

I. INTRODUÇÃO

A Ema, cujo nome científico é *Rhea americana*, é considerada a ave mais antiga do continente americano. É uma espécie primitiva, descendente direta dos dinossauros, pertence ao grupo das ratitas - "aves que não voam"-, e classificada dentro da ordem Reiforme, família Rheidae (SARASQUETA, 1997). Pertence à superordem das Paleognatas, e apresenta características anatômicas e fisiológicas que a diferenciam das aves carinadas, entre as quais: a ausência de quilha no osso esterno, a perda da capacidade de vôo, a falta da glândula uropigiana, e a separação de fezes e urina na cloaca (SICK, 1985).

As ratitas são, em geral, consideradas as aves atuais mais primitivas, sob o ponto de vista filogenético ou, mais exatamente, constituem o grupo mais antigo, altamente especializado (SICK, 1985).

A espécie foi abundante em todas as regiões descampadas do Brasil na época do descobrimento, e em outros países sul-americanos como Paraguai, Uruguai e, principalmente, Argentina. Atualmente tornou-se escassa nestes países e na região nordeste do Brasil, tendo praticamente desaparecido no Rio Grande do Sul (GUNSKI, 1992). As maiores populações naturais concentram-se no Mato Grosso e Goiás, podendo ainda ser encontradas nos cerrados das regiões oeste e noroeste de Minas Gerais (DANI et al., 1993).

Atualmente no Brasil são descritas três subespécies:

- *Rhea americana americana*, quase extinta, que habita os cerrados e a caatinga. A redução da população desta subespécie foi agravada pela fome generalizada no nordeste brasileiro, onde foi caçada pelo homem para alimentação (SARASQUETA, 1997);
- *Rhea americana intermedia* (ALMEIDA, 2003), um pouco maior que as outras, habita regiões de Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, e está praticamente extinta no Rio Grande do Sul;
- *Rhea americana albescens* (ALMEIDA, 2003), habitam o sudoeste do Centro-Oeste Brasileiro, sul da Bolívia e Norte da Argentina.

O animal tem sido considerado como uma forma alternativa de pecuária eficiente, ambientalmente correta e sustentável. A partir do mesmo peso de reprodutores, a ema é capaz de produzir mais de 10 vezes a quantidade de carne

vermelha que o rebanho bovino, apesar de consumir a mesma quantidade de pasto e ração. Uma produção de carne desta magnitude pode literalmente mudar a maneira como os seres humanos produzem proteína animal no planeta (FOWLER; CUBAS, 2001).

Com a criação de aves domésticas de origem exótica, várias doenças têm surgido, capazes de ocasionar impactos na população destes animais criados em cativeiros. Poucos estudos foram realizados em emas, visando à elucidação dos mecanismos naturais de defesa para estes microrganismos (FOWLER; CUBAS, 2001). Sabe-se que estes animais apresentam vários tipos celulares no sangue, porém, as características funcionais destas células ainda são parcialmente compreendidas.

Os leucócitos do sangue de ema, de acordo com a morfologia, dividem-se nas seguintes células: heterófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos. A concentração de leucócitos no sangue de emas jovens, de aproximadamente sete meses, é de $2,19 \times 10^3/\text{mm}^3$ para os machos e de $2,01 \times 10^3$ para as fêmeas, e a frequência relativa de cada tipo celular é a seguinte: 50 a 53% de heterófilos, 27 a 28% de linfócitos, 4 a 5% de monócitos e 8 a 9% de eosinófilos (SCHREINER, 2002).

A mortalidade de emas tem sido relacionada a muitas infecções bacterianas, entre elas a *Megabactéria* e a *Escherichia coli*, que são consideradas importantes agentes etiológicos causadoras de infecções nestes animais em criadouros (SCHREINER, 2002).

Vários estudos vêm demonstrando que os fagócitos do sangue apresentam importante papel em várias infecções, principalmente as bacterianas. A fagocitose é um dos principais mecanismos de defesa do organismo para as bactérias (BABIOR, 1978; MUNDI et al., 1991; SEGAL; SOOTHILL, 1993; HONORIO-FRANÇA et al., 1997; HONÓRIO-FRANÇA et al.; 2001).

A investigação da atividade de fagócitos *in vitro* pode ser realizada por meio de abordagem indireta, medindo produtos do metabolismo celular, bem como de forma direta, verificando-se o decréscimo da viabilidade de microorganismos. (HO; LAWTON, 1978; LEIJH et al., 1981; AVERY; GORDON, 1991; BUESCHER; MCLLEHERAN, 1993; HONORIO-FRANÇA et al., 1997; HONORIO-FRANÇA et al., 2001).

A presença de grande quantidade de fagócitos (heterófilos e monócitos) no sangue de ema sugere que estas células possam desempenhar importante mecanismo microbicida na espécie. Assim, visando maior compreensão dos processos de defesa para infecções relacionadas à morfofisiologia celular, o presente trabalho propõe avaliar a atividade funcional dos fagócitos do sangue de ema.

II. OBJETIVO

GERAL

Avaliar a atividade morfofuncional de células do sangue de emas (*Rhea americana*) adultas, em cativeiro.

ESPECÍFICOS

Verificar a ativação dos fagócitos do sangue por meio da liberação do ânion superóxido.

Verificar a atividade bactericida dos fagócitos do sangue periférico de emas adultas em cativeiro, para *Escherichia coli*.

Analisar a morfologia através da microscopia eletrônica de transmissão das células heterófilos do sangue de ema.

III. REVISÃO DE LITERATURA

A criação de ema (*Rhea americana*) em cativeiro tem sido considerada importante alternativa de pecuária. Assim, para ter sucesso o manejo do animal deve ser à base de água limpa, pasto limpo, alimento fresco à vontade, além de um ambiente livre de resíduos químicos e de uma cerca/tela de predadores (BRUNING, 1994; SANTOS, 2004).

A ema é um animal silvestre controlado pelo IBAMA, que proíbe sua caça. O comércio da carne só é permitido para animais oriundos de criadouros comerciais registrados junto a este órgão, e abatidos em frigoríficos que também sejam legalizados (BRUNING, 1994).

O peso de uma ema adulta varia entre 26 e 36 kg, com grande variação em decorrência da existência de raças geográficas. Os machos geralmente atingem 34,4 Kg enquanto as fêmeas atingem 32 Kg (SICK, 1985).

A ema possui corpo ovóide, com a região posterior cônica. A altura varia de 1,34m a 1,70m, conforme a postura adotada (SICK, 1985). O macho é maior que a fêmea, e nele a cor negra é um pouco mais acentuada, apresentando-se em maior extensão na base do pescoço, peito anterior, e parte mediana do dorso anterior. Além disso, a parte posterior do corpo é mais pontiaguda no macho.

A ave tem o bico plano e longo, com o cúlmem curvado, em sua extremidade, sobre a mandíbula inferior. Pode apresentar, no bordo da mandíbula superior, chanfraduras dentiformes, em número de cinco, e três na mandíbula inferior (FOWLER; CUBAS, 2001). As narinas são largas, ovóides, localizadas na região média do bico, em um sulco membranoso. A disposição dos olhos e a depressão posterior da órbita são tais, que permitem que a ave olhe sem se virar (ALMEIDA, 2003).

No período reprodutivo ocorrem grandes alterações morfológicas e comportamentais no macho adulto (CARBAJO et al., 1997). A primeira modificação é no pescoço, que se engrossa enormemente. A zona peitoral também se alarga tornando muito conspícuo o desenho em cruz, de penas negras que sobe desde a base do pescoço espalhando-se pelo dorso; todas as penas negras assumem uma tonalidade brilhante muito chamativa. Os machos freqüentemente erigem as

filiplumas da cabeça, o que lhes faz parecer maiores em tamanho corporal (BRUNING, 1994; FOWLER; CUBAS, 2001).

A fêmea adulta não apresenta modificações no período reprodutivo, sendo menos robusta e menor que o macho, alcançando um metro e trinta centímetros de altura, e trinta e dois quilos. Sua coloração é bege escura, com algumas penas negras na base do pescoço, que é delgado e proporcionalmente mais longo que o do macho (CARBAJO et al., 1997). Sua principal característica diferencial é que as penas das asas não recobrem todo o corpo, deixando a descoberto as coxas e as regiões ventral e posterior, exibindo a cloaca arredondada (FOWLER; CUBAS, 2001).

A maioria das espécies se reproduz no período em que os fatores climáticos são mais favoráveis para o nascimento das suas crias, e quando existe uma alta disponibilidade de alimento (LACK, 1950). A primavera é, para grande parte das espécies de climas temperados, o período ideal. Para estabelecer o início da reprodução, em altas latitudes, os animais utilizam geralmente a informação sobre o fotoperíodo, mais concretamente, a duração do dia (horas de luz), que atua como um sinal de sincronismo dos processos fisiológicos. Os fatores meteorológicos podem influenciar no ajuste do período reprodutivo, adiantando ou atrasando o momento ótimo para o nascimento de suas crias (IMMELMANN, 1971).

Seu sistema de acasalamento é complexo, definido como poligínico e poliândrico, no qual o macho possui um harém com várias fêmeas, e estas podem acasalar-se com outros machos em sucessão. O aspecto mais notável do comportamento reprodutivo destas aves é o papel desempenhado pelo macho. Ele faz a corte, constrói o ninho, incuba os ovos e cuida dos filhotes, enquanto o papel da fêmea limita-se à cópula e à postura dos ovos (BRUNING, 1971).

No que diz respeito à alimentação, é onívora, com hábitos diurnos e crepusculares. Possui uma enorme capacidade de adaptação, vivendo em sistemas agropecuários e resistindo ao cativeiro. Podem ser vistas em condições naturais, vivendo em bandos fora do período de acasalamento, e no período de reprodução, geralmente nas estações mais quentes do ano, as emas se subdividem em grupos menores, com um macho dominante (SARASQUETA, 1997).

Desde tempos remotos, a ema é alvo de valores humanos diferenciados. Em algumas propriedades agrícolas são protegidas por dispensarem leguminosas

(PASCHOAL; MAGNANI, 1990) e controlarem populações de pragas. Para as comunidades rurais, o valor cinegético se exalta, abrangendo a subsistência de ovos, gordura e outras iguarias, além de caçadas "recreativas" e coletas de plumagem. Durante anos as plumas foram intensamente exportadas e as ações humanas reduziram as populações de emas em toda a sua área de habitat natural. Além da caça intensiva, as atividades incluem queimadas, desmates, eliminação de ovos por maquinário agrícola durante a preparação do solo para plantio, e utilização de agrotóxicos em áreas cultivadas (BRUNING, 1994).

A exploração comercial da ema (*Rhea americana*) vem crescendo consideravelmente, por ser uma espécie silvestre autóctone com potencial a ser explorado na produção de alimentos (DI CAMPOS, 2005).

Uma ema pode pôr até 40 ovos por período reprodutivo, os quais podem ser comercializados como ovos férteis ou não incubáveis, para consumo humano, com menos de 1% de lipídeos, contendo ácidos polinsaturados do tipo "Omega 3", já que os mesmos são considerados saudáveis (GIANNONI, 1996). Em outras espécies como a galinha (*Gallus gallus domesticus*), a relação entre o peso do ovo e do filhote recém-nascido varia muito de acordo com o sistema que se usa para incubação.

O período de incubação em condições naturais e artificiais varia entre 30 e 43 dias. Vários fatores poderão determinar variações no tempo de incubação, tais como temperatura e umidade usada no processo (FLÔRES, 2004). Conforme experiências realizadas, sabe-se que o peso do filhote de emas será de 65 a 70% do peso do ovo (MORO, 1999; DI CAMPOS et al., 2004).

Nos últimos anos a expansão da rheacultura como atividade extrativista está relacionada à taxa de reprodução nos criatórios, onde a taxa de fertilidade média é abaixo de 50 %; isto se deve ao déficit de tecnologias empregadas com relação ao manejo. (FOWLER; CUBAS, 2001).

A criação de emas em cativeiro sofre problemas no manejo, pois esses animais necessitam de certas condições favoráveis em seu ambiente, tais como higiene adequada, a não exposição a produtos químicos, uma vez que elas se intoxicam facilmente, e, principalmente, a quantidade de espaço disponível, pois são animais relativamente grandes e andarilhos por natureza. A falta de condições favoráveis reflete negativamente na saúde do animal, além da susceptibilidade a contrair doenças de outros animais (BRUNING, 1994).

Várias são as doenças que podem causar impacto na população de emas; no entanto, pouco se conhece sobre os mecanismos de defesa destes animais. A ema apresenta quantidade significativa de células sanguíneas, porém, as características funcionais destas ainda não são totalmente compreendidas (FOWLER; CUBAS, 2001).

A importância da realização de estudos hematológicos se dá pelo fato de que estes estudos podem fornecer conhecimentos que visem à confirmação de diagnósticos em determinados processos patológicos (FRANÇA, 1997).

Para isso, estudos sobre a atividade funcional das células de emas são necessários para a determinação do mecanismo de defesa do animal. A atividade das células do sangue destes animais ainda não está elucidada. Poucos estudos têm sido realizados com relação à atividade funcional dos leucócitos da *Rhea americana*. Na literatura trabalhos vêm demonstrando que os fagócitos do sangue apresentam importante papel em várias infecções, principalmente para as bacterianas. A fagocitose é um dos principais mecanismos de destruição de bactérias, e pode ser medida pelo metabolismo oxidativo com produção de metabólitos ativos do oxigênio (BABIOR, 1978; MUNDI et al., 1991), ou pela liberação de enzimas lisossômicas (SEGAL; SOOTHILL, 1983).

A investigação da atividade de fagócitos *in vitro* pode ser realizada por meio de abordagem direta, verificando-se o decréscimo da viabilidade de microorganismos em ensaios fagocitários, ou indiretos, medindo produtos metabólicos celulares associados a esta atividade (HO; LAWTON, 1978; LEIJH et al., 1978; AVERY; GORDON, 1991; BUESCHER; MCLLEHERAN, 1993 *apud* FRANÇA, 1997).

Os métodos de avaliação indireta da atividade dos fagócitos podem ser realizados por meio da detecção de produtos do metabolismo oxidativo, sendo analisados por meios bioquímicos ou citoquímicos (BABIOR, 1978; MUNDI et al., 1991).

O metabolismo oxidativo dos leucócitos é ativado quando as células são estimuladas por agentes solúveis (endotoxinas bacterianas, N-Formil peptídeos, produtos de clivagem do sistema complemento, como o C3b e C5a, entre outros), ou (eritrócitos revestidos com imunoglobulinas, partículas de zimosan ou de látex, e bactérias viáveis ou formalizadas (SEGAL; SOOTHILL, 1983)).

Vários métodos visando avaliar o metabolismo oxidativo têm sido desenvolvidos. Entre eles, destacam-se os que verificam o consumo de oxigênio (NAKAMURA et al; 1981), a quimioluminescência (ALLEN et al., 1972; EWERTZ et al., 1984; SCOFF et al., 1984; AVERY; GORDON, 1991). e os que quantificam os produtos do metabolismo oxidativo, como o ânion superóxido (COHEN; CHOVANIC, 1978; PICK; MIZEL, 1981) e o peróxido de hidrogênio (ROOT et al., 1975; PICK; MIZEL, 1981; BASS et al, 1983). O papel das espécies de reativos derivados do oxigênio gerados durante o metabolismo celular tem sido bastante estudado. Esses componentes reativos que são gerados pela consecutiva redução univalente da molécula de oxigênio produzem água e três intermediários ativos: o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a radical hidroxila (OH^-) (ASAD et al., 1994). Esses radicais participam de fenômenos extremamente importantes relacionados ao processo imunológico, reações inflamatórias, peroxidação de lipídeos e alterações em nível de DNA (AMES et al., 1993).

Dentre as células que atuam no sistema imunológico, os fagócitos têm atribuído um importante papel aos radicais derivados do oxigênio e seus possíveis moduladores do sistema imunológico (BABIOR, 1978; FRANÇA, 1997; HONÓRIO-FRANÇA et al., 2001).

O sistema imune, nervoso e endócrino, pode influenciar na resposta imunológica, respondendo a estímulos específicos de defesa do organismo alterando a ação das células imunes (FRANÇA, 1997).

É possível que os fagócitos presentes no sangue de ema estejam ativos funcionalmente, e que esta atividade possa ser de fundamental importância para controlar as infecções que acometem estes animais em cativeiro.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das amostras de sangue de ema (*Rhea americana*)

Foram coletadas 20 amostras de sangue periférico de *Rhea americana*, sendo 10 de fêmeas e 10 de machos, provenientes de animais adultos, pertencentes ao Centro Desenvolvimento Ambiental (CDA) da Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração (CBMM). As amostras foram coletadas no período da manhã, em tubos heparinizados contendo cada 5mL de sangue, utilizando seringas de 10mL. Após a coleta as amostras foram encaminhadas para o laboratório do ICS - Instituto de Ciências da Saúde do Centro Universitário do Planalto de Araxá Uniaraxá.

Separação das células do sangue

A separação das populações de fagócitos foi realizada pelo método de centrifugação por gradiente de densidade com Ficol-Paque (densidade: 1.077g/mL – Pharmacia), durante 40 minutos à 160G, sob temperatura ambiente. A centrifugação das amostras permite a separação do sangue em três camadas: o plasma, o anel rico em células MN, e células PMN mais hemácias. O plasma foi descartado, as células MN foram reservadas. As hemácias mais as células PMN foram submetidas à sedimentação por dextran (6g/L – Sigma), durante um período duas horas à 37°C, visando a separação dos polimorfonucleares. Depois de separadas as populações de fagócitos (polimorfonucleares e mononucleares), as células foram lavadas duas vezes consecutivas em tampão fosfato enriquecido (PBS com 2.6mM CaCl₂, 5mM de glicose), e as concentrações ajustadas para 1×10^6 cel/mL.

Preparação da melatonina exógena

Para estimular os heterófilos, utilizou-se a melatonina exógena (N-acety-5-methoxytryptamine-SIGMA). A melatonina foi dissolvida em PBS por um período de três horas sob agitação, à temperatura ambiente, em câmara escura. A concentração utilizada foi de 100ng/mL. Como controle positivo utilizou-se PMA

(forbol miristato acetato) na concentração 100ng/mL (FRANÇA, 1997; FRANÇA, 2002).

Liberação do Ânion Superóxido

Para verificar o metabolismo oxidativo e a liberação de ânion superóxido, na presença ou não de agentes imunomoduladores, utilizou-se o cromógeno Ferricitocromo C (Sigma), segundo o método de (PICK; MIZEL, 1981). Em presença do ânion superóxido, o Ferricitocromo C sofre oxidação passando a ferrocitocromo C, sendo esta mudança colorimétrica detectável em espectrofotômetro com filtro de 630nm. A suspensão de células foi ressuspensa em 0,5mL de PBS glicosado contendo ferricitocromo C (concentração de 2mg/mL). Um controle contendo somente células foi realizado paralelamente, para verificação da liberação espontânea do ânion superóxido pelas células. As suspensões foram colocadas em placas de cultura celular de 96 poços, com um volume de 100µL por poço e deixadas em estufa à 37°C, durante 1 hora. A leitura foi feita em espectrofotômetro para placa com filtro de 630nm. A concentração do ânion superóxido foi calculada segundo (PICK; MIZEL, 1981) através da seguinte relação:

$$\text{Concentração } O_2^- \text{ (nmol)} = \frac{DO \times 100}{6,3}$$

Cultura da *Escherichia coli*

A cultura estoque de *Escherichia coli* foi isolada de *Gallus gallus domesticus*, obtidas no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia, e foi mantida em ágar semi-sólido à temperatura ambiente, na ausência de luz. A partir desta cultura de estoque, 18 horas antes do ensaio foram feitos repiques em tubos contendo 8mL de TSB (Trypic Soy Broth – Difco), e estes incubados em estufa à 37° C. Após o crescimento, as bactérias foram lavadas duas vezes em solução salina tamponada (PBS), e a concentração ajustada para 1×10^7 bactérias

por mL, medida com espectrofotômetro, a 540nm e densidade óptica de 0.1 (DO = 0.1). Esta concentração de bactérias foi previamente determinada em meio sólido TSA (Tryptic Soy Agar) pela contagem de unidades formadoras de colônia bacteriana (HONÓRIO, 1995).

Atividade funcional dos fagócitos

A avaliação da fagocitose e da atividade bactericida dos fagócitos do sangue foi realizada pelo método de acridine orange, segundo Bellinatti - Pires et al. (1989).

Volumes iguais de suspensão de bactérias (1×10^7 bactérias/mL) e de suspensão de células (2×10^6 células/mL – fagócitos mononucleares e heterófilos) foram misturadas em tubos plásticos. O volume final da mistura fagocitária foi de acordo com o rendimento celular das amostras de sangue, e não inferior a 0,5mL. A suspensão contendo *E. coli* e células foram submetida à incubação prévia por 30 minutos sob agitação à 37°C, para que as células e bactérias pudessem interagir e favorecer a fagocitose. Após este período, a suspensão, contendo bactérias e fagócitos do sangue, foi centrifugada por 10 minutos a 160G sob refrigeração à 4°C. O sobrenadante foi descartado e o “botão” celular corado com 200µL de acridine orange (14,4 mg/mL-SIGMA), por 1 minuto. A seguir, foi acrescentado 6mL de meio de cultura 199 (Gibco), gelado e centrifugado a 160G, durante 7 minutos à 4°C. As células e as bactérias foram lavadas por duas vezes (160G por 7 minutos à 4°C), e observadas em microscópio de fluorescência (TIME IN). Foram avaliados 100 fagócitos, verificando-se o número de células que continham em seu interior no mínimo três bactérias, e o número de bactérias vivas ou mortas no citoplasma dos fagócitos. Os índices de fagocitose e microbicida foram obtidos a partir das seguintes relações:

Índice de fagocitose = % número de células que contém bactérias

Índice microbicida = $\{1 - (\text{n}^\circ \text{ de bactérias mortas} / \text{n}^\circ \text{ de bactérias fagocitadas})\} \times 100$

Análise morfológica das células do sangue de ema através de Microscopia Eletrônica

Foram coletados 5mL de sangue periférico de ema e transferidos para tubos Falcon contendo 0,1mL de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), e centrifugados a 50G, por 10 minutos. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, retirou-se o sobrenadante, sendo centrifugado novamente. O botão celular foi aspirado e transferido para frascos de vidro de 10mL, contendo 5mL de glutaraldeído a 2 % em solução tampão fosfato 0,1M, pH 7,2.

Após a fixação, para retirar resíduos de glutaraldeído, o botão celular foi homogeneizado na solução fixadora, distribuída em microtubos de 2mL e centrifugada a 50G, por 10 minutos. Após o descarte do sobrenadante, adicionou-se tampão fosfato 0,1M, pH 7, 2, até completar 2mL. Realizou-se nova centrifugação a 50G por cinco minutos. Este procedimento foi repetido três vezes. Em seguida, adicionou-se ágar neutro a 4%, aquecido aproximadamente à 50°C. Antes que a solução de ágar se solidificasse, agitou-se vigorosamente o microtubo. Com o resfriamento do material, formou-se um pequeno bloco de ágar misturado com o botão celular de leucócitos que foi retirado do frasco e cortado em fragmentos de aproximadamente 1mm³. A partir desta etapa o material foi processado como se fosse fragmento de órgão.

A fixação foi feita com tetróxido de ósmio 1% durante 30 minutos, e tetróxido de ósmio 1% com ferrocianeto de potássio 1,25%, por mais 30 minutos. Posteriormente realizou-se desidratação em etanol e óxido de polipropileno e inclusão em resina Epon. Finalmente, utilizando-se ultramicrotomo e navalha de diamante foram obtidos cortes ultrafinos, coletados em grades de cobre e corados com acetado de uranila (WATSON, 1958) e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963). A avaliação do material foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM -109).

Análise estatística

A análise estatística da liberação do ânion, fagocitose e atividade microbicida foi realizada através do teste t student para duas amostras independentes Zar (1981). A estatística calculada foi considerada significativa quando “p-value” foi menor que 0,05 (p<0,05).

V. RESULTADOS

I. Avaliação da liberação do ânion superóxido pelos fagócitos PMN do sangue de ema na presença de agentes imunomoduladores (melatonina e PMA)

Na figura 01 estão apresentados os resultados da liberação do ânion superóxido pelas células PMN do sangue de fêmeas e machos de *Rhea americana*. Observou-se que houve aumento significativo na liberação do ânion superóxido pelos fagócitos do sangue, quando na presença de PMA. Nos fagócitos do sangue de emas do sexo masculino, observou-se que houve aumento na liberação do ânion superóxido quando na presença da melatonina.

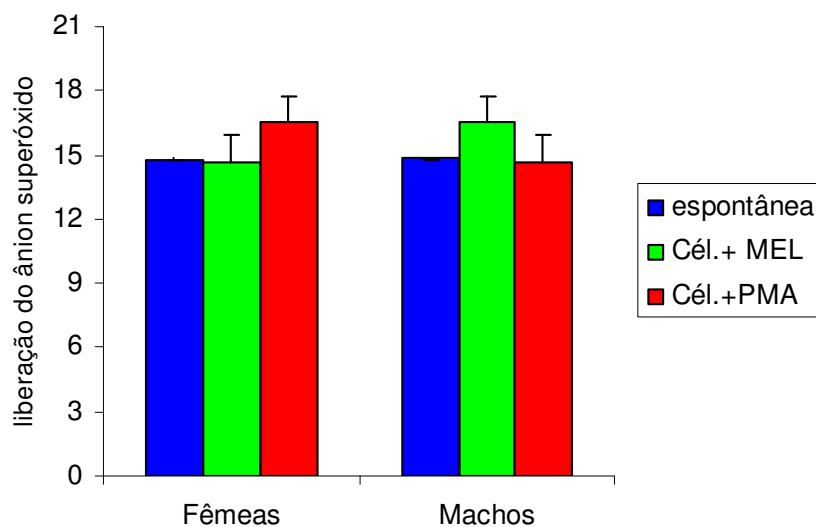


FIGURA 1. Liberação do ânion superóxido (O_2^-) pelos fagócitos PMN do sangue de *Rhea americana* macho e fêmea, na presença de agentes imunomoduladores N= 20 ($p < 0,05$)

II. Liberação do ânion superóxido (O_2^-) pelas células mononucleares (MN) do sangue de ema (*Rhea americana*), na presença de imunomoduladores melatonina e PMA

Na figura 02 estão apresentados os resultados da liberação do ânion superóxido dos fagócitos MN do sangue de ema. Observou-se que as células mononucleares a ativação espontânea não apresentou diferenças estatísticas entre machos e fêmeas. Na presença do hormônio melatonina foram verificadas diferenças estatísticas entre os sexos. As células dos machos apresentaram maior liberação em relação às das fêmeas. Quando as células foram estimuladas pelo PMA verificou-se diferença estatística. As células dos machos apresentaram menor liberação em relação às das fêmeas.

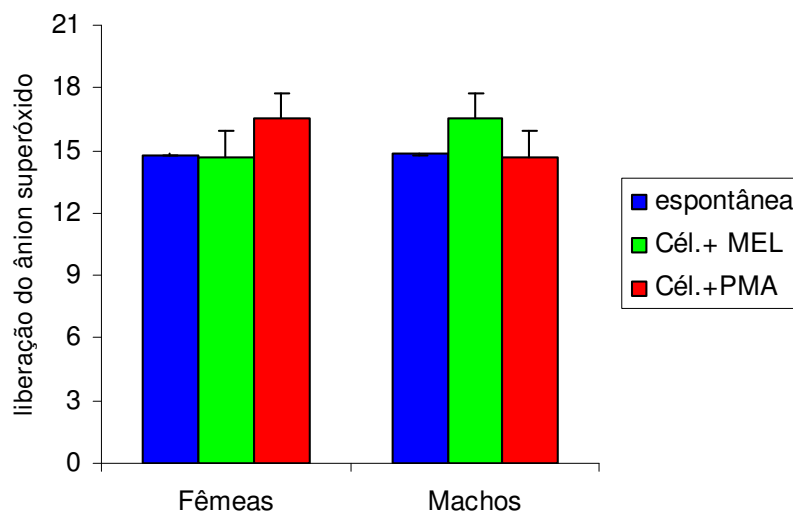


FIGURA 02. Liberação do ânion superóxido (O_2^-) pelos fagócitos MN do sangue de *Rhea americana*, na presença de imunomoduladores N=20 ($p < 0,05$)

III. Avaliação do índice de fagocitose (%) das células mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN) no sangue de Ema (*Rhea americana*), para *Escherichia coli*

Na figura 03 estão apresentados os resultados da fagocitose das células do sangue de ema. Observou-se que os fagócitos MN e PMN do sangue de ema apresentam atividade fagocítica para *Escherichia coli*, e não houve diferença significativa entre os sexos.

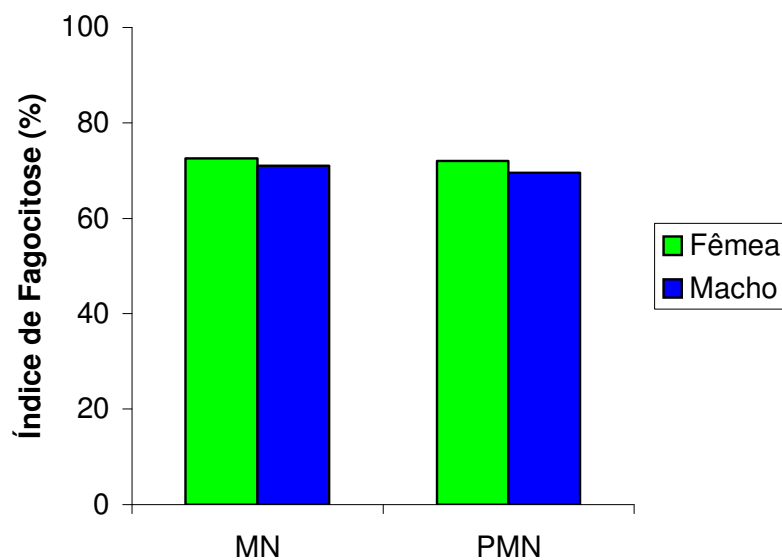


FIGURA 03. Índice de fagocitose (%) das células mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN) do sangue de ema *Rhea americana* para *Escherichia coli* N=20 ($p>0,05$)

IV: Atividade microbicida (%) das células mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN) do sangue de ema (*Rhea americana*), para *Escherichia coli*.

Na figura 04, estão apresentados os resultados da atividade microbicida dos fagócitos do sangue de ema. Observou-se que o índice microbicida foi similar entre os tipos de fagócitos (MN e PMN), com valores superiores a 60%. Não houve diferença da atividade microbicida entre os sexos.

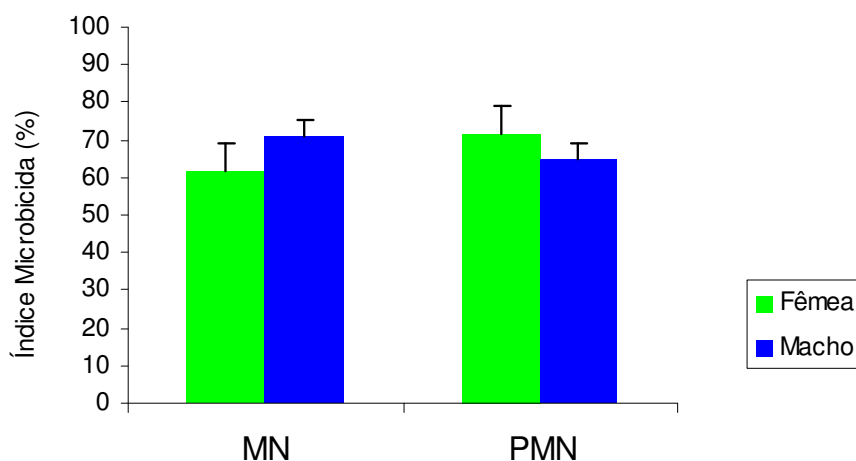


FIGURA 04. Atividade microbicida (%) das células mononucleares MN e polimorfonucleares PMN do sangue de ema *Rhea americana* para *Escherichia coli* N= 20 $p < 0,05$

V. Avaliação morfológica das células do sangue de ema (*Rhea americana*)

Na figura 05 está representada a célula do sangue de ema aumento (140.000 vezes). A célula apresenta forma esférica à elíptica e irregular. O citoplasma de maneira geral é abundante, repleto de grânulos compactos. Quanto à morfologia, os grânulos mostram formas variadas, podendo ser esféricos, fusiformes em forma de bastão, de baqueta ou elípticas. O núcleo em geral lobulado e homogeneamente eletrodenso é de localização excêntrica ou periférica.

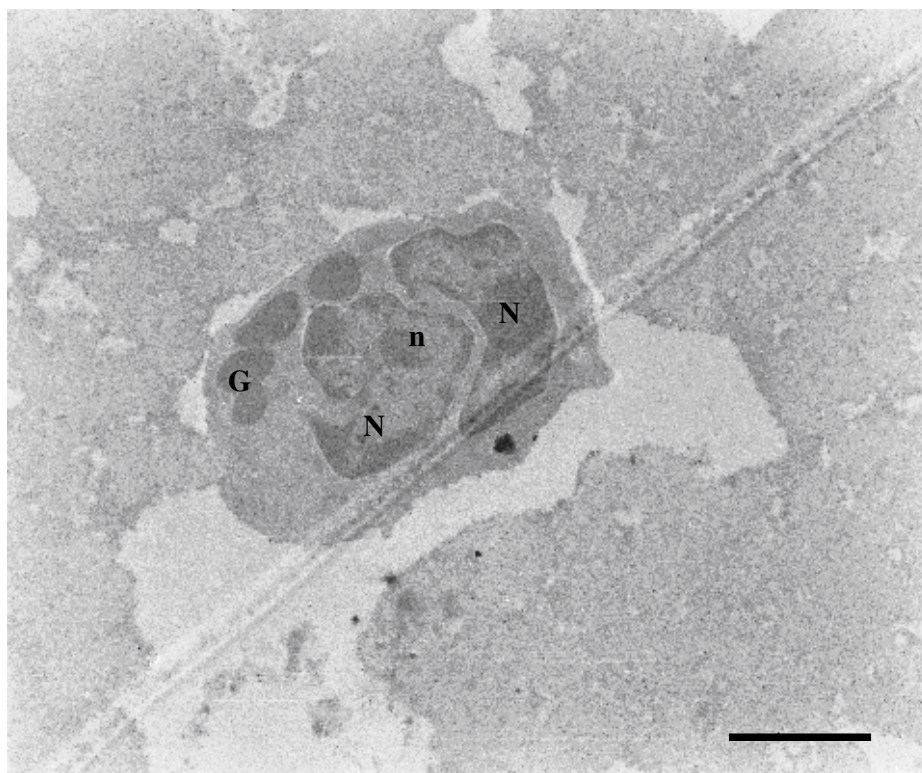


FIGURA 5. Heterófilo de sangue de ema (*Rhea americana*), visto em M.E.T, onde pode se notar forma levemente elíptica, grânulos específicos do heterófilo (G), núcleo lobulado (N) e nucléolo (n). (Barra = 4 µm)

VI. DISCUSSÃO

A *Rhea americana* é um animal silvestre, que nos últimos anos tem se tornado importante no cenário nacional, como uma forma alternativa para a pecuária.

A criação deste animal em cativeiro tem se associado à alta taxa de mortalidade, principalmente em sua fase inicial de vida. Esta mortalidade, na maioria das vezes, é decorrente de infecções.

Assim, nesse trabalho, estudando a atividade funcional de fagócitos do sangue de ema, verificou-se que estes são importantes mecanismos de defesa, principalmente para infecções bacterianas. Os fagócitos do sangue de ema estão ativos funcionalmente, pois liberam o ânion superóxido, quando estimulados por agentes imunomoduladores.

Esta ativação varia conforme o sexo do animal, sendo que os maiores índices foram encontrados para os fagócitos polimorfonucleares de animais do sexo masculino.

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) por leucócitos mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN) durante a fagocitose é essencial à defesa do organismo, para microorganismos potencialmente patogênicos (OLIVEIRA, 2002).

Neste trabalho avaliou-se a fagocitose de células do sangue de ema para *E. coli*. Observou-se que tanto os fagócitos MN como o PMN do sangue de ema de ambos os sexos são capazes de fagocitar a *E. coli*. O índice de fagocitose para as células MN foi de 72,2%, e para os fagócitos (PMN) foi de 70,6%. Não houve diferenças estatísticas entre os sexos e os tipos celulares ($p > 0,05$).

Trabalhos na literatura relatam que a fagocitose de bactérias induz a ativação do aumento respiratório e aumento de reativos do oxigênio em fagócitos (GORTER et al., 1987; FERRANTE et al., 1989; HONORIO-FRANÇA, 1998). A participação de radicais livres gerados pelo metabolismo oxidativo do oxigênio é um fenômeno extremamente importante durante as respostas imunológicas, reações inflamatórias e peroxidação de lipídeos (NOVELI et al., 1993; AMAES et al., 1993).

A produção de radicais livres pelos fagócitos, tais como o ânion superóxido, é um dos mecanismos mais importantes de defesa dos organismos para agentes potencialmente patogênicos. Evidências clínicas têm permitido relatar associação entre várias infecções fúngicas e bacterianas com o hormônio melatonina e sexo (FRANÇA, 1997).

Os leucócitos polimorfonucleares, em especial os heterófilos, constituem a primeira linha de defesa do organismo contra agentes invasores. Tais células têm a função altamente especializada de englobar e destruir diferentes tipos de patógenos, sendo, por essa razão, também chamadas de fagócitos profissionais.

Neste trabalho foi avaliada a ativação celular das células presentes no sangue de ema. Observou-se que os fagócitos polimorfonucleares são ativados quando na presença do hormônio melatonina. Essa ativação varia de acordo com o sexo, sendo os maiores níveis observados nos animais do sexo masculino.

Quando foi realizada a ativação das células mononucleares por agentes imunomoduladores PMA e hormônio melatonina, verificou-se que houve um aumento significativo na atividade destas células na presença da melatonina em animais do sexo masculino, e um aumento maior em animais do sexo feminino, quando estimulados por PMA.

A liberação do ânion superóxido foi suficiente para determinar morte bacteriana. Quando se avaliou a atividade microbicida dos fagócitos do sangue de ema (*Rhea americana*), observou-se que estas células são capazes de determinar índices bactericidas significativos para *E. coli*.

Em relação aos parâmetros morfológicos, hematológicos e imunológicos em ratitas, principalmente de emas em cativeiro, os dados deste trabalho vieram corroborar para o maior entendimento dos mecanismos de defesa destes animais.

Morfofuncionalmente, estas células apresentam tamanho grande e forma de esférica a oval ou irregular. O citoplasma de maneira geral é abundante, repleto de grânulos compactos. Quanto à morfologia, os grânulos mostram aspectos extremamente variados quanto a sua forma, podendo ser esféricos, fusiformes ou ainda em forma de bastão, de baqueta ou oval. O núcleo em geral vesiculoso é de localização excêntrica ou periférica.

A atividade microbicida dos fagócitos do sangue destes animais pode representar um mecanismo importante de proteção natural de emas às infecções.

Deve ser considerado o número de microrganismos com os quais a ema entra em contato no processo de manejo em cativeiro. É possível que esta atividade funcional dos fagócitos presentes no sangue de ema se estenda a outros patógenos, além da *E. coli*, e que possa ser um mecanismo importante de defesa do animal, principalmente aqueles que vivem em criadouros.

VII. CONCLUSÕES

Os fagócitos do sangue de ema (*Rhea americana*), independente do tipo celular e do sexo, estão ativos funcionalmente, pois liberam ânion superóxido quando estimulados por agentes imunomoduladores.

As células mononucleares e polimorfonucleares presentes no sangue de ema (*Rhea americana*) apresentam atividade fagocítica e bactericida para *Escherichia coli*.

A atividade funcional dos fagócitos do sangue de ema pode representar um mecanismo importante de proteção para estes animais frente às infecções.

VIII. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALLEN et al., 1972 apud DUKES, 1988 **Fisiologia dos animais domésticos**. 10. ed. 1972.

ALMEIDA, L. A. **Influências dos sistemas artificial e natural de incubação e criação de emas (*Rhea americana*) nos índices produtivos de criadouros do estado de São Paulo**. 2003. 75. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

AMES, B. N.; SHINNENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidantes, and the degenerative diseases of agent. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 90, p.7915-22, 1993.

ASAD, N. R.; ASAD, L. M. B. O.; ALMEIDA, C. E. B.; LEITÃO, A. C. Lethal interaction between hydrogenperoxide and 0-phenonthroline in *Escherichia coli*. **Br. J. Med. Biol. Res.**, v.27, p.2551-2555, 1994.

AVERY, M. D; GORDON, D. L. Antibacterial properties of breast milk: requirements for surface phagocytosis and chemiluminence. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.10. p.1034-9, 1991.

BABIOR, B. M. Oxigen dependent microbial killing by phagocytes. **N. Engl. J. Med.**, v.298, p.659, 1978.

BRUNING, D. F. Social structure and reproductive behaviour in the Argentine gray rhea (*Rhea americana albescens*). **Dissert. Abst. Internat. B**, v.35, n.8, p. 42798-42808, 1994.

BRUNING, D. F., Raising rheas in captivity. **Gazette**, v. 20, n.10-11, p. 7-12, 1971.

BUESCHER, S. E. ; MCLLEHERAN, S. M. Polymorphonuclear leukocytes and human colostrum: Effects of in vivo and in vitro exposure. **J. Padiatr. Gastroenterol. Nutr.**, v.17. p. 424-33, 1993.

CARBAJO, F.; CASTELLÓ, J. A.; CASTELLÓ, A.; GURRI, M.; MARÍN, J.; MESIÀ, J. SALES Y.; SARASQUETA, D. **Cría de avestruces, emues y ñandúes**. 2 ed., p.98, 1997.

COHEN, H. J.; CHOVANIC, M. E. Superoxide release measured continuously at 37°C by following SOD-inhibitable reduction of ferricytochrome C at 550 nm. **J. Clin. Invest.** v. 61. p. 1081-7, 1978.

DANI, S. U., **A ema (*Rhea americana*): biologia, manejo e conservação**. Belo Horizonte: Fundação Acangaú, 1993.

DI CAMPOS, M. S.; CARVALHO, I. D.; BRAGA FILHO, A. C. Correlations estimate among morfometrics measures, eggs weight and rhea chicks weight raised in captivity. **Cienc. Rural**, v.35, n.3, p.678-683, May/June 2005.

DUKES, H. H. **Fisiologia dos animais domésticos**. Tradução de Ana Maria N. P. Quintana. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 799p.

FERNÁNDEZ, G. F.; REBOREDA, J. C. Adjacent nesting and egg stealing between males of the Greater Rhea *Rhea americana* **J. Avian Biol.** v.26, p. 321-324, 1995.

FORTES, E. A. M.; MOURA, W. L.; SOUSA, A. F.; ALMEIDA, E.C. S; PRADO, L. M. Valores hematológicos em ema (*Rhea americana*). In: CONGRESSO NACIONAL DE ZOOLOGIA, v.25., 2004, Brasília: UFPI, 2004. p. 45.

FOWLER, M. E.; CUBAS, Z. S. **Biology, medicine and surgery of South American wild animals**. Ames: Iowa State University, 2001 p. 227.

FRANÇA, E. L. **Ativação de fagócitos do sangue periférico humano *Paracoccidioides brasiliensis* e pela *Escherichia coli* enteropatogênica:** produção do ânion superóxido e modulação pelo hormônio melatonina. 1997. 148 f: Dissertação (Mestrado em Biología Tropical) Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1997.

GIANNONI, M. L. **Emas e avestruzes:** uma alternativa para o produtor rural. Jaboticabal: Funep, 1996. 49p.

GORTER, A.; HIEMSTRA, P. S.; LEIJH, P. C. J.; VAN DER SLUYS, M. E.; BARSELAAR, M. T.; VANES, L. A.; DAHA, M. R. IgA and secretory IgA- opsonized *Staphylococcus aureus* induce a respiratory burst and phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes. **Immunology**, v.61, p.303-309, 1987.

GUNSKI, R. J. **Análise citogenética e algumas considerações biológicas da espécie *Rhea americana* – emas (aves: rheidae).** 1992. 119 f. Dissertação de (Mestrado)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1992.

HAEDO ROSSI, R. Notas ornitológicas IX: observaciones sobre el “Chaja”, “nhandu pestizo”, “nhandu gris” y “nhandu branco” en cautividad. **Acta Zool. Lilloana**. San Miguel de Tucumán, v 29, p. 343-353; 1970.

HO, P. C.; LAWTON, J. W. M. Human colostrol cells: phagocytosis and Killer of *E. coli* and *C. albicans*. **J. Peadiatr.**, v.93.p. 910, 1978.

HONORIO, A. C. **Atividade bactericida dos fagócitos do colostro humano para *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC).** 1995, 115 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

HONORIO-FRANÇA, A. C.; CARVALHO, M. P. S. M.; ISAAC, L.; TRABULSI, L. R.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S. Colostral mononuclear phagocytes are able to kill Enteropathogenic *Escherichia coli* opsonized with colostral IgA. **Scand. J. Immunol.**, v.46, p.59-66, 1997.

IANĂS S. O.; OLINESCU, R.; BADESCU, I. Melatonin involvement in oxidative processes. **Rom. J. Endocrinal**; v 29, p.147- 53, 1991.

IMMELMANN, K., Ecological aspects of periodic reproduction. In: Avian biology. FARNER, D. S.; KING, J. R.; PARKERS, K. C. (eds). New York: Academic Press, 1971. v.1, p.341-389.

LACK, D. The breeding seasons of european birds. **IBIS**, v.92, n.2, p. 288-316, 1950.

MACKANESS, G. B. The phagocytosis and inactivation of staphylococci by macrophages of normal rabbits. **J. Exp. Med.**, v.112, p.35-53, 1960.

MORO, M. E. G. Manejo e alimentação de emas e avestruzes. Pirassununga, SP, 1999. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO ANIMAL E TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO DE RAÇÕES, 1., 1999, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, 1999. v,1, p.1-18.

MUNDI, H.; BJÖRKSTEN, B.; SVANBORG, C.; OHAMN, L.; DAHLGREN, C. Extracellular release of reactive oxygen species from human neutrophils upon interaction with *Escherichia coli* strains causing renal scarring. **Infect. Immunol.**, v.59, p. 4168-72, 1991.

NAKAMURA, M.; BABA, A. S.; TAMURA, N. Polarographic micromethods for the rapid assay of phagocytosis connected oxygen consumption by leukocytes in diluted peripheral blood. **J.Lab.Clin.Med.**, v.97, p. 31-8, 1981.

NOVELLI, E. L.; RODRIGUES, N. L.; FRANÇA, E. L.; GEBRA, L. M. N.; RIBAS, B. O. High Dietary Carbohydrate and Pancreatic lesion. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.26, p.31-36, 1993.

OLIVEIRA, C. A.; AZZOLINI, A. E. C. S.; SILVA, S. C. Biochemical and ultrastructural evaluation of the interaction between IgG immune complexes and polymorphonuclear leukocytes: effect of natural antioxidants. **Eclet. Quím.** v. 27, n.8, p.273-284, 2002.

PASCHOAL, F. R., MAGNANI, F. S., Dispersão de sementes pela ema (*Rhea americana*) em condições de cativeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 17., 1990, Londrina. **Anais...**Londrina: Editra, 1990. p. 173

PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **J. Immunol Meth.** v.46, p.211-26, 1981.

RAUBER, R. H.; FLÔRES, M. L.; PEREIRA, C. E.; GRIGULO, M. Elisa evaluation of the levels of antibodies against infectious bronchitis virus in laying hens using egg yolk as substrate. **Revista Brasileira de Ciência Avícola:** v.6, n.2, p.117-119 june2004

ROOT, R. K.; METCALF, J.; OSHINO, N.; CHANGE, B. H₂O₂ release from human granulocytes during phagocytosis. (1) Documentation, quantitation and some regulating factors. **J. Clin. Invest.**, v. 55. 945-55, 1975.

SANTOS, C. O. **A cronobiología do comportamento da ema (*Rhea americana*) em cativeiro.** 2004. 53 f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - UNIARAXA, Araxá - 2004.

SARASQUETA, D. V.; CARBAJO, F. et al. Cría de ñandúes. in: **Cría de avestruces, emus y ñandúes.** 2. ed. Barcelona: Real Escuela de Avicultura, 1997. p.78.

SCHREINER, J. J. Efecto de la suplementacion con expeller de algodón a distintos niveles sobre la fragilidad eritrocitaria. **Revista Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinárias**, Chaco Corrientes, v. 3, p. 113, 2002.

SEGAL, A. W.; SOOTHILL, J. F. Phagocytes. In: SOOTHILL, J. F. **Pediatric immunology**. Local: Blackweel, 1983. p. 37.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira**: uma introdução. Brasília: Universidade de Brasília, 1985. v.1, p. 129 -132.

IX. ANEXO I

Reagentes

Solução C

Cloreto de magnésio 1.0g
 Água destilada 1000mL
 .

Ferrocitocromo C

Cytaocrome C sigma 2.0g
 Tampão fosfato (PBS-glicosado).....1 mL

Reagentes Para Dosagem De Cu-Zn Superoxido dismutase

Mistura hidroalcoólica (4:1)

Água destilada.....400mL
 Álcool absoluto.....100mL

Etilenodiaminotetracetato (EDTA)- Mistura Reativa (B)

EDTA.....14.6g
 Água destilada 250mL
 .

Tampão Carbonato

Cloreto de Sódio (NaCO₃).....52,99g
 Água destilada.....1000mL
 pH..... 10,2

Cloridrato de Hidroxilamina (PA)

NH₂OH.HCl.....2,6059g
 Água destilada.....100 mL

Nitro Blue Tetrazolium (NBT) – Mistura Reativa (A)

Pipetar para cada tubo 0,3 ml de NBT 1,2 mM e 0,2 ml de EDTA 2,0 mM.

NBT.....39,25 mg
 Água destilada.....40 mL
 .

Mistura Reativa

Pipetar para cada tubo 0,3 mL de (A) NBT 1,2 mM e 0,2 mL de EDTA 2,0 mM para 10 amostras, 6 mL de NBT (A) + 4 mL de EDTA (B).

Preparar no uso:

Mistura Reativa:

Para 2 amostras pipetar 1,5 mL de NBT mais 1,0 mL de EDTA.

Método

-Distribuir as amostras e os reagentes em tubos de ensaio de acordo com o quadro abaixo:

Solução	Padrão(mL)	Amostras (mL)
Amostra	----	0,5
Mistura hidro-alcoólica	0,5	----
Mistura clorofórmio-etanol (1:1)	0,5	0,5
Mistura Reativa	0,5	0,5
Mistura tampão carbonato Ph 10,2+	2,0	2,0
Hidroxilamina		

-Deixar 15 minutos em repouso

-Ler a absorbância 460nm, acertando o zero com a mistura reativa (volume total 3,5 mL).

-Calculo= $\frac{Ab \text{ padrão} - Ab \text{ amostra}}{Ab \text{ padrão}} \times 100$ = % de redução de NBT/SOD por proteína

PBS Estoque 10x

Cloreto de sódio..... 8,0g
 Fosfato mono 0,2g
 Fosfato Bibásico.....2,8g
 Cloreto potássio.....0,2g
 Água destilada.....1000mL
 Ph.....7,4

PBS Diluído 1x

900mL de água destilada em 100mL de PBS estoque

PBS Glicosado

900mL de água destilada em 100mL de PBS

Protocolo Dextram

Sulfato de sódio..... 4,0g
Solução de cloreto de sódio 0,57%.....1000mL

Melatonina**Protocolo Solução Mãe De Melatonina**

Melatonina.....10µg
PBS..... 2mL
.

Solução de uso Melatonina:

Retirar 100µL da solução Mãe de MEL em (pipeta) de 200µL. E adicionar 900µL de PBS.

Obs: Em cada amostra usa-se 50µL de solução de uso de MEL, utilizando para isso a pipeta de 50µL.

X. ANEXO II

Equipamentos e Animais:

- Figura 01 - Agitador Tipo Vortex Q-220B (Quimis-SP)
- Figura 02 - Autoclave Vertical CS PRISMATEC
- Figura 03 - Balança Analógica SARTÓRIUS
- Figura 04 - Balança Digital BG 1000 GEHAKA
- Figura 05 - Câmara de Neubauer INLAB
- Figura 06 - Centrífuga de tubos MPW-350 R
- Figura 07 - Centrífuga de tubos Q-222T 18/28 (Quimis-SP)
- Figura 08 - Espectrofotômetro 600 (Fento)
- Figura 09 - Estufa de Cultura (FANEM-502)
- Figura 10 - Fluxo Laminar (Pachane-SP)
- Figura 11 - Micro-Pipeta DIGIPET 50µL
- Figura 12 - Micro-Pipeta DIGIPET 20-200µL
- Figura 13 - Microscópio Fluorescência TIME-IN
- Figura 14 - Microscópio Óptico TIM-2005-B
- Figura 15 - pHmetro modelo pH-N4 PROCYON
- Figura 16 - Coleta de sangue periférico de emas
- Figura 17 - Ema (*Rhea americana*)
- Figura 18 - Ema (*Rhea americana*)



Figura 01. Agitador Tipo Vortex Q-220B (Quimis-SP)



Figura 02. Autoclave Vertical CS PRISMATEC



Figura 03. Balança Analógica SARTÓRIUS



Figura 04. Balança Digital BG 1000 GEHAKA

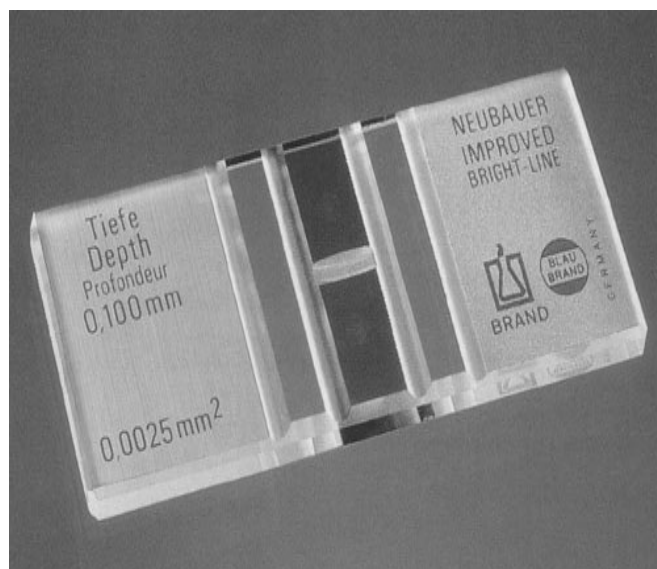


Figura 05. Câmara de Neubauer IMPROVED



Figura 06. Centrífuga de tubos MPW-350 R



Figura 07. Centrífuga de tubos Q-222T 18/28 (Quimis-SP)



Figura 08. Espectrofotômetro 600 (Fento)



Figura 09. Estufa de Cultura (FANEM-502)



Figura 10. Fluxo Laminar (Pachane-SP)



Figura 11. Micro-Pipeta DIGIPET 50µL



Figura 12. Micro-Pipeta DIGIPET 20-200µL



Figura 13. Microscópio Fluorescência TIME-IN



Figura 14. Microscópio Óptico TIM-2005-B



Figura 15. pHmetro modelo pH-N4 PROCYON



Figura 16. Coleta de sangue periférico de emas



Figura 17. Ema (*Rhea americana*) em cativeiro



Figura 18. (*Rhea americana*) em cativeiro

