.
- PLOEMEN, J.; RAVESLOOT, P.H.T.M.; VAN ESCH, E. The incidence of thymic B lymphoid follicles in healthy beagle dogs. *Toxicol. Pathol.*, v.31, p.214-219, 2003.
- POFFENBARGER, E.M.; OLSON, P.N.; CHANDLER, M.L. *et al.* Use of adult dog serum as a substitute for colostrum in the neonatal dog. *Am. J. Vet. Res.*, v.52, p.1221-1224, 1991.
- SALMON, H. The mammary gland and neonate mucosal immunity. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.72, p.143-155, 1999.
- SELLON, R.K.; LEVY, J.K.; JORDAN, H.L. *et al.* Changes in lymphocyte subsets with age in perinatal cats: late gestation through eight weeks. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.53, p.105-113, 1996.
- SONG, L.; KIM, Y.H.; CHOPRA, R.K. *et al.* Age-related effects in T cell activation and proliferation. *Exp. Gerontol.*, v.28, p.313-321, 1993.
- THOMAN, M.L.; WEIGLE, W. The cellular and sub cellular bases of immunosenescence. *Adv. Immunol.*, v.46, p.221-261, 1989.
- TIZARD, I.R. *Veterinary immunology: an introduction*. Philadelphia: SAUNDERS, 2008. 482p.
- TOMAN, M.; FALDYNA, M.; KNOTIGOVA, P. *et al.* Postnatal development of leukocyte subset composition and activity in dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.87, p.321-326, 2002.
- WHEELLESS, L.L. Flow instrumentation and data analysis. In: COON, J.S.; WEINSTEIN, R.S. *Diagnostic flow cytometry*. Baltimore: WILLIAMS & WILKINS, 1991. p.17-34.
- WILLIAMS, D.L. Studies of canine leucocyte antigen: a significant advance in canine immunology. *Vet. J.*, v.153, p.31-39, 1997.