



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

# **ESTUDO DA IMUNIDADE CELULAR E HUMORAL EM POTROS RECÉM-NASCIDOS**

ROSELY LUCHT RODRIGUES

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFPR, para a obtenção do Título de Mestre.

CURITIBA  
1993

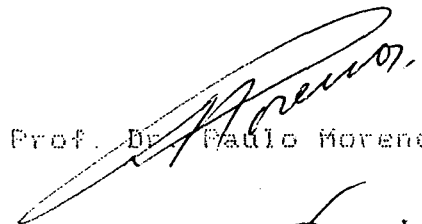
ROSELY LUCHT RODRIGUES

ESTUDO DA IMUNIDADE CELULAR E HUMORAL EM POTROS RECÉM-  
NASCIDOS

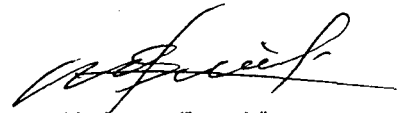
Tese aprovada, como requisito  
parcial para obtenção do Títu-  
lo de Mestre no Curso de Pós -  
Graduação em Ciências Veteri-  
nárias, pela Comissão formada  
pelos professores:



Orientador: Prof. Dr. Euripedes Ferreira



Prof. Dr. Paulo Moreno Bergoc



Prof. Dr. Metry Bacila

Curitiba, 23 de junho de 1993

Senhor tu me sondas e me  
conheces.

Antes mesmo que uma palavra  
esteja sobre a minha língua, eis, Senhor,  
que já a conheces toda.

Muito admirável é para mim essa  
ciência, é sublime: não posso atingi-la.

Sl 137

Ao José Valter e  
à Ana Julia

### AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Eurípides Ferreira, por sua valiosa orientação.

Ao Prof. Dr. Metry Bacila, coordenador do curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, pelo incentivo, apoio e amizade dispensados durante o curso.

A todos os profissionais do laboratório de Imunogenética do Hospital de Clínicas da UFPR. Em especial à Dra. Rosana I. S. Iorio e Dra. Mitoko Kurike, pela colaboração e pelo valioso auxílio prestado durante a realização das provas laboratoriais.

A Dra. Enny Basseti, Maria do R. B. Reis e Roserlei Rocha da seção de eletroforese do Hospital de Clínicas, pela contribuição que deram ao presente trabalho.

A Dra. Mirna Aso e Dra. Elvira Doi do laboratório de sorologia do Hospital de Clínicas pelo auxílio prestado.

A Dra. Beatriz Defreitas do laboratório de bioquímica do Hospital de Clínicas pelo auxílio prestado.

Ao meu marido, José Valter Rodrigues pelo constante apoio e carinho. E pelo inestimável auxílio prestado.

Ao Haras Santa Maria de Araras por ter colocado os potros a disposição.

Ao Dr. Joaquim L. de Alda e em especial a Dra. Neiva Deprá, pela colheita do material, assim como, pela disponibilidade e desprendimento mostrado.

A todos os meus familiares, pela mão amiga que sempre me ofereceram em todas as etapas de trabalho, em especial a minha mãe.

A Secretária do CPGCV, Tânia Mara Schrank, pela presteza, dedicação e amizade demonstrados.

As bibliotecárias do setor de Ciências Agrárias da UFPR, em especial a Lilliana.

A colega e amiga Thais R. C. Dittrich pelo auxílio prestado na confecção dos gráficos.

A todos os amigos que colaboraram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

A Lucia e Marta, especialmente a Elza Antaszczyszyn pelo auxílio prestado na confecção da tese.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, por haver promovido parte dos fundos necessários para a execução do trabalho realizado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior (Capes) por ter concedido a bolsa de mestrado.

E, sobretudo, a Deus que esteve presente em todos os momentos, e que me conduziu e permitiu a realização deste trabalho.

## CONTEUDO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1. Material biológico.....	11
3.2. Marcadores de linfócitos B.....	16
3.3. Marcadores de linfócitos T.....	17
3.4. Determinação da proteína total.....	18
3.5. Eletroforese de proteínas.....	19
3.6. Imunodifusão radial simples.....	19
4. RESULTADOS.....	22
4.1. Histórico dos potros estudados.....	22
4.2. Perfis eletroforéticos.....	27
4.3. Níveis de imunoglobulinas.....	30
4.4. Marcadores de membrana - linfócitos B.....	34
4.5. Marcadores de membrana - linfócitos T.....	36
5. DISCUSSÃO.....	39
6. CONCLUSOES.....	46
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	47

## ABREVIATURAS

RPMI	-	Roosevelt Park Memorial Institute
BFS	-	Bovine Fetal Serum
TCA	-	Acido Tricloro Acético
SRID	-	Simple Radial Imunodifusion
PSI	-	Puro Sangue Inglês
Ig	-	Imunoglobulinas
FTP	-	Falhas na Transferência Passiva

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- HISTÓRICO DOS POTROS ESTUDADOS NO PRESENTE TRABALHO.....	23
TABELA 2	- VALORES DAS PROTEÍNAS SÉRICAS DOS POTROS PSI.....	29
TABELA 3	- VALORES MÉDIOS DAS IMUNOGLOBULINAS SÉRICAS.....	32
TABELA 4	- DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DE LÍNFOCITOS B DE 10 POTROS PSI HIGIDOS.....	34
TABELA 5	- DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DE LÍNFOCITOS B DE 12 POTROS COM DIFERENTES OCORRÊNCIAS CLÍNICAS.....	35
TABELA 6	- DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DE LÍNFOCITOS T DE 12 POTROS PSI HIGIDOS.....	36
TABELA 7	- DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DE LÍNFOCITOS T DE 12 POTROS COM DIFERENTES OCORRÊNCIAS CLÍNICAS.....	37

## LISTA DE FIGURAS

FIG 1	-	DISPOSITIVO PARA COLHEITA DE SANGUE.....	13
FIG 2	-	DISPOSITIVO PARA A SEPARAÇÃO DE LINFOCITOS DO SANGUE HEPARINIZADO.....	15
FIG 3	-	PERFIL ELETROFORETICO DE PROTEINAS SERICAS DO POTRO N <sup>o</sup> 3 OBTIDAS A 0-24-48-72 HORAS.....	27
FIG 4	-	PERFIL ELETROFORETICO DE PROTEINAS SERICAS OBTIDAS A 30-60-90 E 120 DIAS.....	28
FIG 5	-	PERFIL DA IMUNODIFUSAO RADIAL. DOSAGEM DA IgG DO SORO DE ANIMAL HIGIDO.....	30
FIG 6	-	PERFIL DA IMUNODIFUSAO RADIAL. DOSAGEM DA IgM DO SORO DE ANIMAL HIGIDO.....	31
FIG 7	-	PERFIL DA IMUNODIFUSAO RADIAL. DOSAGEM DA IgA DO SORO DE ANIMAL HIGIDO.....	31
FIG 8	-	CONCENTRAÇÃO SERICA DE IgG, IgM E IgA AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO SOMATICO E CRONOLOGICO DE POTROS PSI.....	33
FIG 9	-	NÚMERO DE LINFOCITOS B E T NO SANGUE PERIFERICO AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO SOMATICO E CRONOLOGICO DE POTROS PSI.....	38

## RESUMO

Para um estudo dos parâmetros normais das condições imunológicas de potros PSI recém-nascidos até um seguimento de 120 dias, realizou-se a colheita e processamento de sangue periférico, para posterior obtenção de soro e linfócitos do mesmo. Para estabelecer níveis de imunoglobulinas da amostragem do soro obtido dos animais hígidos ( 10 ), realizou-se a determinação da proteína total, eletroforese de proteínas, e imunodifusão radial simples, verificando-se que os potros recém-nascidos são agamaglobulinêmicos ao nascer, apresentando apenas uma pequena quantidade de IgM. Já às 24 horas, as IgG, M e A dos potros apresentam níveis semelhantes aos do soro da égua, sendo que em todo o período de observação ( 120 dias ) cada uma das imunoglobulinas tem um comportamento diferente. Os níveis de IgG após 24 horas até às 72 horas permanecem em torno de 3450,6mg/dl, caindo ao final do primeiro mês para 2017,5 mg/dl, enquanto que no segundo, no terceiro e no quarto mês ficam em torno de 1406 mg/dl. A IgM dos potros, ao nascer, está em torno de 19,60 mg/dl indo a 46,26 mg/dl nas primeiras 72 horas, sofrendo um pequeno decréscimo ao primeiro mês ( 40,52 mg/dl ), estabilizando-se ao término do período de observação em torno de 81,78 mg/dl. Já a IgA, inexistente ao nascer, apresenta-se em torno de 75 mg/dl nas primeiras 72 horas, revelando uma queda no primeiro mês (42,4 mg/dl), finalizando o período de observação com 77,07 mg/dl. Para estabelecer os parâmetros normais das subpopulações linfocitárias T e B, usou-se técnicas de marcadores de membranas. Quanto aos linfócitos T, com a formação de rosetas com eritrócitos heterógenos, determinou-se que os mesmos, apresentam-se em torno de 3,4% a 10,8% em todo período de observação. Já os linfócitos B mostraram-se, através de técnicas de fluorescência, em porcentagens altas nos primeiros dias de vida (aproximadamente 37,95%) e após o 30º dia os valores estabilizaram-se entre 10,7% a 18,1%.

## ABSTRACT

The present study was undertaken in order to establish the normal immunological parameters, under normal conditions, of foal as newborn until 120 days of life. The humoral immunity was assessed through the assay of total protein in the serum, by electrophoresis and simple radial immunodiffusion. It was found that newborn foal has agammaglobulinemia soon after birth, with a very low level of IgM. However, after 24 hours, the serum levels of IgG, IgA and IgM are similar as the serum levels of its mother. The behavior of different immunoglobulins in the subsequent 120 days is quite different for each immunoglobulin. The IgG level between 24 and 72 hours is around 3450.6mg/dl, in the first month, falling to 2017.5mg/dl and by the second and third months is maintained at 1406m/dl. The IgM level at birth is around 19.60mg/dl, raising to 46.26mg/dl in the first 24 hours, falling to 40.52mg/dl by the first month and, again, raising and stabilizing at 81.78mg/dl at 120 days. The IgA, not present at birth, raises to 75mg/dl in the next 72 hours, falling to 42.4mg/dl in the first month and stabilizing at 77.07mg/dl by the 120 days. The T and B lymphocytes are determined by using specific surface marker of each sub-population. The T lymphocytes were identified through rosette formation, using guinea pig erythrocytes. The T lymphocytes ranged from 3.4% to 10.8% during the different periods of this study. The B lymphocytes were identified by detecting immunoglobulins on its surface. Anti-horse immunoglobulin conjugated with fluorescein was employed. A very high percentage of B lymphocytes (37.95%) was detected in the first days of life and after one month the percentage ranged between 10.7 and 18.1%

## 1. INTRODUÇÃO

O estudo das imunoglobulinas dos equinos tem sido objeto para aplicações na medicina humana e na medicina veterinária. A produção de soros hiperimunes contra diferentes bactérias, para posterior uso como terapêutica e profilaxia, permitiram identificar a heterogeneidade das imunoglobulinas equinas e sua mobilidade eletroforética.

O potro recém-nascido apresenta níveis séricos muito baixos de imunoglobulinas, portanto, esse quadro de hipogamablobulinemia é devido a natureza da placenta equina, que é do tipo epiteliocorial ( JEFFCOTT, 1975; ROBERTS, 1975; SILVA, 1983; ELLIOT & WAGNER, 1984; LAVOIE et al, 1989 ). Este tipo de placentação impede a transferência de imunoproteínas maternas aos recém-nascidos. Por este motivo, o potro depende da ingestão de colostro para obter um nível de imunidade compatível com a sobrevivência.

O colostro representa as secreções acumuladas na glândula mamária nas últimas 3 a 4 semanas da gestação. Sob influência estrogênica e progestágena, ocorre uma transferência de proteínas plasmáticas da circulação materna para o úbere. A

glândula mamária é capaz de selecionar e concentrar a imunoglobulina sérica, especialmente nas últimas 4 semanas pré-parto. A imunoglobulina predominante no colostro de todos os animais domésticos é a IgG, que pode ser responsabilizada por 65 a 90% do conteúdo total de imunoglobulina colostrai ( TIZARD, 1977). A secreção do colostro é de curta duração e ocorre apenas uma vez a cada gestação. Além de oferecer imunidade para o recém-nascido ele possui um efeito local, de proteger o trato intestinal contra a invasão de microrganismos patogênicos.

O incremento dos níveis de imunoglobulinas nos potros recém-nascidos ocorre através da absorção das imunoglobulinas do colostro por células especializadas do intestino delgado (JEFFCOTT, 1974 a; ROBERTS, 1975; JEFFCOTT, 1975; RUMBAUGH, et al., 1979; SILVA, 1983; ELLIOTT, 1984; WHITE & PUGH, 1988). Essa absorção se faz através de um processo de englobamento denominado pinocitose, que ocorre uniformemente por todo o intestino delgado. As imunoglobulinas são sequestradas em vacúolos intracelulares passando daí, íntegras, aos espaços intercelulares, transferindo-se aos linfáticos locais, chegando, finalmente, à circulação sistêmica ( JEFFCOTT, 1974 b ).

O colostro, além de ser uma fonte de proteínas imunes, contém certas substâncias capazes de aumentar a eficiência da absorção das macromoléculas, mas, tais substâncias ainda não

foram isoladas. Nos bovinos dois grupos de substâncias parecem estar envolvidos ( BALFOUR & COMLINE, 1962 ), uma fração proteica de baixo peso molecular, fosfato inorgânico e glicose-6-fosfato. Essas substâncias, provavelmente não são necessárias para o " Uptake " do material macromolecular, mas são importantes na transferência do material intracelular para o interior dos vilos intestinais.

As células absorptivas são aparentemente não seletivas em sua absorção ou na transferência de macromoléculas. Globulinas colostrais, uma variedade de anticorpos específicos e polímeros sintéticos, polivinil pirrolidone ( PVP K.60 ) mostraram ser rapidamente absorvidos ( JEFFCOTT, 1974 c ). Entretanto a seleção de proteínas imunes adequadas é feita na glândula mamária ( PIERCE & FEINSTEIN, 1965 ).

A absorção macromolecular é máxima logo após o nascimento, mas é progressivamente reduzida durante as primeiras 24 hs, devido à diminuição da permeabilidade intestinal (JEFFCOTT, 1973; JEFFCOTT 1974 c), aparentemente devido a uma substituição das células epiteliais transitórias por outras de caráter mais permanente ( JEFFCOTT, 1974 b ), incapazes de absorver macromoléculas intactas, cessando assim a absorção de imunoglobulinas maternas.

Ocorre ainda durante este período de permeabilidade

intestinal uma proteinúria transitória, nos potros que recebem colostro. Níveis de proteínas urinárias sobem rapidamente a um pico dentro de 6-12 hs, após a ingestão do colostro e declinam entre 24 e 38 hs. Portanto, mesmo que os potros continuem a receber o colostro após o bloqueio intestinal, cessa a proteinúria ( JEFFCOTT & JEFFCOTT, 1974 ).

Analises da proteína urinária por eletroforese e filtração em gel mostram ausência da gamaglobulina e a presença de quase que exclusivamente proteínas do leite de baixo peso molecular. O término da proteinúria indica o término da absorção macromolecular.

As três maiores causas de falhas na transferência passiva de anticorpos são (1) não ingestão de quantidades adequadas de colostro pelo potro, (2) baixos níveis de imunoglobulinas no colostro e, (3) falhas na absorção de imunoglobulinas após a ingestão do mesmo.

Potros orfãos, rejeitados, fracos ou com defeitos físicos podem não ingerir quantidades adequadas de colostro.

Potros de éguas com menos de 1000 mg/dl de Ig no colostro estão mais predispostos a apresentar falhas na transferência passiva - FTP, muitos autores citam que lactação prematura é uma das causas de baixos níveis de imunoglobulinas no colostro, sendo que tais mudanças hormonais podem estar associa-

das com placentite, separação prematura da placenta ou gestação gemelar. Outros autores (RUMBAUGH, 1979; PERRYMAN, 1981; RUMBAUGH, 1983) discordam com esta teoria. De 11 éguas PSI cujos potros sofreram de FTP, mais de 50% dos potros tiveram como causa da FTP, colostro com baixos níveis de Ig. Entretanto, nenhuma das éguas apresentou lactação prematura. Níveis baixos de Ig no colostro podem estar associados com parto prematuro (menos do que 320 dias de gestação), onde a égua não tem tempo suficiente para a produção de colostro. Entretanto, tal fato é incomum. E o mecanismo que causa baixos níveis de Ig no colostro permanece desconhecido.

Das FTP, 30% demonstraram ser devido a falha na absorção de quantidades adequadas de Ig. Uma suposta causa de falhas na absorção é a substituição prematura das células especializadas do intestino delgado.

LUZ et al (1992) afirmam que a proteção às infecções nos potros deve depender não só de uma concentração mínima de 800 mg/dl de Ig sérica, mas, também, das condições ambientais e de manejo.

Quanto à duração da imunidade maternal, JEFFCOTT (1975) diz que os níveis de anticorpos passivos caem rapidamente durante as 4 (quatro) primeiras semanas de vida, devido ao catabolismo dos anticorpos e diluição dos mesmos no plasma pelo

crescimento do potro. A meia vida da IgG passiva nos potros tem sido calculada em torno de 23 dias ( REILLY & MACDOUGALL, 1973; JEFFCOTT, 1974 a ). As taxas de desaparecimento das Ig passivas variam conforme sua especificidade , sendo que desaparecem totalmente entre 5 a 6 meses de idade.

Com respeito ao início da atividade imunitária e a síntese de Ig pelo potro , MILLER (1966) diz que a maturação imunológica não é algo que esteja pareada com o processo do nascimento, mas sim com a estimulação antigênica. A capacidade para a síntese de Ig se inicia em torno das 2 semanas de vida, supondo um período de atraso para a produção de Ig de 7 a 14 dias, indicando que a competência imunológica é adquirida logo após o nascimento. McGUIRE, CRAWFOAD (1973) relatam que a síntese de IgG e IgA provavelmente se inicia dentro dos primeiros 24 dias de vida do potro. Entretanto, esses autores, detectaram IgM em amostras de sangue do cordão umbilical, de potros que ainda não tinham recebido colostro, sugerindo, com isso, que a síntese de certa quantidade de Ig se inicia antes do nascimento. Citam, também, que o nível das Ig no soro dos potros é similar ao das éguas, dentro das primeiras 24 hs de vida.

Um outro braço do sistema imune, é o referente à imunidade celular, diretamente envolvido na defesa contra agentes infecciosos intracelulares ( vírus, microbactérias, etc...), nos

mecanismos de cooperação celular para a síntese dos anticorpos, anteriormente mencionados, e na ação de rejeição dos transplantes.

Respostas imuno-celulares em vertebrados e invertebrados dependem igualmente do ubíquo e multifuncional linfócito ( MACKAY, MACKAY, 1989 ). Entretanto, ainda no início dos anos 60, foram considerados como membros de poucas características da população leucocitária, e nos tecidos patológicos foram descritos somente como pequenas células redondas por causa da pequena quantidade de citoplasma e organelas funcionais. Porém, tudo isso mudou durante os últimos 25 anos.

Um dos primeiros sinais que a aparência poderia desmentir sua função, no caso dos linfócitos, foi a demonstração por GOWANS, KNIGHT (1964) de que essas células eram de longa vida e recirculantes e portanto deveriam servir para alguma importante função, tais como a de guardiãs da memória imunológica. Estudos de muitos pesquisadores nos anos de 1950 - 1960, incluindo cientistas veterinários ( GLICK, et al., 1956 ), ajudaram a identificar duas classes de linfócitos completamente distintas. Nas aves, uma das classes de linfócitos desenvolve-se num tecido único das aves, a bursa de Fabricius ( GLICK et al., 1956 ) enquanto que nos camundongos (representante dos mamíferos) a

outra classe se desenvolve no timo (MILLER, 1961). Assim, surgiu o conceito de linfócito T derivado do timo e linfócito B derivado da bursa (ROITT et al., 1969). Neste conceito, assumiu-se que os mamíferos deveriam ter, em algum lugar, um tecido equivalente à bursa de Fabricius no qual os linfócitos B migram e sofrem maturação; os vários locais propostos incluem as placas de Peyer no intestino delgado, o fígado e a medula óssea. Sabendo-se hoje que o tecido equivalente a bursa de Fabricius é a medula óssea.

Os linfócitos T e B foram reconhecidos como populações separadas por vários critérios, incluindo inicialmente, as propriedades funcionais e mais tarde as características da membrana celular.

Os linfócitos T estão envolvidos com a imunidade mediada por células, incluindo rejeição de enxertos, citotoxicidade celular e reações de hipersensibilidade do tipo retardada, enquanto que os linfócitos B são responsáveis pela síntese das Ig circulantes. Estas duas populações são distinguidas também, por formação de rosetas (linfócitos T) e pelas imunoglobulinas de superfície (linfócitos B).

Um dos maiores avanços em 1967 foi o reconhecimento de que, embora os linfócitos B sejam a fonte das Ig, é necessária a contribuição dos linfócitos T para que isto possa ocorrer. A síntese de Ig requer a colaboração dos linfócitos T e B (CLAMAN; CHAPERON, 1966; MITCHELL; Miller, 1968) sendo os linfócitos T

os que providenciam os sinais auxiliares. Mais tarde, novamente, experimentos com transferências de células em camundongos, davam a indicação de haver heterogeneidade entre os linfócitos T. Observou-se que algumas células T eram eficientes no auxílio da resposta imune, enquanto que outras eram citotóxicas (HOLM; PERLMANN, 1967), e ainda que outra população era eficiente na supressão da resposta imune (GERSHON, 1974).

Hoje, a existência de duas grandes populações de linfócitos nos órgãos linfóides e no sangue do homem e dos animais é muito bem reconhecida (FRYMUS; SCHOLLENBERGER, 1979).

Em relação aos linfócitos T foram testados eritrócitos de várias espécies, para a formação de rosetas com linfócitos equinos. Somente os eritrócitos de cobaia formaram grande número de rosetas (TARR et al., 1977; VAUTHEROT; SALMON, 1977).

Em uma pesquisa de FRYMUS; SCHOLLENBERGER (1979), a porcentagem dos linfócitos T e B de potros foi estudada. Observou-se que potros com poucos dias de vida possuíam somente 5% de linfócitos B, sendo que entre o 20º e 40º dia ocorria um aumento deles. Após esse período, os valores se estabilizavam (aproximadamente 12 a 15%) e se mantinham constantes até o fim do período de observação (160 dias). O valor médio dos linfócitos T variam de 5,2% a 16,1%. Observou-se, ainda, que os linfócitos T são menos dependentes da idade do potro.

## 2. OBJETIVOS

Considerando os fatos acima mencionados foram objetivos do presente trabalho estudar as condições imunológicas dos potros recém-nascidos, a fim de oferecer subsídios importantes aos mecanismos fisiopatológicos das doenças nessa espécie, em particular as de natureza infecciosa.

Este estudo visa estabelecer parâmetros normais dos níveis de imunoglobulinas e das sub-populações linfocitárias T e B em potros recém-nascidos e até 120 dias após o nascimento.

### 3. MATERIAL E METODOS

#### 3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Trinta potros Puro Sangue Inglês ( PSI ), sendo 19 fêmeas e 11 machos, pertencentes ao Haras Santa Maria de Araras, São José dos Pinhais, Paraná, foram utilizados para os estudos de avaliação da imunidade humoral e celular, constantes do presente trabalho. Todos esses animais nasceram no período de julho a agosto de 1991.

Logo após o nascimento, ainda antes da ingestão do colostro, por punção da veia jugular, foram colhidos de cada animal, 20 ml de sangue, sendo 10 ml com heparina ( 10 UI de heparina/ml de sangue ) e 10 ml sem anticoagulante. Para tanto, foram utilizadas agulhas de 30x10 e o sangue obtido diretamente em tubo de polipropileno, com capacidade para 50 ml.

Na sequência, de cada animal foram procedidas outras 7 colheitas de sangue, nas mesmas condições da primeira, de acordo com o seguinte cronograma: 24, 48 e 72 hs e 30, 60, 90 e 120 dias após o nascimento, perfazendo um total de 8 amostras para cada animal.

Tão logo obtidas, as amostras de sangue eram transportadas, à temperatura ambiente, para o Laboratório de Imunogenética do Hospital de Clínicas da UFPR, sendo todos os tubos acondicionados em caixas de isopor, previamente adaptadas para tanto.

Foi o seguinte o processamento levado a efeito com o material obtido da maneira como foi descrito mais acima.

a) Obtenção do soro:

A rede de fibrina de sangue não heparinizado e com retenção de coágulo foi rompida com o auxílio de um bastão de vidro e o material transferido para tubo de centrifuga e centrifugado à temperatura ambiente por 15 min. a 2000 rpm em centrifuga clínica. Ao final dessa operação, o sobrenadante, constituído pelo soro, foi transferido para outro tubo, e a seguir dividido em três alíquotas, e congeladas a - 20 C. Posteriormente foram utilizados para a determinação do perfil imunitário humoral de cada animal através dos seguintes parâmetros: determinação da proteína total, eletroforese de proteínas e imunodifusão radial simples.

Todas essas determinações foram procedidas, tão logo a colheita das 8 amostras de sangue de cada animal se completava.

b) Obtenção de linfócitos

Com a finalidade de obter os linfócitos B e T, as amostras de sangue heparinizado foram processadas imediatamente. Após ressuspender as células, com o auxílio de pipeta de transferência (conjunto Fig. 1), o sangue total era recomposto e processado do modo seguinte, de acordo com a metodologia de BANKS; GREENLLE (1981).

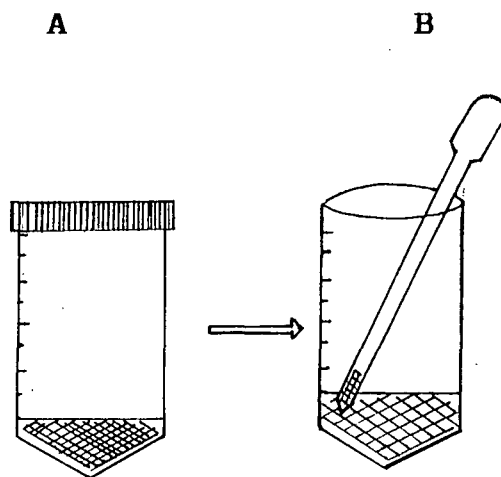


FIG. 1. DISPOSITIVO PARA COLHEITA (A) E RESSUSPENSÃO DO SANGUE PERIFÉRICO (B).

Inicialmente, o sangue ( 10 ml ) foi diluído até o volume de 24 ml com o meio RPMI - 1640 (MOORE; WOODS, 1976). O RPMI é um meio de cultura contendo todos os 20 alfa - aminoácidos de importância fisiológica, além de biotina, ácido pantotênico ( sal cálcico ) e colina. Após suspender todas as células de modo conveniente, transferiu-se o conteúdo para 2 tubos cônicos de polipropileno ( vol. 15 ml ), contendo 3 ml de histopaque (densidade 1083, WEISS, et al., 1989). O sangue transferido foi cuidadosamente depositado sobre o histopaque para que não se misturassem, como mostra a Fig. 2 A-B. Após esse procedimento, centrifugou-se o sangue por 30 min. a 1900 rpm em centrífuga clínica. Após a centrifugação, verificou-se, na interface a formação de um anel contendo os linfócitos, como é mostrado na Fig. 2. C. Foi, procedida, então, a retirada dos anéis de linfócitos, dos dois tubos, através de aspiração com pipeta de transferência.

Os linfócitos, assim obtidos, foram transferidos para um único tubo cônico de polipropileno, completando-se o volume do tubo com RPMI, até 15 ml. Após centrifugação por 10 min. a 1000 rpm o sobrenadante foi descartado e as células novamente ressuspensas com RPMI com auxílio de pipeta e recentrifugadas. Este procedimento de lavagem dos linfócitos foi repetido por 2 vezes. Na última ressuspensão, o meio (RPMI) foi enriquecido com

20% de soro fetal bovino estéril. Feito isso, acertou-se a concentração das células ( $2000/\text{mm}^3$ ) com o auxílio de câmara de Neubauer.

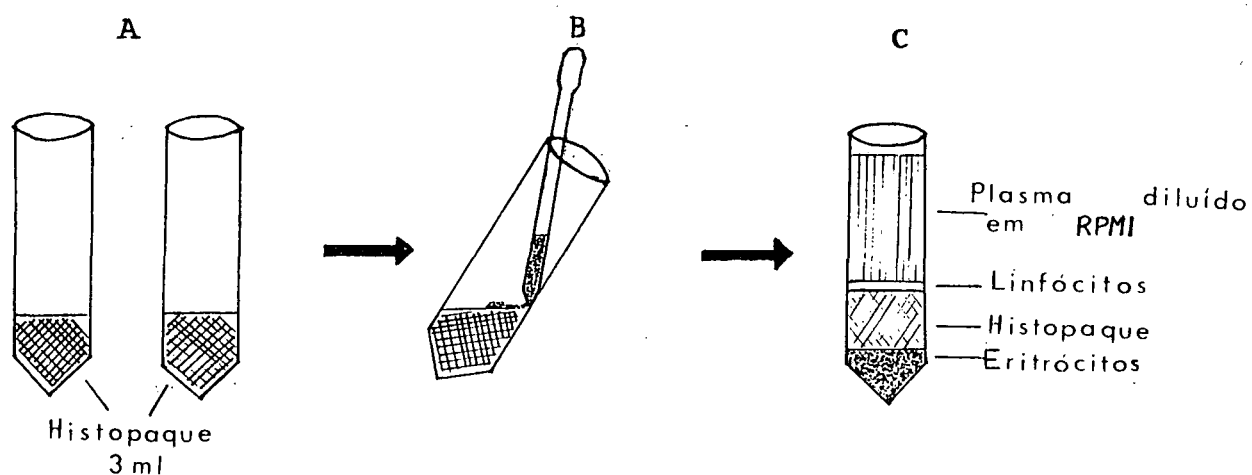


FIG. 2. DISPOSITIVO PARA A SEPARAÇÃO DE LINFÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO. A. TUBOS DE POLIPROPILENO CONTENDO 3ml DE HISTOPAQUE. B. DISPOSITIVO PELO QUAL O SANGUE TOTAL SUSPENSO EM RPMI É TRANSFERIDO CUIDADOSAMENTE SOBRE O HISTOPAQUE. C. SEPARAÇÃO DOS DIFERENTES COMPONENTES DO SANGUE APOS CENTRIFUGAÇÃO POR 30 MIN. A 1900 rpm.

Após o ajuste da concentração de linfócitos este material foi utilizado para se quantificar linfócitos T e B.

### 3.2 MARCADORES DE LINFÓCITOS B

Foram utilizados como marcadores de linfócitos B as Imunoglobulinas de Superfície. Para tanto transferiu-se 0,2 ml da suspensão de linfócitos, com a concentração ajustada, para um tubo de ensaio, adicionando-se, 5,8 ml de RPMI. A seguir, o material foi centrifugado por 10 min. a 1000 rpm à temperatura ambiente. Essa operação foi repetida mais duas vezes, sendo que na última delas, o RPMI foi adicionado de 0,01 ml de solução de azida sódica (sigma - S2002) e 0,1% de albumina bovina (fração V em pó de 96-99% de pureza). Após a 3ª vez em que as células foram lavadas, desprezou-se o sobrenadante, deixou-se o tubo de ensaio virado sobre uma gaze para que todo o excesso de RPMI fosse eliminado, acrescentando-se 0,1ml de conjugado (anti-imunoglobulina equina + fluoresceína) (HORSE IgG - FITC - HOST Animal-Rb -F - 7759, Sigma) em diluição de 1:40. Deixou-se as células com o conjugado incubando a 4 C por 45 minutos. Após esse período, lavou-se mais 2 vezes as células com RPMI contendo azida sódica e albumina bovina, nas diluições já citadas, por 5 min.

a 1000 rpm e deixou-se o tubo de ensaio virado sobre gaze, na última vez, para que todo o excesso de líquido fosse eliminado. Assim, tinha-se as células prontas para se montar a lâmina. Após, acrescentou-se 10 ul de glicerina tamponada com hidróxido de Sódio ( pH 7,2 ), com pipeta de Ependorf, no tubo de ensaio contendo os linfócitos. As células foram ressuspensas e transferidas para uma lâmina de vidro de microscopia vedando-se a seguir com laminula e esmalte. A leitura da lâmina foi feita em microscópio de fluorescência, com a objetiva de imersão. Contou-se 100 linfócitos e verificou-se qual a porcentagem de linfócitos fluorescentes, para caracterizar os linfócitos do tipo B.

### 3.3 MARCADORES DE LINFOCITOS T

Para a identificação dos linfócitos T utilizou-se como indicadores, a formação de rosetas espontâneas com eritrócitos de cobaia. Hemácias de cobaia (obtidas de fonte comercial) foram lavadas 2 vezes em soro fisiológico e 1 vez em RPMI - 1640, a 20% de BFS por 10 min. a 1000 rpm. Essa preparação de hemácias de cobaias é fornecida em meio ALSEVER contendo a seguinte composição: solução de glicose 2,05%; cloreto de Na 0,42%; citrato

de Na 0,8%; ác. cítrico 0,05%. O meio é esterilizado com vapor fluente e o pH é de 6,1. Retirou-se o sobrenadante com pipeta e acertou-se a concentração das hemácias a 0,5% (1ml de RPMI + 5 ul da papa de hemácias ). Tomou-se 0,1 ml dessas hemácias a 0,5% e centrifugou-se 3 min., desprezou-se o sobrenadante e acrescentou-se 0,1 ml da suspensão de linfócitos, obtida de acordo com o item 2, além de 0,1 ml de BFS. Incubou-se então por 30 min. a 37 C, centrifugou-se em seguida por 5 min., a 1000 rpm. Deixou-se incubando por 1 hora a 4 C para, a seguir, ressuspendeu-se gentilmente o " pellet " de células, com o auxílio de uma pipeta, acrescentando em seguida 5 ul de solução de azul de metileno. Fez-se a contagem das rosetas em câmara de Neubauer, considerando-se roseta a todo linfócito com mais de 3 hemácias de cobaia aderidas a ele.

#### 3.4 DETERMINAÇÃO DA PROTEINA TOTAL

A proteína total foi determinada pelo método do biureto, de conformidade com a descrição de VILLELA et al., (1973), do método de WEICHSELBAUM.

### 3.5 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS

Foram usadas na eletroforese de proteínas fitas de cellogel (CHEMETRON), que foram mergulhadas em tampão Tris - glicina pH 9,0 durante 15 a 20 min. Retirou-se o tampão em excesso com papel absorvente. Aplicou-se, depois, 3-5  $\mu$ l de cada amostra do soro, que foi descongelado à temperatura ambiente e usado sem diluição (EK, 1970) às fitas. As mesmas foram montadas numa câmara de eletroforese em tampão Tris - glicina e submetidas a 200 v durante 25 min. Em seguida, mergulhou-se as fitas em solução a 0,5% do corante Ponceau - S em TCA a 5% para corar as faixas de proteínas. Lavou-se então o corante em excesso com ácido acético a 5% e as fitas opacas foram clarificadas mergulhando-as em uma mistura de metanol - ácido acético e glicerol por 3-5 min. Em seguida, as fitas foram colocadas em estufa à temperatura de 50 C sobre uma lâmina, por 2-3 min. para posterior leitura em densitômetro das frações proteicas obtidas.

### 3.6 IMUNODIFUSÃO RADIAL SIMPLES (SRID)

Para o estudo de imunodifusão radial simples das imunoglobulinas presentes no soro dos animais em estudo, foram

empregados kits de SRID. Esses kits são montados com placas de gel de agarose contendo anticorpos anti-imunoglobulinas equinas. Três classes de imunoglobulinas foram dosadas através destes Kits: IgG, IgA e IgM. Para cada classe de Ig havia Kits específicos. Para a dosagem da IgG o soro foi diluído na proporção de 1:5. Para as outras Ig foi usado soro não diluído. Após descongelamento do soro à temperatura ambiente e diluição de parte do mesmo para a dosagem da IgG, aplicou-se 3 ul de soro nos poços de gel de agarose, nas respectivas placas, isto é, nas placas para IgG, IgM e IgA. Após aplicação, o soro difundiu-se e reagiu com o anticorpo específico determinando a precipitação do complexo antígeno - anticorpo, originando as curvas radiais específicas. As placas permaneceram à temperatura ambiente após a aplicação do soro. Após 48 horas, os diâmetros dos anéis foram lidos com a régua específica. Curvas obtidas através de soros padrões forneceram, por fim, os valores em mg/dl das imunoglobulinas presentes no material estudado.

Os seguintes materiais foram utilizados no presente trabalho:

Liquemine - Roche - 1ml:5.000 UI de heparina; RPMI 1640 - Sigma R - 6504; Histopaque 1083 contendo Ficoll Tipo 400 e

diatrizoato de Na - Sigma; Soro fetal bovino estéril (Laborclin);  
Azida sódica cristalizada - Sigma; Albumina bovina - Sigma;  
Conjugado - horse fitc, Sigma; Hemácias de cobaia em alsever,  
Laborclin; Cellogel "strip", Chemetron; IgA, IgM, IgG SRID kit,  
VMRD, Inc. Os demais produtos químicos utilizados no presente  
trabalho foram todos de boa qualidade e obtidos de boas fontes  
comerciais.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 HISTÓRICO DOS POTROS ESTUDADOS

A Tab. 1 mostra dados sobre o histórico dos potros utilizados no presente trabalho. Verifica-se que de 30 animais estudados, 10 tiveram desenvolvimento normal, dentro dos padrões de higidez. Dois potros foram acometidos de processo pneumônico e submetidos a antibioticoterapia, mas não receberam plasma. Doze animais tiveram vários problemas de saúde e foram submetidos a tratamento com antibiótico, além de terem recebido plasma. Seis animais tiveram o histórico interrompido, sendo dois por morte, três por transferência de domicílio e outro por outros motivos.

TAB. 1 - HISTÓRICO DOS POTROS ESTUDADOS

POTRO N°	SEXO	HÍGIDOS SEM INTERCORRÊNCIA CLÍNICA NOS 120 DIAS ESTUDADOS.	COM INTERCORRÊNCIA CLÍNICA ADMINISTRAÇÃO DE PLASMA EM ALGUM PERÍODO DOS 120 DIAS.	SEM ADMINISTRAÇÃO DE PLASMA.	HISTÓRICO INTERROMPIDO DEVIDO MORTE, TRANSFERÊNCIA DE DOMICÍLIO OU OUTROS.	DATA DE NASCIMENTO	OBS.
1	F	X	-	-	-	16/07/91	-
2	M	X	-	-	-	17/07/91	-
3	F	X	-	-	-	20/07/91	-
4	M	X	-	-	-	20/07/91	-
5	F	-	recebeu 2.100ml de plasma hiperimune aos 4 dias de idade.	-	-	25/07/91	Recebeu plasma por apresentar teste de imunodifusão em agar gel negativo para {Rho-} {dococcus} {equi}.
6	F	-	Recebeu 1.170ml de plasma hiperimune, por apresentar TSI abaixo do padrão, nos dias 26-27 e 28/07.	-	-	25/07/91	No dia 16/09, apresentou estertor seco nos pulmões, temperatura de 39,6 C, secreção serosa nasal, gengivite Vacina- {R.} {equi.} Medicação - 1g rifocina, 2,5g de eritromicina, 6g ventipulmin, 600mg Fluimucil.
7	M	X	-	-	-	25/07/91	-
8	F	X	-	-	-	26/07/01	-
9	F	-	-	X	-	27/07/91	23/08 - Ampicilina 2g e Fluimucil 200mg. Tosse seca, secreção serosa nasal bilateral.
10	F	-	-	-	X	27/07/91	28/04 - Enviado para Campinas.
11	F	X	-	-	-	27/07/91	-
12	M	X	-	-	-	28/07/91	-

POTRO	SEXO	HABIDOS	COM INTERCORRÊNCIA CLÍNICA	HISTÓRICO	DATA DE	OBS.	
N		SEM INTERCORRÊNCIA CLÍNICA NOS 120 DIAS ESTUDADOS	ADMINISTRAÇÃO DE PLASMA EM ALGUM PERÍODO DOS 120 DIAS.	SEM ADMINISTRAÇÃO DE PLASMA.	INTERROMPIDO DEVIDO MORTE, TRANSFERÊNCIA DE DOMICÍLIO OU OUTROS.	NASCIMENTO	
13	M	-	-	-	X	29/07/91	01/08 - Morreu por septicemia, por }E.} coli
14	F	X	-	-	-	29/07/91	-
15	F	-	-	-	X	29/07/91	22/08 - Enviado para o RS. Morreu no RS, por pneumonia por }R.} {equi}
16	F	-	4-16/08- Recebeu 7.000ml de plasma nbo hiperimune.	-	-	01/08/91	5/08-clínica e diarreia HEMOCULTURA-streptococcus alfa hemolítico COPROCULTURA - proteus mirabilidis E. coli e Klebsiella spp. MEDICAÇÃO - colestase, 500 mg rifocina, ringerlactato, glicose 5% citosina, hidralite + hidrabene. 9/08- nova medicação - quemicetina succinato 3g, 10ml de simecoplus hidralite, glicose 5%, Ringer lactato.
17	F	-	-	-	X	04/08/91	24/08 - Enviado para Campinas.
18	M	-	-	-	X	08/08/91	-
19	F	X	-	-	-	13/08/91	-
20	M	-	18/09 - 04/10 2.230ml, 28/10-04/11 - 1.200ml Plasma hiperimune contra R. equi	-	-	14/08/91	06/10 - 39,6C traquia com secreto. MEDICAÇÃO - Ampicilina 2g, Fluimicil 200mg. 28/10 - Vacina contra }R.} {equi}.
21	M	-	19/09-02/10-Recebeu 3.370ml de plasma hiperimune contra }R.} {equi}.	-	-	14/08/91	-

POTRO N°	SEXO	HÍGIDOS SEM INTERCORRÊNCIA CLÍNICA NOS 120 DIAS ESTUDADOS.	COM INTERCORRÊNCIA CLÍNICA ADMINISTRAÇÃO DE PLASMA EM ALGUM PERÍODO DOS 120 DIAS.	SEM ADMINISTRAÇÃO DE PLASMA.	HISTÓRICO	DATA DE NASCIMENTO	OBS.
22	F	-	22/10-2.000ml de plasma hiperimune contra }R.equi}	-	-	14/08/91	17/10 - Pneumonia. MEDICAÇÃO - Ampicilina 2g, Fluimucil 200mg. 19/10-Troca de medicamento - 1g de rifocina, 250mg de eritromicina, Fluimucil 200mg, 6g de Ventipulmim 22/10-Guemicetina succinato-3g-vacina contra }R.equi}-3 doses.
23	M	-	3.260ml de plasma hiperimune contra }R.equi}.	-	-	17/08/91	3/10-Pneumonia. 19/10-Morte.
24	M	-	1840ml de plasma hiperimune contra }R.equi}.	-	-	19/08/91	Petro com teste de imunodifusão em agar gel negativo para }R.equi} início de plasma hiperimune.
25	F	-	23/09-5/11-11.310 ml de plasma hiperimune.	-	-	21/08/91	14/09-Diarréia-Citocina, colestase e imosec 23/09-Aumento de vol. abdominal - início de plasma hiperimune. Recebeu 3 doses de vacina-}R.equi}
							25/09-1g Rifocina, 250 mg Eritromicina, 10ml Thiaminase, 10ml Simecoplus, 30ml de Tagamet, 10ml Ornitaqin.
26	F	-	03/11/91-29/01/92 Recebeu 10.460ml de plasma hiperimune contra }R.equi}.	-	-	22/08/91	31/10-Pneumonia-1g de de Rifocina, 250mg de Eritromicina, 600mg de Fluimucil, 6g de Ventipulmim, Guemiretina succinato 3g, 100ml de Dimetilsulfóxido diluído em 1000ml de solução fisiológica sulfato de gentamicina.

POTRO N°	SEXO	HYGIDOS SEM INTERCORRÊNCIA CLÍNICA NOS 120 DIAS ESTUDADOS	COM INTERCORRÊNCIA CLÍNICA ADMINISTRADO DE PLASMA EM ALGUM PERÍODO DE 120 DIAS.	SEM ADMINISTRAÇÃO DE PLASMA	HISTÓRICO INTERROMPIDO DEVIDO MORTE TRANSFERÊNCIA DE DOMICÍLIO OU OUTROS.	DATA DE NASCIMENTO	OBS.
27	F	-	10/09-900ml de plasma nbo hiperimune.	-	-	23/08/91	10/09-Diarrria sem febre, Equitrin, Imoset, Colestase, Citosina e Ringer Lactato.
28	F	-	10/09-16/09-800ml de plasma nbo hiperimune. 17/09-30/09-3700ml de plasma hiperimune.	-	-	25/08/91	10/09-Diarrria,sem febre, equitrin, imoset, colestase, citosina e ringer lactato.
29	F	-	02/10-08/10-3710ml de plasma hiperimune }contra} R.equi}.	-	-	25/08/91	Motivo do plasma-potro fraco positivo para }R.} }equi}.
30	M	-	-	X	-	25/8/91	02/10-Pneumonia-Ámpicilina 2g, 1,3ml sulfato de gentamicina 280mg, Fluimicil 200 mg, 4,5g Ventipulmim 06/10-Quemacetina 3g, 4,5g Ventipulmim,200mg

Fluimicil.  
3 doses de vacina  
contra }R.equi}.

## 4.2 PERFIS ELETROFORETICOS

A Fig. 3 mostra os perfis eletroforéticos do soro do potro nº 3 obtido a zero hora, 24, 48, 72 horas e a Fig 4 mostra os perfis eletroforéticos do soro do potro nº 3 obtidos a 30, 60, 90 e 120 dias de idade. Verifica-se no soro obtido logo após o nascimento ( zero hora ) a ausência da gama-globulina que já está presente a partir do soro de 24 horas.

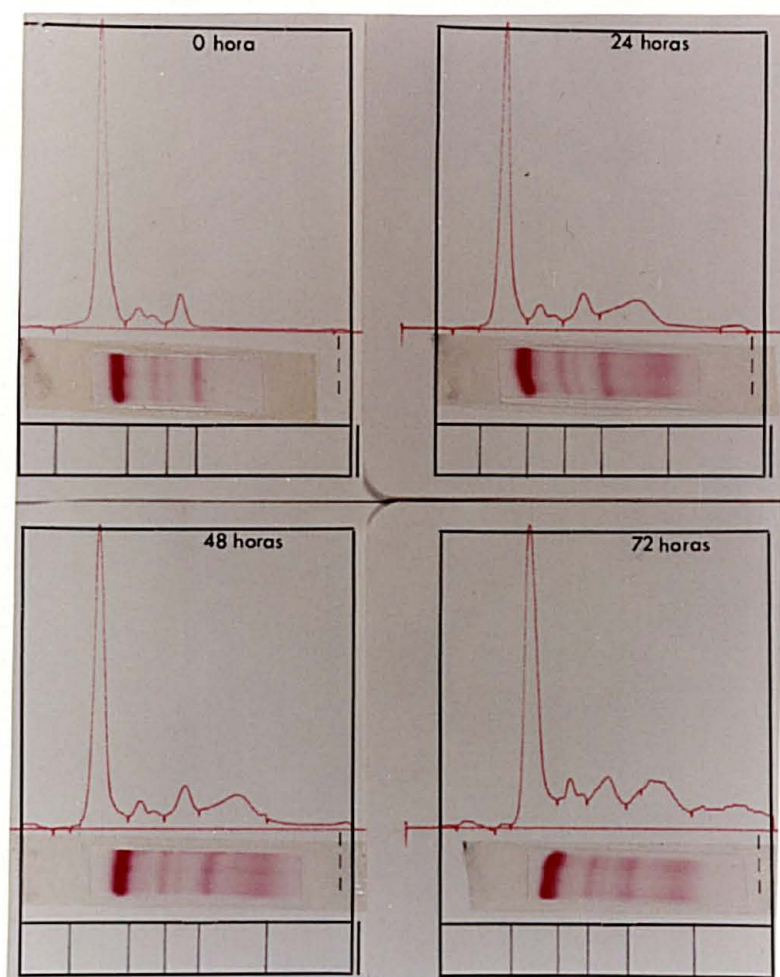
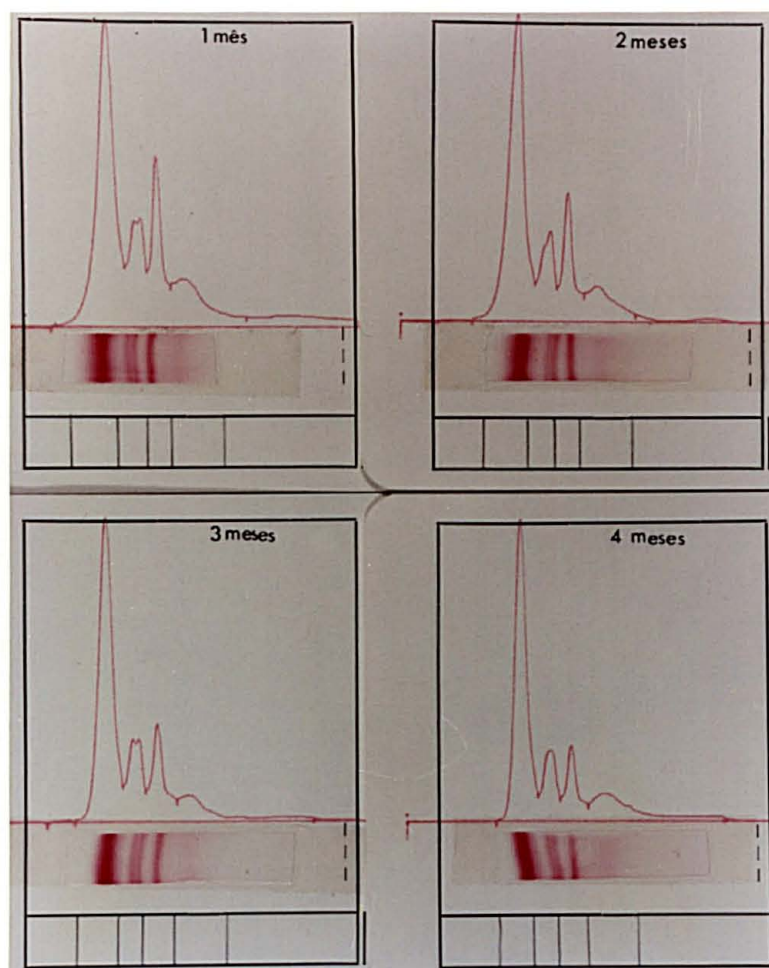


FIG. 3. PERFIL ELETROFORETICO DE PROTEINAS SERICAS DO POTRO Nº 3 OBTIDAS A 0-24-48-72 HORAS.



PERFIL ELETROFORÉTICO DE PROTEÍNAS SÉRICAS DO POTRO Nº 3  
OBTIDAS A 30-60-90 E 120 DIAS.

Na Tabela 2 encontram-se os valores obtidos pela eletroforese de proteínas, em 10 potros hípidos e nos diferentes períodos do presente estudo.

TABELA 2 - ELETROFORESE DE PROTEÍNAS (VALORES MÉDIOS) DE 10 POTROS SADIOS

	Proteína Total	Albumina g/%	Alfa g/%	Beta g/%	Gama g/%	Relação A/G
0h	3,84,±0,53	2,71	0,53	0,60	-	2,40
24 hs	4,95,±0,84	2,53	0,52	0,82	1,07	1,05
48 hs	4,82,±0,70	2,66	0,46	0,74	0,95	1,24
72 hs	4,88,±0,86	2,31	0,56	0,82	1,17	0,90
1 mês	4,78,±0,52	2,39	0,60	0,99	0,80	1,00
2 mes.	4,99,±0,38	2,48	0,62	1,00	0,88	0,99
3 mes.	4,90,±0,07	2,62	0,59	0,98	0,70	1,15
4 mes.	4,99,±0,23	2,60	0,62	1,03	0,72	1,10

#### 4.3 NIVEIS DE IMUNOGLOBULINAS

Níveis séricos de imunoglobulinas IgA, IgG e IgM, dos animais relacionados na Tabela 1, foram determinados por imunodifusão radial.

As Fig. 5, 6 e 7 mostram o perfil de imunodifusão radial levado a efeito com soro equino do animal nº 3.

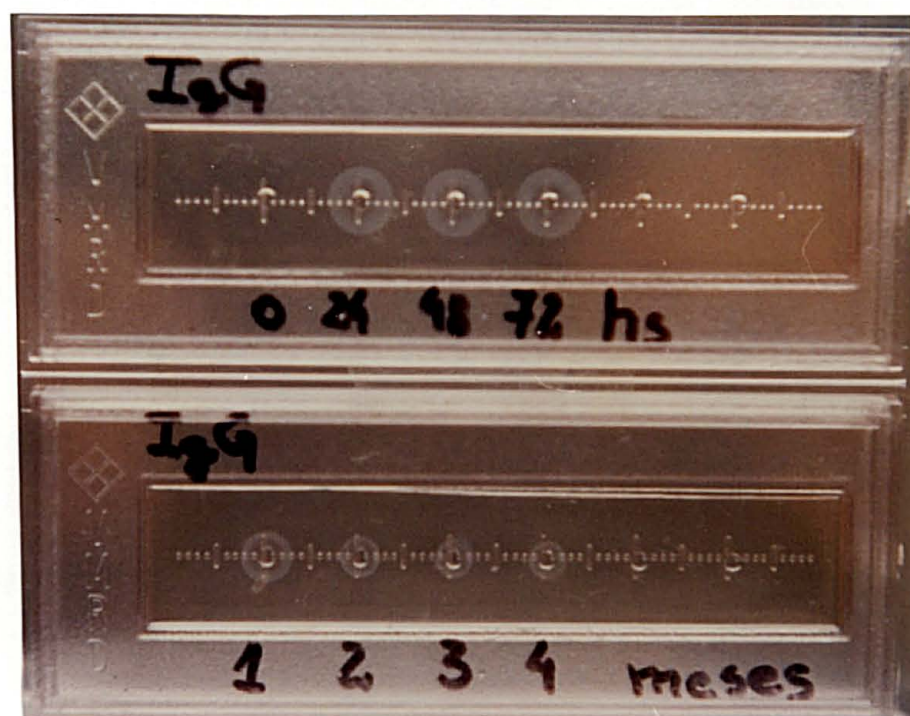


FIG. 5 - PERFIL DA IMUNODIFUSÃO RADIAL. DOSAGEM DA IgG DO SORO DE ANIMAL HIGIDO ( Nº 3 ).

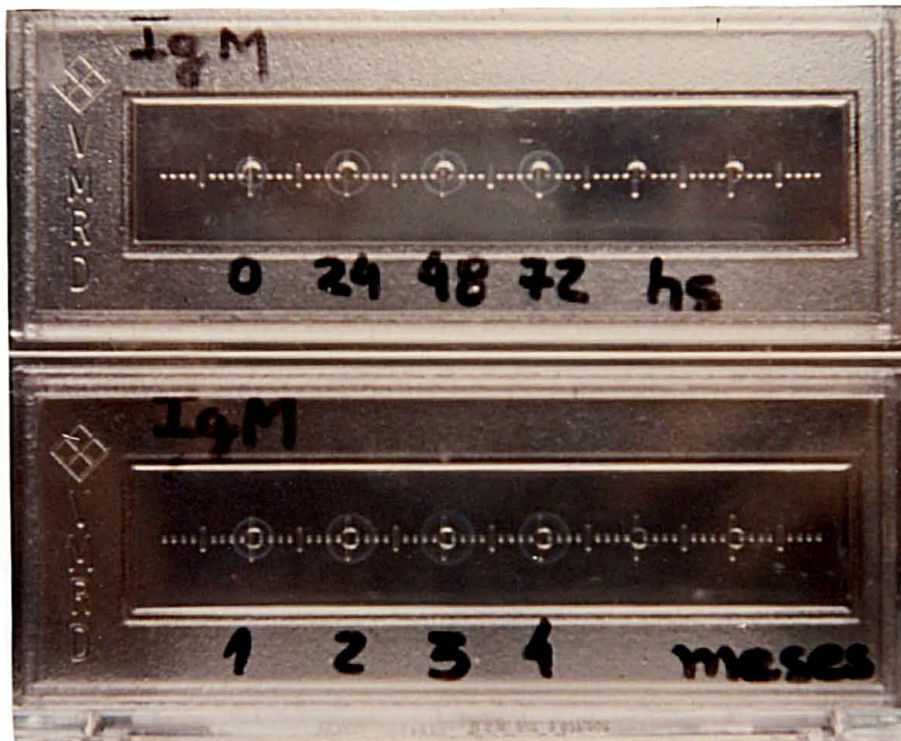


FIG. 6 - PERFIL DE IMUNODIFUSAO RADIAL. DOSAGEM DA IGM DO SORO DE ANIMAL HIGIDO ( N<sup>o</sup> 3 ).

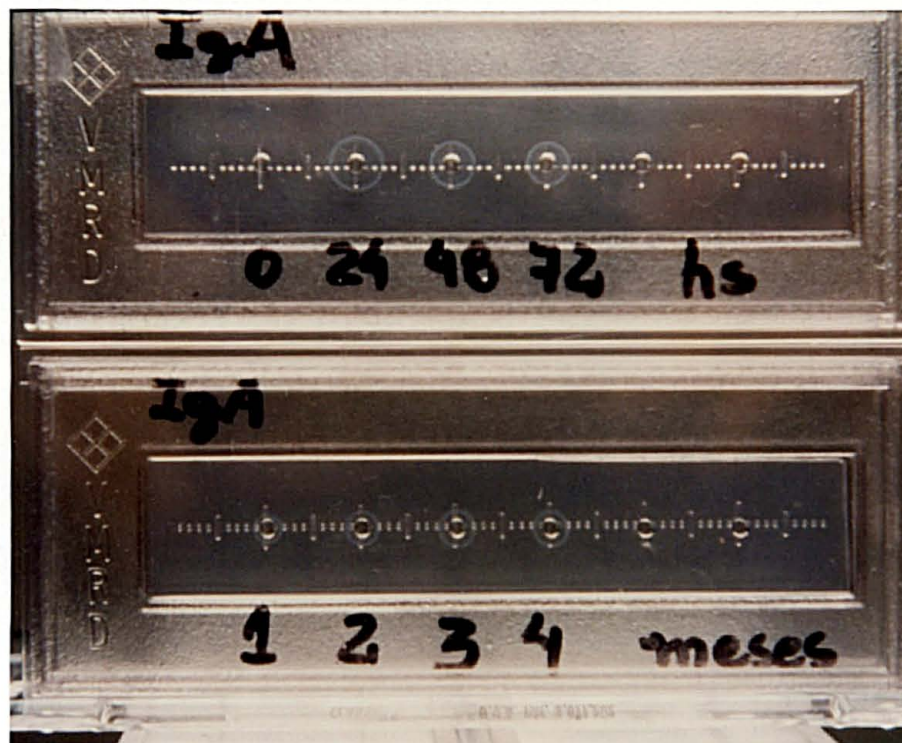


FIG. 7 - PERFIL DA IMUNODIFUSAO RADIAL. DOSAGEM DA IGA DO SORO DE ANIMAL HIGIDO ( N<sup>o</sup> 3 ).

Por outro lado, a Tabela 3 mostra os valores médios, calculados a partir de 10 animais hígidos da evolução das imunoglobulinas séricas, IgG, IgM e IgA, no tempo do desenvolvimento desses animais, partindo de zero hora até 120 dias.

TABELA 3 - DOSAGEM DAS IMUNOGLOBULINAS SÉRICAS ATRAVÉS DA IMUNODIFUSÃO RADIAL SIMPLES (VALORES MÉDIOS) DE 10 POTROS SÁDIOS. VALORES DADOS EM mg/dl

	IgG	IgM	IgA
0 h	-	19,60,±4,48	-
24 hs	3678,5,±946,39	49,25,±13,83	92,0,±41,37
48 hs	3258,0,±784,48	43,45,±16,08	70,0,±43,15
72 hs	3415,5,±1428,87	46,10,±18,53	63,0,±28,55
1 mês	2017,5,±534,60	40,52,±7,25	42,4,±7,50
2 mes.	1403,0,±295,67	73,81,±27,28	57,3,±9,00
3 mes.	1362,0,±275,62	78,27,±18,29	76,4,±19,57
4 mes.	1453,0,±416,84	93,27,±26,22	77,07,±20,78

A Fig. 8 mostra uma visão panorâmica da evolução das Ig G, M e A séricas ao longo do desenvolvimento dos potros PSI sádios estudados no presente trabalho.

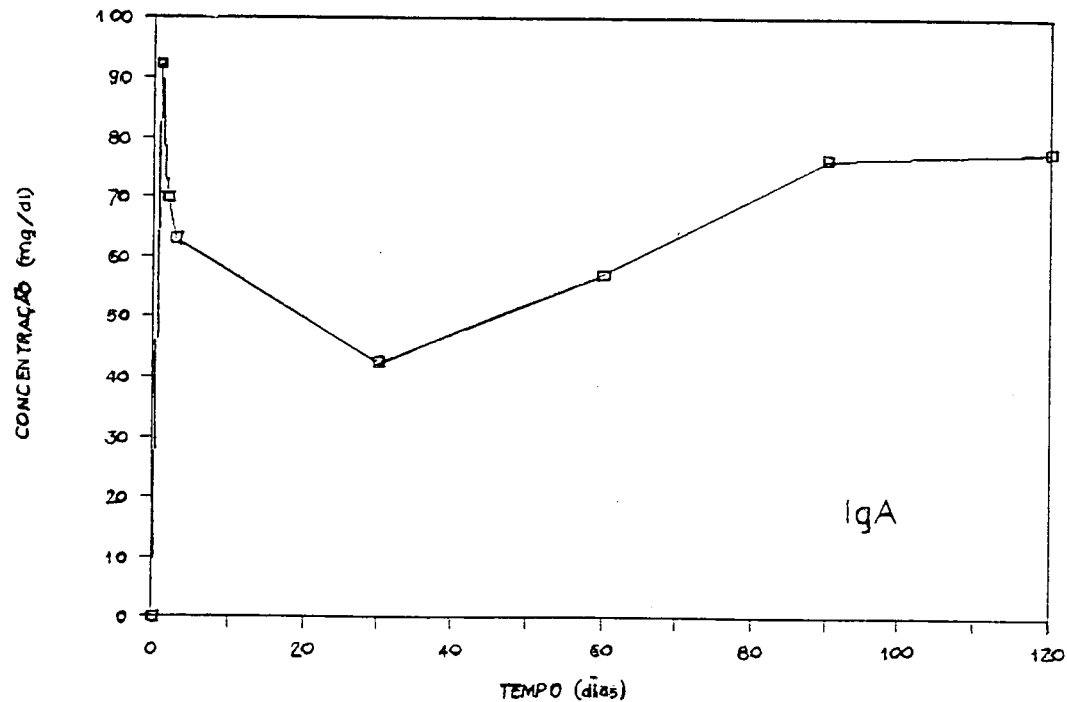
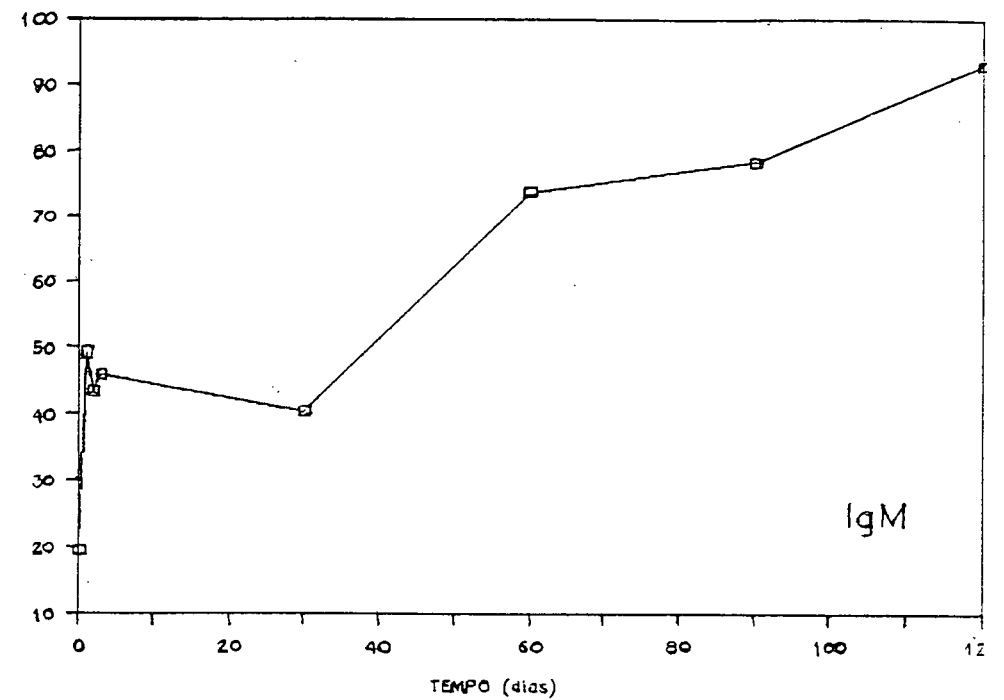
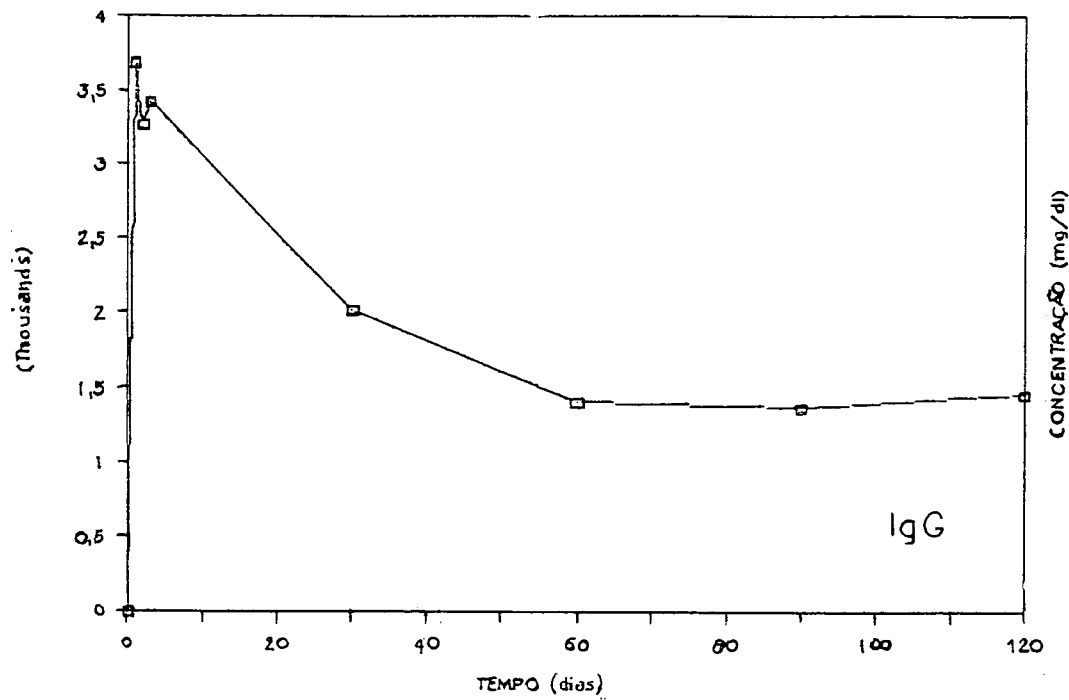


Fig. 8 Concentração sérica da IgG, IgM e IgA ao longo do desenvolvimento somático e cronológico de potros PSI.

## 4.4 MARCADORES DE MEMBRANA - LINFOCITOS B

A Tab. 4, mostra a distribuição percentual de linfócitos B, no sangue total de 10 potros PSI hígidos, enquanto que a Tab. 5 mostra esses dados para animais com diferentes ocorrências clínicas.

TABELA 4 DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DE LINFOCITOS B DE 10 POTROS SADIOS. DADOS EM %

* 1	2	3	4	7	8	11	12	14	19	Média	
0 h	13	59	31	18	32	61	49	42	26	35	36,6,±16,16
24 hs	40	51	41	20	24	39	43	50	32	48	38,8,±9,83
48 hs	28	64	57	46	27	30	43	47	34	40	41,6,±12,39
72 hs	21	50	24	61	34	21	57	51	13	16	34,8,±18,25
1 mês	11	7	5	15	12	13	10	6	6	22	10,7,±5,20
2 mes.	11	10	11	12	24	10	10	13	9	10	12,0,±4,37
3 mes.	20	8	15	5	12	13	11	30	6	9	12,9,±7,46
4 mes.	39	24	11	15	26	6	16	14	12	18	18,1,±9,42

\* Número de identificação dos Potros estudados.

TABELA 5 DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DE LINFOCITOS B DE 12 POTROS COM DIFERENTES OCORRENCIAS CLINICAS. DADOS EM %.

*	5	6	16	20	21	22	24	25	26	27	28	29
0 h	10	38	41	13	33	18	25	39	52	34	29	30
24 hs	25	39	51	16	26	25	29	37	40	49	30	28
48 hs	44	52	48	22	25	17	20	39	60	39	21	19
72 hs	35	40	30	11	41	15	22	23	41	18	20	17
1 mês	16	11	20	4	7	7	6	15	10	9	4	5
2 mes.	10	5	8	17	34	20	10	14	12	11	5	10
3 mes.	11	6	6	27	15	9	11	6	25	19	16	14
4 mes.	11	11	17	23	47	18	12	12	37	18	21	10

\* Número de identificação dos Potros estudados.

## 4.5 MARCADORES DE MEMBRANA - LINFÓCITOS T

A Tab. 6, mostra a distribuição percentual de linfócitos T, identificados como rosetas, em sangue 10 animais sadios, enquanto que a Tabela 7 mostra os valores encontrados no sangue de animais com diferentes ocorrências clínicas.

TABELA 6 DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DOS LINFÓCITOS T DE 10 POTROS SADIOS. DADOS EM %.

*	1	2	3	4	7	8	11	12	14	19	Média
0 h	20	8	3	3	3	2	4	3	1	9	5,6,±5,66
24 hs	14	4	4	4	5	5	10	8	2	2	5,8,±3,79
48 hs	11	2	3	4	6	1	4	1	1	1	3,4,±3,17
72 hs	9	6	3	5	4	14	6	3	2	4	5,6,±3,50
1 mês	17	8	11	5	17	15	16	12	4	3	10,8,±5,50
2 mes.	8	3	3	5	8	11	16	8	7	9	7,8,±3,85
3 mes.	7	5	10	7	8	8	9	7	4	5	7,0,±1,88
4 mes.	6	1	5	2	6	11	4	9	2	4	5,0,±3,16

\* Número de identificação dos Potros estudados.

TABELA 7 DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DOS LINFOCITOS T DE 12 POTROS COM DIFERENTES OCORRÊNCIAS CLÍNICAS. DADOS EM %.

	* 5	6	16	20	21	22	24	25	26	27	28	29
0 h	3	2	9	2	2	1	5	4	9	1	14	19
24 he	1	3	5	1	1	1	2	5	3	4	12	2
48 he	8	2	15	1	2	2	2	3	10	3	4	17
1 mês	8	6	4	7	6	2	1	22	17	16	5	5
2 mes.	4	3	14	33	18	4	10	8	14	5	13	12
3 mes.	5	4	8	13	13	11	5	5	14	9	13	19
4 mes.	4	5	4	9	5	4	5	14	29	6	14	9

\* Número de identificação dos Potros estudados.

A Fig. 9 mostra uma visão panorâmica da evolução dos linfócitos T e B ao longo do desenvolvimento dos potros PSI sadios.

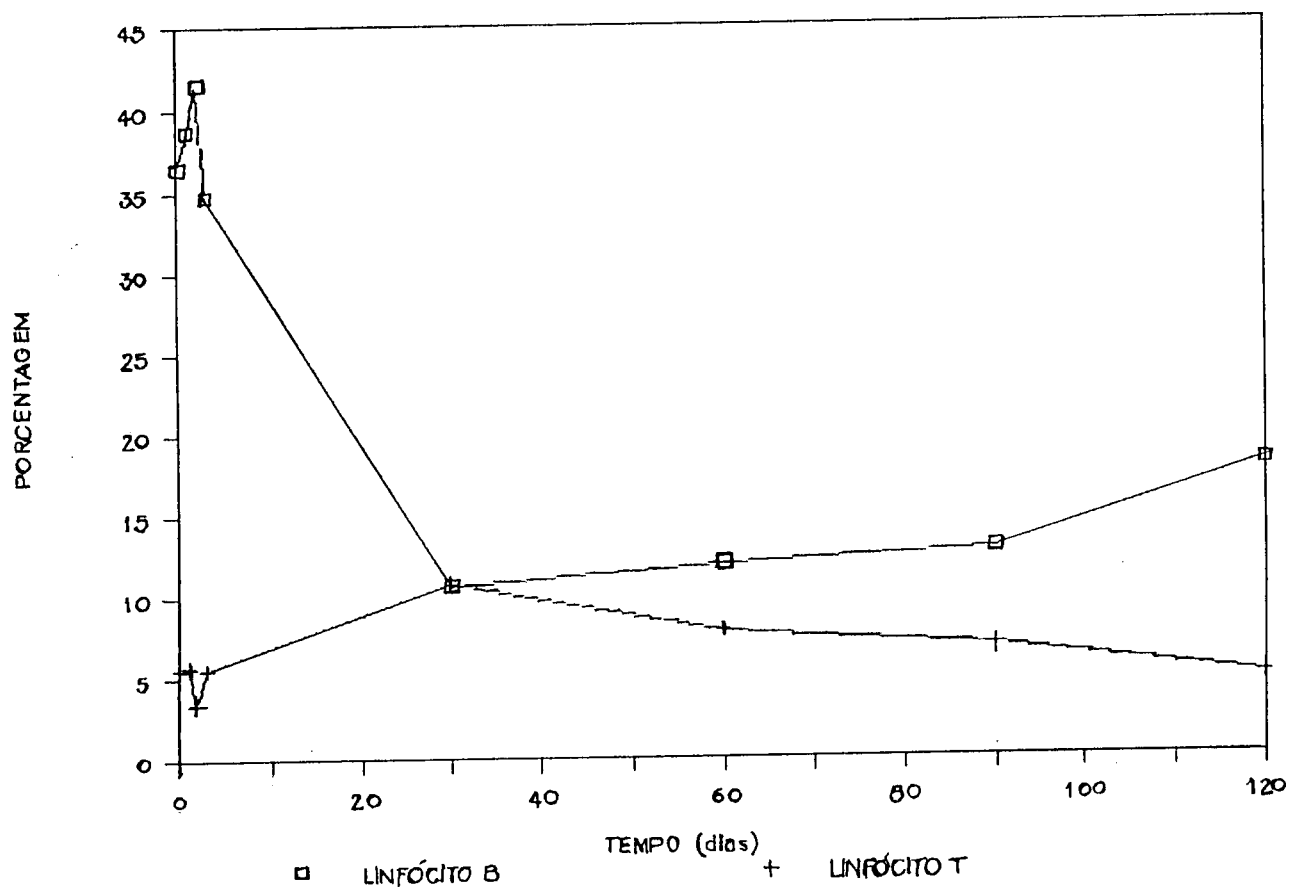


Fig. 9 - Número de linfócitos B e T no sangue periférico ao longo do desenvolvimento somático e cronológico de potros PSI.

## 5. DISCUSSÃO

O conhecimento da imunidade celular e humoral em potros recém-nascidos é problema de elucidação em anos recentes. Até a década de 1970, os estudos imunológicos em equinos eram mais voltados aos aspectos da produção de soros imunes ligados a vários agentes patógenos, particularmente ao vírus da raiva, aos venenos ofídicos, entre outros. Para uma revisão desses aspectos do problema ver HERBERT, 1970.

No que se refere, à imunidade celular, os estudos destes aspectos do comportamento imunológico dos equinos são de data mais recente, considerando que os trabalhos pioneiros sobre a vinculação dos linfócitos do sangue periférico aos processos imunológicos foram considerados pela primeira vez por MILLER (1961). Em potros recém-nascidos, as primeiras observações levadas a efeito sobre linfócitos B e T no sangue periférico foram de FRYMUS; SCHOLLENBERGER (1979). Entretanto, o presente trabalho mostra os primeiros estudos realizados em nosso país, sobre a distribuição de linfócitos T e B em uma população de potros recém-nascidos, acompanhados até 120 dias após o nascimento.

Por outro lado, quanto, à imunidade humoral de potros recém-nascidos, há já algumas referências em trabalhos nacionais, sendo um dos mais recentes o de LUZ et al., (1992). Estes autores verificaram que a fração de gama-globulina aumentou até as 12 horas depois do potro mamar e que a partir das 12 horas até o 176º dia não houve diferença significativa entre as médias, com exceção das dosagens do 28º ao 35º dia quando ocorreu nos potros uma queda significativa nos níveis de imunoglobulinas.

O presente trabalho contudo mostra um cuidadoso estudo sistemático do comportamento imunológico de uma amostragem de potros PSI desde 0 horas de nascimento até 120 dias, quando foi possível acompanhar o comportamento de imunoglobulinas séricas, bem como de linfócitos B e T do sangue periférico, ao longo do desenvolvimento cronológico desses animais.

De conformidade com os dados obtidos, verificam-se vários aspectos do problema que merecem ser discutidos.

Com referência à metodologia, foi introduzida neste trabalho uma modificação da metodologia de BANKS (1981) empregada para o isolamento de linfócitos periféricos para a sua posterior identificação.

No método de BANKS (1981) é utilizada solução de Hanks para as etapas de lavagem por centrifugação e separação sobre ficoll-hypaque, enquanto que na metodologia aqui empregada foi

utilizado apenas meio RPMI em todas as etapas do processo de lavagem por centrifugação e hystopaque para a separação dos linfócitos, com resultados satisfatórios. Desse modo introduziu-se uma simplificação no procedimento de obtenção de linfócitos circulantes do sangue periférico.

Em relação aos procedimentos para análise do perfil proteico dos soros dos potros estudados, é necessário assinalar que as análises eletroforéticas foram sempre procedidas em partidas de soros conservados em congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$  e analisados a cada 4 partidas de obtenção do material. Quanto aos estudos de imunologia celular, todo o material foi analisado tão logo chegava ao laboratório.

Dos 30 animais estudados, a história clínica de cada um (Tabela 1) revelava que 10 destes tiveram desenvolvimento normal, sem qualquer intercorrência de processos patológicos bem como de nenhum tratamento de qualquer natureza. Assim, esse grupo de potros (Tabela 1) foi tomado como padrão para os estudos relativos à imunidade humoral e à celular levados a efeito no presente trabalho. Quanto aos demais animais, um grupo de 5 não pode ser acompanhado por razões diversas e o outro de 15 potros foi sujeito a várias situações patológicas que os obrigaram a tratamento com antibióticos ou ao recebimento de soro hiperimune.

Em razão desse fato, este último grupo de animais foi

incluído no trabalho (no anexo) a fim de completar os dados relativos à amostragem como um todo, mas certamente vão merecer uma análise mais cuidadosa, frente aos dados obtidos com o grupo de animais normais, e que serão objeto de estudo na continuidade do presente trabalho cujo objetivo maior é estabelecer a metodologia bem como a obtenção de dados imunológicos do grupo de animais normais aqui estudados.

Com referência aos dados aqui obtidos, é importante assinalar, de início, que se confirma os dados de EK (1974) da ausência de IgG no soro de potros recém-nascidos, que ainda não receberam colostro (Fig 5; Tabela 3). Verifica-se que o soro desses animais, obtido a 0 hora do seu nascimento, mostrou-se completamente deficiente em IgG e IgA, enquanto que a IgM estava presente na concentração de  $19,00 \pm 4,48$  mg/dl. Esta última constatação referente à IgM, corrobora dados de BUENING et al., (1977) da presença de IgM no soro de potros recém-natos. Para tanto, os dados da Tabela 3 e da Fig. 5 revelam que a partir de 24 horas de vida, a IgG e a IgA mostram-se presentes no soro desses animais.

Entretanto, esse fato se deve à alimentação com colostro, já que esse leite prematuro fornece as referidas imunoglobulinas, contribuindo, assim, para os mecanismos de defesa desses animais.

Por sinal, LAVOIE et al., (1989) mediram a concentração de IgG e IgM em colostro de éguas, constatando valores médios de 199 a 855 g/dl de IgG e 0,7 a 7,1 g/dl de IgM.

A evolução na concentração de IgG no soro do grupo de potros PSI estudados no presente trabalho é mostrada na Fig. 5.

Verifica-se que cada Ig possui uma história diferente. Assim, a IgG, ausente no soro dos potros recém-nascidos apresenta-se já com níveis de  $3678,5 \pm 946,39$  mg/dl às 24 horas de vida do animal, sendo que se mantém aproximadamente nesses níveis nas primeiras 72 horas de vida. Ao primeiro mês há um declínio para  $2017,5 \pm 534,60$  mg/dl, sendo que no segundo, terceiro e quarto mês este valor se estabiliza em torno de 1.406 mg/dl (Tabela 3, Fig. 5). Quanto a IgM, observa-se que a mesma já se faz presente a 0 hora de nascimento dos potros e nas primeiras 24 horas de vida quase triplica seu valor mantendo-se assim até o primeiro mês de vida (44,83 mg/dl). Nos 3 meses subsequentes, a IgM vai aumentando, constatando-se, ao final do período de observação (120 dias) níveis de 93,27 mg/dl. (Tabela 3, Fig. 6)

A IgA, também ausente no soro dos potros recém-nascidos, apresenta-se com níveis de 92,0 mg/dl às 24 horas de vida, sendo esse o maior valor nos 120 dias de observação. Observou-se que aos 30 dias, os níveis dessa Ig foram de

42,4 mg/dl, aumentando gradativamente até o final dos 120 dias (77,07 mg/dl). (Tabela 3, Fig. 7)

É necessário ressaltar, ainda, com respeito às Ig séricas, que nos animais recém-nascidos o valor da relação A/G é o mais alto de todos, no caso presente sendo igual a 2,4. Entretanto, esse valor revela apenas o fato de que há um grande deficit imunoglobulínico no soro desses animais, já que a partir de 24 hs do nascimento, o valor da relação A/G fica em torno de 1,0 considerando que a concentração de albumina no soro desses animais é bastante constante, com valor médio de 2,5 gm/dl.

É necessário agora, fornecer alguns comentários sobre a imunidade celular da amostragem de potros PSI aqui estudados.

FRYMUS; SCHOLLENBERGER (1979) estudaram o comportamento dos linfócitos nos primeiros 5 meses de vida do sangue periférico de potros da raça " WIELKOPOISKA ". Usaram o método descrito por TARGOWSKI (1976), que difere do metodologia utilizada no presente trabalho, pelo modo em que foram isolados os linfócitos e pelo meio que foi usado para lavar as células. Porém, para marcar as imunoglobulinas de superfície dos linfócitos B, usou-se praticamente o mesmo método, e para determinar os linfócitos T, usou-se a mesma técnica. Os resultados desse estudo, porém, diferem dos resultados obtidos no presente trabalho. Em relação aos linfócitos T os valores

encontrados por FRYMUS; SCHOLLENBERGER (1979) variam entre 5,2% a 16,1%, mostrando que estes valores são pouco dependentes da idade do potro. Os valores dos linfócitos B, nos primeiros dias são de 5% e após os 40 dias de vida estabilizam-se entre 12-15% aproximadamente. No presente trabalho tem-se valores variando entre 3,4% à 10,8% para os linfócitos T em todo o período estudado, constatando-se a pouca dependência dos mesmos em relação a idade dos potros, enquanto que os linfócitos B apresentaram valores altos nos primeiros dias de vida, ( aproximadamente 37,95% ), e após o 30º dia os valores estabilizaram-se entre 10,7% a 18,1%.

## 6. CONCLUSOES

A partir da análise dos resultados do presente trabalho e levando-se em consideração o período de vida dos potros e a metodologia descrita, podem ser formuladas as seguintes conclusões:

a) A inexistência da IgG e IgA no soro dos potros logo após o nascimento.

b) A capacidade de síntese de imunoglobulinas pelos potros, no período intra-uterino, pela existência da IgM no soro dos potros ao nascer.

c) A transferência das imunoglobulinas maternas aos potros pela ingestão do colostro e a absorção das imunoglobulinas.

d) A necessidade do acompanhamento da evolução do quadro imunológico nos potros recém-nascidos.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. BALFOUR, W. E.; COMLINE, R. S. Acceleration of absorption of unchanged Globulinim in the newborn calf by factors in colostrum. *J. Physiol*, London, v.160, p. 234-257, 1962.
2. BANKS, K. L.; GREENLEE, A. Isolation and Identification of equine Lymphocytes and monocytes. *Am. J. Vet. Res.*, Schaumburg, v. 42, n 9, p. 1651 - 1654, 1981.
3. BUENING, G. M.; PERRYMAN, L. E.; McGUIRE, T. C. Practical methods of determining serum immunoglobulin M and immunoglobulin G concentracions in foals. *JAVMA*, v. 171, n 5. Sep. 1977.
4. CLAMAN, H. N; CHAPERON, E. A. *Transplantation Reviews* 1, 92. 1966.
5. EK, N. Serum levels of the immunoglobulins IgG and IgG (T) in horses. *Acta vet. scand.* Copenhagen, v. 15, p. 609 - 919, 1974.
6. ELLIOTT, K. K; WAGNER, P. C; Failure of passive anti body transfer in the foal. *Compend. Contin. Educ.*, V. 6, n 12. p. 8702 - 8706, Dec. 1984.
7. FRYMUS T.; SCHOLLENBERGER, A., Circulating B and T lymphocytes in foals during first five months of life. *Zbl. Vet. Med. B*, v. 26, 722 -728, 1979.
8. GERSHON, R. K. *Contemporary Topics in Immunobiology* 3, 1 1974.
9. GLICK, B.; CHANG, T. S.; JAAP, R. G. *Poultry Science* Champaign, v. 35, p. 224, 1956.
10. GOWANS, J. L.; KNIGHT, E. J. *Proceedings of the Royal Society B*, London, v.159. p. 257, 1964.

11. HERBERT, W. J. **Veterinary Immunology**, Oxford: Blackwell, 1970.
12. HOLM, G.; PERLMANN, P. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.125, p. 721, 1967.
13. JEFFCOTT, L. B. The mechanism of transfer of maternal immunity to the foal. In: Bryans, J. T.; Gerber, S.(eds). **Equine infectious diseases**. Basel: Karger, 1973. p. 419-435
14. JEFFCOTT, L. B.; Studies on passive immunity in the foal **J. Comp. Path.**, New York, v. 84., p. 93 - 101, 1974 a.
15. JEFFCOTT, L. B., Some practical aspects of the transfer of passive immunity to newborn foals. **Equine Vet. J.**, Kent v. 6, n 3, p. 109 - 115, 1974 b.
16. JEFFCOTT, L. B., Studies on passive immunity in the foal.2. The absorption of <sup>125</sup>I - labelled PVP ( polyvinyl pyrrolidone ) by the neonatal intestine. **J. comp. Path. Ther.**, New York, v. 84, p. 279 - 289, 1974 c.
17. JEFFCOTT, L. B.; JEFFCOTT, T. J. Studies on passive immunity in the foal. 3. The Characterisation and significance of neonatal proteinuria. **J. comp. Path. Ther.**, New York, v. 84, p. 455 - 465, 1974.
18. JEFFCOTT, L. B.; The Transfer of passive immunity to the foal and its relation to immune status after birth. **J. Reprod. Fert.**, Cambridge, Suppl. 23, p. 727 - 733, 1975.
19. LAVOIE, J. P.; SPENSLEY, M. S.; SMITH, B. P.; MIHALYI, J.; Colostral Volume and immunoglobulin G and M determinations in mares. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 50, n 4, p. 466 - 470, Apr. 1989.
20. LUZ, I. N. C. LACORTE, F. D.; SILVA, J. H. S.; ALDA, J. L.; SILVA, C. A. M. Imunoglobulinas do potro puro sangue de corrida (PSC) do nascimento ao sexto mês de idade. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS., v. 22, n 1, p. 85 - 91, 1992.
21. MACKAY, C. R.; MACKAY, I. R. Immunology and veterinary Science. **Br. vet. J.**, London, v. 145, p. 185 - 190, 1989.

22. McGUIRE, T. C.; CRAWFORD, T. B. Passive immunity in the foal: measurement of immunological classes and specific antibody. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 24, p. 1299 - 1303, 1973.
23. MILLER, J. F. A. P. **Lancet** ii, 748, 1961.
24. MILLER, J. F. A. P. Immunity in the fetus and the new-born. **Br. Med. Bull.**, London, v. 22, p. 21 - 26, 1966.
25. MITCHELL, G. F.; MILLER, J. F. A. P. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 128, p. 821, 1968.
26. MOORE, G. E.; WOODS, L. K. Culture media for human cells - RPMI 1603, RPMI 1634, RPMI 1640 and Gem 1717. **Tissue Culture Association Manual.**, v. 3, p. 503 - 508, 1976.
27. PERRYMAN, D. F. Immunological management of young foals **Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.**, v. 3, n 6, p. 223 - 228, 1981.
28. PIERCE, A. E.; FEINSTEIN, A. Biophysical and immunological studies on bovine immune globulins with evidence for selective transport within the mammary gland from maternal plasma to colostrum. **Immunology**, Oxford, v. 8, p. 106 - 123, 1965.
29. REILLY, W. J.; MAC DOUGALL, D. F. The metabolism of IgG in the newborn foal. **Res. vet. sci.**, London, v. 14, p. 136 - 137, 1973.
30. ROBERTS, M. C. Equine Immunoglobulins and the equine immune system. **Veterinary annual**, Bristol, v. 15, p. 192 - 203, 1975.
31. ROITT, I. M., GREAVES, M. F., TORRIGIANI, G., BROSTOFF, J.; PLAYFAIR, J. H. L. **Lancet** ii, 367, 1969.
32. RUMBAUGH, G. E.; ARDANS, A. A.; GINNO, D.; SMITH, T., Identification and treatment of colostrum-deficient foals. **JAVMA**, Schaumburg, v. 174, p. 273 - 276, Feb. 1979.
33. RUMBAUGH, G. E.; ARDANS, A. A.: Immunologic diseases. In: ROBINSON N. E. (ed). **Current Therapy in Equine Medicine**. Philadelphia: Saunders, 1983, p. 323 - 324.

34. SILVA, C. A. M.; Diagnóstico precoce da imunodeficiência no potro recém-nascido. **Turf e Fomento**, p. 425 - 427, nov./dez. 1983.
35. TARGOWSKI, S. P. Separation of mononuclear leukocytes and polymorphonuclear leukocytes from equine blood. **Can. J. Comp. Med.**, Ottawa, v. 40, p. 285 - 290, 1956.
36. TARR, M. J.; OLSEN, R. G.; KRAKOWKA, G. S.; COCKERELL G.L.; GABEL A. A. Erythrocyte rosette formation of equine peripheral blood lymphocytes. **Am. J. vet. Res.**, Schaumburg, v. 38, p. 1775 - 1779, 1977.
37. TIZARD, I. R. Immunology of the fetus and newborn foals. In: TIZARD, I. R. **Veterinary immunology**. Philadelphia: Saunders, 1977. Cap. 10, p. 168 - 183.
38. VAUTHEROT, J. F.; SALMON, H. Adsorption élektive des érythrocytes de cobaye sur différentes sous - populations leucocytaires du cheval. **Bull. Acad. Vét. de France**, Paris, v. 50, p. 293 - 302, 1977.
39. VILELA, G. G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. **Técnicas e Experimentos de Bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1973, 399 p.
40. WEISS, D. J.; KRAEMER, R.; SCHMIT, K. Isolation of granulocytes and mononuclear cells from the blood of dogs, cats, horses and cattle. **Clinical Pathology**, v. 18, n 2, p. 33 - 36, 1989.
41. WHITE, S. L.; PUGH, D. G.; Passive immunoglobulin protection for the colostrum-deprived foal. **Equine Practice**, Santa Barbara, v. 10, n 9, p. 24 - 26, Oct. 1988.

**A N E X O**

A seguir te<sub>m</sub>-se os resultados das análises laboratoriais dos potros com diferentes ocorrências clínicas, citados na Tabela 1. O número de identificação de cada potro encontra-se no canto superior esquerdo. Sendo que as primeiras 20 tabelas são dos resultados da eletroforese de proteínas e as 20 seguintes são dos resultados da imunodifusão radial simples.

5	Proteina Total	Albumina g/%	Alfa g/%	Beta g/%	Gamma g/%
0 5	0, 0	0, 71	0, 00	0, 00	-
24 50	0, 4	0, 00	0, 40	0, 70	1, 40
40 50	0, 0	0, 00	0, 04	0, 00	1, 10
72 50	0, 0	0, 70	0, 00	0, 70	1, 20
1 3000	0, 0	0, 04	0, 00	0, 00	0, 70
2 300000	0, 0	0, 00	0, 00	0, 70	1, 00
0 300000	0, 4	0, 00	0, 47	0, 77	0, 00
4 300000	0, 0	0, 00	0, 00	0, 00	0, 70

6	Proteína total	Albumina g/%	Alfa g/%	Beta g/%	Gamma g/%
0 h	4,1	2,07	0,00	0,70	-
24 h	2,9	2,29	0,00	0,01	0,01
48 h	4,0	2,26	0,40	0,00	0,00
72 h	4,2	2,01	0,41	0,00	0,00
1 mes	4,7	2,14	0,07	0,07	0,00
2 meses	5,0	2,50	0,04	1,00	0,46
3 meses	4,0	2,75	0,01	0,00	0,00
4 meses	4,0	2,47	0,00	0,00	1,01

№	Proteinase total	Albumina g/%	Alfa g/%	Beta g/%	Gamma g/%
0 5	0, 5	0, 56	0, 52	0, 42	-
24 50	4, 0	0, 26	0, 44	0, 55	0, 75
40 50	4, 0	0, 40	0, 44	0, 00	0, 77
72 50	4, 1	0, 05	0, 42	0, 00	0, 70
1 3000	0, 1	0, 57	0, 05	1, 02	0, 56
2 30000	0, 2	0, 00	0, 00	1, 00	1, 17
3 30000	0, 0	0, 00	0, 02	1, 17	1, 12
4 30000	0, 0	0, 70	0, 45	1, 16	0, 96

10	Proteina Total	Albumina g/%	Alfa g/%	Beta g/%	Gamma g/%
0 h	4,4	2,66	0,90	0,76	-
24 h	4,2	2,56	0,52	0,64	0,57
48 h	4,4	2,56	0,67	0,60	0,57
72 h	4,5	2,40	0,76	0,60	0,45
1 mes	-	-	-	-	-
2 meses	-	-	-	-	-
3 meses	-	-	-	-	-
4 meses	-	-	-	-	-

13	Protein total	Albumin g/%	Glob g/%	Urea g/%	Other g/%
0.5	4.1	0.00	0.41	0.00	-
2.4 5.0	5.0	2.04	0.00	0.96	1.00
4.0 5.0	5.0	2.04	0.00	1.00	1.11
7.2 5.0	7.1	0.40	0.00	1.00	2.04
1 mm	-	-	-	-	-
2 mm	-	-	-	-	-
3 mm	-	-	-	-	-
4 mm	-	-	-	-	-

15	Protein Total	Albumin g/L	Bilirubin g/L	Urea g/L	Glucose g/L
0.7	0.4	2.16	0.70	0.04	-
24.5	0.0	2.22	0.02	0.44	0.41
40.5	0.0	2.00	0.07	0.02	0.41
70.5	0.0	2.27	0.00	0.01	0.02
1	1	1	1	1	1
30000	1	1	1	1	1
30000	1	1	1	1	1
30000	1	1	1	1	1

16	Protein Total	Albumin g/L	Bilirubin g/L	Urea g/L	Creatinine g/L
0.5	4.1	2.74	0.54	0.02	-
0.45	5.0	2.92	0.57	0.79	1.61
0.4	5.0	2.91	0.59	0.02	1.29
0.35	5.4	2.91	0.59	0.07	1.24
0.3	5.0	2.95	0.51	1.00	1.41
0.25	5.0	2.72	0.51	0.02	1.14
0.2	5.5	3.02	0.52	0.72	1.12
0.15	5.0	2.94	0.74	0.02	0.94

17	Protein Total	Albumin g/%	Alb g/%	Glob g/%	Glob g/%
0.5	4.0	2.00	0.57	0.54	-
0.45	5.0	2.70	0.61	0.55	1.44
0.05	5.0	2.40	0.50	0.51	1.00
0.25	5.0	2.25	0.50	1.05	1.40
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-

Age	Proteins Total	Albumins g/L	Bilirubin g/L	Urea g/L	Creatinine g/L
0-1	0.5	0.5	0.4	0.02	0.16
2-4	0.9	0.4	0.09	0.02	1.50
4-10	0.1	0.4	0.09	0.01	1.47
12-18	4.0	1.0	0.04	0.44	1.50
1 20-30	1	1	1	1	1
2 30-40	1	1	1	1	1
3 40-50	1	1	1	1	1
4 50-60	1	1	1	1	1

20	Protein Total	Albumin g/L	Bilirubin g/L	Urea g/L	Creatinine g/L
0.5	4.1	2.74	0.04	0.72	-
0.45	4.7	2.74	0.04	0.02	0.00
0.05	4.7	2.00	0.00	0.70	0.00
1.05	4.0	2.00	0.07	0.04	0.70
1.00	0.1	0.04	0.04	1.01	0.71
0.00	0.7	2.71	0.01	1.00	0.00
0.00	0.4	0.00	0.44	1.15	0.01
0.00	0.0	0.00	0.00	1.10	0.00

No	Proteina total	Albumina g/%	Alfa g/%	Beta g/%	Gamma g/%
05	0,0	0,71	0,00	0,01	-
2478	4,0	0,07	0,06	0,04	0,70
4078	4,4	0,40	0,01	0,07	0,74
7278	0,0	0,00	0,70	0,00	0,00
1300	4,7	0,00	0,40	0,70	0,00
20000	0,0	0,00	0,77	1,10	0,00
030000	0,0	0,04	0,46	0,00	0,01
430000	0,0	0,00	0,00	0,00	1,10

22	Proteina total	Albumina g/%	Alfa g/%	Beta g/%	Gama g/%
0 h	0,7	0,17	0,55	0,60	-
24 h	0,7	1,50	0,66	0,71	0,75
48 h	0,7	0,09	0,57	0,60	0,44
72 h	0,6	1,00	0,74	0,70	0,00
1 3000	4,0	0,90	0,50	1,05	0,05
2 30000	4,9	0,00	0,00	1,20	0,41
3 30000	0,7	0,00	0,00	1,10	0,70
4 30000	0,1	0,07	0,00	0,00	0,70

No	Protein Total	Albumin g/%	Glb g/%	Bun g/%	Gama g/%
05	4.4	2.00	0.04	0.07	-
24 Jan	0.5	2.04	0.56	0.91	2.00
20 Jan	0.2	2.02	0.05	0.00	2.04
22 Jan	0.4	2.45	1.04	0.94	1.97
1 2000	5.4	2.10	1.06	1.22	1.02
2 20000	5.4	2.50	0.05	1.41	0.01
3 20000	-	-	-	-	-
4 20000	-	-	-	-	-

24	Proteina Total	Albumina g/%	Alfa g/%	Beta g/%	Gamma g/%
0 5	0, 5	0, 20	0, 06	0, 05	-
24 5m	0, 1	0, 20	0, 00	0, 05	1, 00
40 5m	4, 0	0, 00	0, 57	0, 00	1, 12
72 5m	4, 0	0, 40	0, 00	0, 00	0, 07
1 3000	0, 7	0, 04	0, 00	1, 00	0, 07
2 300000	0, 0	0, 00	0, 00	1, 04	1, 02
0 300000	0, 0	0, 24	1, 10	1, 10	0, 70
4 300000	0, 0	0, 41	1, 00	0, 04	1, 05

25	Proteine total	Albumina g/%	Alfa g/%	Beta g/%	Gamma g/%
05	4,0	0,05	0,70	0,00	-
24 50	0,0	0,00	0,00	1,00	0,07
40 50	0,0	0,10	0,07	1,21	1,00
72 50	0,0	0,00	0,00	1,00	0,00
1 3000	4,7	0,21	1,00	0,54	0,07
2 300000	0,0	0,07	0,44	1,00	1,10
0 300000	0,0	0,00	0,00	1,10	0,00
4 300000	0,1	0,70	0,70	0,01	0,70

26	Proteina Total	Albumina g/%	Alfa g/%	Beta g/%	Gamma g/%
0 5	4, 0	2, 00	0, 44	0, 66	-
24 50	5, 0	2, 00	0, 61	0, 76	1, 71
40 50	5, 0	2, 65	0, 67	0, 76	1, 02
72 50	5, 0	2, 57	0, 50	0, 06	1, 04
1 30 00	5, 4	2, 00	0, 01	0, 04	0, 07
2 30 00 00	5, 0	2, 24	1, 16	0, 00	0, 72
3 30 00 00	5, 7	2, 07	1, 10	0, 97	1, 50
4 30 00 00	6, 0	2, 01	1, 26	1, 50	0, 00

27	Proteina total	Albumina g/%	Alfa g/%	Beta g/%	Gamma g/%
05	4,6	0,07	0,05	0,00	-
24 5m	5,7	0,00	0,00	1,10	1,21
40 5m	5,4	0,71	0,40	0,04	1,27
72 5m	5,4	0,70	0,50	0,04	1,27
1 3000	0,0	0,07	0,07	0,77	1,10
2 300000	5,0	0,06	0,07	0,76	1,11
3 300000	0,2	0,24	1,00	0,67	1,20
4 300000	0,2	0,20	0,70	0,06	1,00

No	Protein Total	Albumin g/L	Alb g/L	Beta g/L	Gamma g/L
07	4.1	0.00	0.70	0.54	-
0470	5.0	0.00	0.50	0.95	1.57
4070	5.5	0.00	0.50	1.00	1.00
7070	5.0	0.04	0.50	0.00	1.40
1000	5.4	0.04	0.70	1.00	1.00
2000	4.0	0.00	0.45	0.00	0.74
3000	4.0	0.04	0.50	0.00	1.00
4000	5.0	0.40	0.00	1.20	1.10

29	Proteina Total	Albumina g/%	Alfa g/%	Beta g/%	Gamma g/%
0 h	4,1	2,00	0,55	0,70	-
24 h	5,0	2,40	0,60	1,04	1,70
40 h	5,7	2,24	0,74	1,04	1,50
72 h	5,7	2,20	0,60	1,12	1,61
1 mes	5,5	2,20	0,97	1,22	1,00
2 meses	5,0	2,57	0,77	1,10	0,86
3 meses	5,2	2,70	0,60	1,05	0,76
4 meses	5,0	2,55	0,67	0,90	1,10

30	Proteina total	Albumina g/%	Alfa g/%	Beta g/%	Gama g/%
0 5	0,0	1,56	0,94	1,10	1
24 50	0,1	2,00	0,60	0,90	1,50
40 50	4,0	1,00	0,64	1,00	1,70
70 50	4,7	1,41	0,62	1,11	1,56
1 30 00	0,0	0,00	0,60	0,06	0,00
2 30 00 00	0,0	0,00	0,12	0,12	1,00
3 30 00 00	0,4	0,70	0,60	1,04	0,90
4 30 00 00	0,4	0,00	0,07	1,02	0,00

5	I <sub>gG</sub>	I <sub>gM</sub>	I <sub>gA</sub>
0 h		21,5	
24 hs	3750	40,5	39,0
48 hs	4000	35,5	32,0
72 hs	3625	35,5	36,0
1 mes	1675	57,0	36,0
2 meses	2050	66,0	42,0
3 meses	1750	38,0	69,0
4 meses	1500	69,5	69,0

6	I <sub>gG</sub>	I <sub>gM</sub>	I <sub>gA</sub>
0 h		24,0	
24 hs	625	33,0	39,0
48 hs	1175	35,5	29,0
72 hs	1025	40,5	29,0
1 mes	1400	63,0	42,0
2 meses	1575	100,5	55,0
3 meses	1400	132,5	59,0
4 meses	2125	229,0	55,0

9	I <sub>gG</sub>	I <sub>gM</sub>	I <sub>gA</sub>
0 h		25,5	
24 hs	2025	33,0	39,0
48 hs	1975	23,0	32,0
72 hs	2425	25,5	25,0
1 mes	2225	60,0	42,0
2 meses	2125	86,0	59,0
3 meses	1675	93,5	82,0
4 meses	3520	83,0	102,0

10	I <sub>gG</sub>	I <sub>gM</sub>	I <sub>gA</sub>
0 h		15,5	
24 hs	1250	30,5	32,0
48 hs	1500	35,5	32,0
72 hs	1175	25,5	25,0
1 mes			
2 meses			
3 meses			
4 meses			

13	I <sub>GG</sub>	I <sub>GM</sub>	I <sub>GA</sub>
0 h		17,5	
24 hs	5355	40,5	51,0
48 hs	5355	30,5	32,0
72 hs	4775	30,0	36,0
1 mes	-	-	-
2 meses	-	-	-
3 meses	-	-	-
4 meses	-	-	-

15	I <sub>GG</sub>	I <sub>GM</sub>	I <sub>GA</sub>
0 h		10,5	
24 hs	1500	25,5	29,0
48 hs	825	33,0	22,0
72 hs	1750	21,5	19,0
1 mes	-	-	-
2 meses	-	-	-
3 meses	-	-	-
4 meses	-	-	-

16	I <sub>GG</sub>	I <sub>GM</sub>	I <sub>GA</sub>
0 h		0,0	
24 hs	4375	42,5	90,0
48 hs	4525	40,5	92,0
72 hs	3755	40,5	69,0
1 mes	2125	54,0	36,0
2 meses	2400	40,5	39,0
3 meses	1425	76,0	42,0
4 meses	1350	104,5	42,0

17	I <sub>GG</sub>	I <sub>GM</sub>	I <sub>GA</sub>
0 h		21,5	
24 hs	3500	66,5	73,0
48 hs	4375	51,0	73,0
72 hs	4525	72,0	64,0
1 mes	-	-	-
2 meses	-	-	-
3 meses	-	-	-
4 meses	-	-	-

18	I g G	I g M	I g A
0 h		15,5	
24 hs	4125	35,5	32,0
48 hs	3625	33,0	25,0
72 hs	2810	25,5	22,0
1 mes	2450	33,0	36,0
2 meses	1350	42,5	51,0
3 meses	1425	51,0	55,0
4 meses	1575	69,5	73,0

20	I g G	I g M	I g A
0 h		17,5	
24 hs	2725	28,0	55,0
48 hs	1950	42,5	64,0
72 hs	2625	45,5	69,0
1 mes	1350	33,0	32,0
2 meses	2325	46,5	87,0
3 meses	2725	57,0	92,0
4 meses	2225	57,0	47,0

21	I g G	I g M	I g A
0 h		24,0	
24 hs	2625	35,5	82,0
48 hs	2635	28,0	55,0
72 hs	2400	24,0	39,0
1 mes	1850	42,5	55,0
2 meses	1675	35,5	59,0
3 meses	1125	46,5	73,0
4 meses	1425	54,0	69,0

22	I g G	I g M	I g A
0 h		38,5	
24 hs	1250	46,5	32,0
48 hs	1250	46,5	32,0
72 hs	1250	38,0	25,0
1 mes	975	54,0	64,0
2 meses	825	57,0	69,0
3 meses	2425	79,0	73,0
4 meses	1850	97,0	87,0

23	I g G	I g M	I g A
0 h		15,5	
24 hs	6250	48,5	108,0
48 hs	4935	69,5	98,0
72 hs	6725	57,0	98,0
1 mes	2260	63,0	47,0
2 meses	2425	23,5	98,0
3 meses	-	-	-
4 meses	-	-	-

24	I g G	I g M	I g A
0 h		24,0	
24 hs	3500	57,0	51,0
48 hs	4125	57,0	39,0
72 hs	3275	35,5	25,0
1 mes	2325	51,0	32,0
2 meses	1675	57,0	55,0
3 meses	2325	97,0	82,0
4 meses	2450	112,0	77,0

25	I g G	I g M	I g A
0 h		35,5	
24 hs	4935	51,0	39,0
48 hs	5050	45,5	32,0
72 hs	4775	42,5	29,0
1 mes	1050	72,5	64,0
2 meses	3050	40,5	64,0
3 meses	2525	40,5	64,0
4 meses	1050	45,5	64,0

26	I g G	I g M	I g A
0 h		25,5	
24 hs	4375	35,5	55,0
48 hs	4525	35,5	36,0
72 hs	6575	56,0	36,0
1 mes	3275	28,0	39,0
2 meses	1350	45,5	42,0
3 meses	1750	40,5	77,0
4 meses	1675	72,5	29,0

27	I g G	I g M	I g A
0 h		24,0	
24 hs	4650	51,0	59,0
48 hs	6400	60,0	77,0
72 hs	3500	48,5	64,0
1 mes	1850	57,0	47,0
2 meses	1575	93,5	73,0
3 meses	1750	63,0	92,0
4 meses	2025	76,0	98,0

28	I g G	I g M	I g A
0 h		21,5	
24 hs	6100	69,5	77,0
48 hs	6250	57,0	51,0
72 hs	6575	48,5	55,0
1 mes	3875	48,5	39,0
2 meses	1850	45,5	51,0
3 meses	1425	69,5	59,0
4 meses	1500	82,5	32,0

29	I g G	I g M	I g A
0 h		48,5	
24 hs	3150	120,0	103,0
48 hs	3500	116,0	124,0
72 hs	3875	116,0	100,0
1 mes	2625	51,0	42,0
2 meses	1850	35,5	51,0
3 meses	1575	76,0	59,0
4 meses	1425	82,5	69,0

30	I g G	I g M	I g A
0 h		19,5	
24 hs	4275	42,5	77,0
48 hs	3625	48,5	69,0
72 hs	2525	33,0	47,0
1 mes	2225	51,0	42,0
2 meses	3175	63,0	64,0
3 meses	2425	28,0	77,0
4 meses	2325	57,0	82,0