

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**ANÁLISE MORFOFUNCIONAL DE FAGÓCITOS
DO SANGUE DE EMA (*Rhea americana*) EM
CATIVEIRO**

Luiz Carlos Toledo Rodrigues

**UBERLÂNDIA-MINAS GERAIS-BRASIL
2006**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**ANÁLISE MORFOFUNCIONAL DE FAGÓCITOS
DO SANGUE DE EMA (*Rhea americana*) EM
CATIVEIRO**

Luiz Carlos Toledo Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. Paulo Lourenço da Silva

Co-orientadora: Profa. Dra. Adenilda Cristina Honório França

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária – UFU, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Mestre em Ciências Veterinárias (Clínica e
Cirurgia).**

**UBERLÂNDIA-MINAS GERAIS-BRASIL
Junho de 2006**

FICHA CATALOGRÁFICA

Rodrigues, Luiz Carlos Toledo.

Análise morfofuncional de fagócitos do sangue de ema (*Rhea americana*) em cativeiro/ Luiz Carlos Toledo Rodrigues. – Uberlândia, 2006.

42f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Lourenço da Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Inclui bibliografia.

1. Análise morfofuncional de fagócitos do sangue de ema (*Rhea americana*) em cativeiro

EPÍGRAFE

As pedras que encontramos em nossa caminhada não foram colocadas para que tropeçássemos e caíssemos mas, para que pudéssemos construir a ponte do sucesso.

Irmão Tadeu

DEDICATÓRIA

Ao professor Dr. Paulo Lourenço da Silva pela orientação, atenção e dedicação a este trabalho. Ressalto que o seu empenho foi fundamental para meu ingresso e obtenção deste título. Minha eterna gratidão e meu orgulho em poder dizer que fui seu orientado.

À professora Dra. Adenilda Cristina Honório França, pela co-orientação, sugestões e experiência profissional atuante no dia-a-dia, que com certeza ajudaram muito para a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Eduardo L. França, pelo apoio, dedicação, amizade, incentivo para meu ingresso no mestrado e, no empenho para que eu pudesse galgar mais um degrau na área da pesquisa, do conhecimento e da ética. Minha eterna gratidão, respeito e admiração.

À professora Maria Auxiliadora Ribeiro, Magnífica Reitora do Centro Universitário do Planalto de Araxá - UNIARAXA, pelo apoio, amizade e incentivo durante a obtenção deste grau.

Ao Irmão Tadeu, conselheiro, amigo, braço forte nos momentos difíceis, e sábio mestre nas orientações do dia a dia.

**Aos meus pais, verdadeiros mestres e
heróis. Luiz Rodrigues e Carlota A. de
Toledo. E a todos os meus irmãos,
especialmente minha irmã Neusa.**

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é resultado do esforço pessoal e técnico de profissionais, que constituíram uma verdadeira equipe de pesquisa e grandes amizades.

Agradeço a todos, em especial:

Ao Professor. Dr. Marcelo Emilio Beletti, pelo apoio e colaboração para que este trabalho fosse de grande relevância.

À professora Dra. Daise Aparecida Rossi, pelo incentivo no desenvolvimento deste trabalho.

À professora Dra. Mara Regina Bueno de Mattos Nascimento, pelo apoio e colaboração.

Ao professor Dr. Alberto Martins, amigo e incentivador deste projeto.

Ao professor Dr. Geraldo Sadoyama Leal, pelo apoio e colaboração.

À CBMM, Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração, empresa que forneceu todo o material biológico para a pesquisa.

À médica veterinária, Laura Teodoro de Oliveira Fernandes, cujo trabalho e dedicação foram de grande valia para o sucesso desta pesquisa.

Ao Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia, em especial ao Departamento de Anatomia, nas pessoas de seus titulares que muito contribuíram.

Aos Laboratórios do Instituto de Ciências da Saúde do Centro Universitário do Planalto de Araxá - UNIARAXA, onde pude realizar a maioria de meus experimentos.

À minha “mãezinha” Elisa Antônia Ribeiro, pela amizade, carinho e amor maternal a mim dedicado.

Ao secretário da Pós-graduação Marcos Antônio de Oliveira, que sempre se mostrou pronto a servir e atender nossas solicitações.

Ao Coordenador dos Laboratórios de Anatomia Humana, Esvandir Teixeira, pelo apoio durante a realização deste trabalho.

Aos meus alunos e colaboradores deste trabalho, Carlos Eduardo Borges de Oliveira, Joanna Conde Maynie e Karina Aparecida Silva.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	v
Lista de Abreviaturas	vi
I INTRODUÇÃO	01
II OBJETIVOS	04
III REVISÃO DE LITERATURA	05
IV MATERIAL E MÉTODOS	10
Obtenção das amostras de sangue de ema (<i>Rhea americana</i>)	10
Separação de células do sangue	10
Preparação de melatonina exógena	10
Liberação do ânion superóxido	11
Cultura de <i>Escherichia coli</i>	11
Atividade funcional dos fagócitos	12
Análise morfológica das células do sangue de ema através de microscopia eletrônica	12
Análise Estatística	13
V RESULTADOS	14
VI DISCUSSÃO	19
VII CONCLUSÃO	22
VIII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
IX ANEXO I	29
X ANEXO II	32

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Liberação do ânion superóxido pelos fagócitos PMN

FIGURA 2. Liberação do ânion superóxido pelos fagócitos MN

FIGURA 3. Índice de fagocitose das células MN e PMN

FIGURA 4. Atividade microbicida das células MN e PMN

FIGURA 5. Heterófilo de sangue de ema em M.E.T

LISTA DE ABREVIATURAS

μg	Micrograma
μL	Microlitro
Ab	Absorbância
ATP	Adenosina trifosfato
CaCl_2	Cloreto de cálcio
D.O	Densidade óptica
EDTA	Etilenodiaminotetracetato
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
MgCl_2	Cloreto de magnésio
MN	Células mononucleares
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
NaCO_3	Cloreto de sódio
NBT	Nitro blue tetrazolium
Nm	Nanômetro
O_2^-	Ânion superóxido
OH^-	Radical hidroxila
p	“p-value”
PBS	Solução tampão fosfato
PMA	Phorbol mirystrate acetate
PMN	Células polimorfonucleares
SOD	Superóxido dismutase
SOD CuZn	Enzima cobre zinco superóxido dismutase

ANÁLISE MORFOFUNCIONAL DE FAGÓCITOS DO SANGUE DE EMA (*RHEA AMERICANA*) EM CATIVEIRO

RESUMO. A ema (*Rhea americana*) é uma ave que se encontra em vias de extinção, e a sua criação em ambientes de cativeiro sofre problemas com relação ao manejo. Fatores como estresse fisiológico, ocasionado pelo cativeiro, e interação hormonal podem influenciar a resposta imunológica, que pode atuar na ativação de fagócitos mononucleares e polimorfonucleares, promovendo a liberação do ânion - superóxido. O presente trabalho tem por objetivo avaliar a morfologia e a ativação celular de heterófilos do sangue de emas, de machos e fêmeas, na presença do hormônio melatonina do phorbol mirystrate acetate e da *Escherichia coli*. Foram coletadas 20 amostras de sangue, sendo 10 de machos e 10 de fêmeas, de animais pertencentes ao Centro de Desenvolvimento Ambiental da Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração. A separação das células foi realizada através do método de gradiente de densidade Ficoll-Paque e por sedimentação por dextran (Sigma). Para a liberação dos ânion-superóxido utilizou-se o método do Ferricitocromo C. A fagocitose e atividade microbicida foram avaliadas pelo método de Acridine orange. Na presença do hormônio melatonina, foram verificadas diferenças estatísticas em que os machos apresentaram mais ativação ($16,5 \pm 1,1$) em relação às fêmeas ($14,1 \pm 0,5$) ($p < 0,05$). Os heterófilos apresentam tamanho grande e forma esférica a oval, ou irregular com grânulos de aspectos variados. Observou-se que os fagócitos do sangue de ema apresentam atividade fagocítica para *Escherichia coli*, e não houve diferença significativa entre as células de machos e fêmeas. O índice microbicida também foi similar entre os tipos de fagócitos, com valores superiores a 60 %. Concluiu-se que a ativação funcional dos heterófilos do sangue de ema por agentes imunomoduladores é variável de acordo com o sexo, e estas células podem ser consideradas um importante mecanismo de defesa para estes animais frente às infecções bacterianas.

Palavras-chaves: *Rhea americana*, heterófilos, sangue, fagocitose, microbicida.

MORFOFUNCTIONAL ANALYSE OF BLOOD PHAGOCYTES OF EMA (*Rhea americana*) IN CAPTIVITY

Abstract. The Ema (*Rhea American*) is a bird in extinction. It is created in captivities, which fact causes some problems related to the handler, like physiologic stress and hormonal interaction, influencing on the immunological answer. This change can act on the activation of mononucleos and polimophonucleos, promoting the liberation of anion-superóxido. The aim of this work is to value the morphology and the cellular activation of heterophilus from emas' blood (male and female) with the hormone melatonin and the *Escherichia coli*. Were collected 20 samples of blood (10 males and 10 females) of animals from Ambiental Development Centre of Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineiração. The separation of cells took place through the method gradient of density Ficoll – Paque and sedimentation by dextran (Sigma). For the liberation of ânion-superóxido were used the method Acridine Orange. With the hormone melatonin, were checked some different statistics where males have more activation ($16,5 \pm 1,1$) than the females ($14,1 \pm 0,5$) ($p < 0,05$). The heterophilus are big and have a kind of spherical, oval or irregular form with granules of several aspects. Notice that the phagocyte in the Ema's blood have phagocytec activity for *Escherichia Coli*, and there wasn't a meaningful difference between the cells of males and females. The index of microbicial was also similar between the types of phagocyte with values up to 60%. We can conclude that the functional activation of heterophilus from ema's blood by agents imunomodulatory depend on the sex and this cells can be consider an important mechanism of defense to this animals, up against the bacterial infections.

Key words: *Rhea americana*, heterophilus, blood, phagocyte, mycrobicidal.