

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

MIRLEIDE DE ARAÚJO CÁO

**AUTOHEMOTERAPIA EM RATOS (*Rattus norvegicus*):
EFEITO SOBRE O NÍVEL DO FATOR DE NECROSE
TUMORAL (TNF- α) E LEUCÓCITOS**

ALEGRE-ES

2013

MIRLEIDE DE ARAÚJO CÁO

**AUTOHEMOTERAPIA EM RATOS (*Rattus norvegicus*):
EFEITO SOBRE O NÍVEL DO FATOR DE NECROSE
TUMORAL (TNF- α) E LEUCÓCITOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de **Mestre em Ciências Veterinárias**, linha de pesquisa em Diagnóstico e terapêutica das enfermidades clínico-cirúrgicas.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lenir Cardoso Porfírio.

**ALEGRE-ES
2013**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

C235a Cáo, Mirleide de Araújo, 1985-
Autohemoterapia em ratos (*Rattus norvegicus*): efeito sobre o nível do fator de necrose tumoral (TNF- α) e leucócitos / Mirleide de Araújo Cáo. – 2013.
46 f. : il.

Orientadora: Lenir Cardoso Porfírio.
Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias.

1. Animais. 2. Sistema imunológico. 3. Medicina veterinária. I. Porfírio, Lenir Cardoso. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 619

MIRLEIDE DE ARAÚJO CÁO

AUTOHEMOTERAPIA EM RATOS (*Rattus norvegicus*): EFEITO SOBRE O NÍVEL DO FATOR DE NECROSE TUMORAL (TNF- α) E LEUCÓCITOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-cirúrgicas.

Aprovada em: ____/____/____.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Lenir Cardoso Porfírio
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof. Dr. Marcos Santos Zanini
Universidade Federal do Espírito Santo

Profa. Dra. Mariana Drummond Costa Ignacchiti
Universidade Federal do Espírito Santo

A Deus, mantenedor e provedor de todas as coisas, as pessoas que sempre estiveram no apoio dessa jornada, para que até aqui fosse concluída, com o apoio e o credenciamento a mim dado: Em especial aos meus Pais Delvanir de Araújo Cáo e Vicente Cáo.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela oportunidade concedida e pela ajuda nos momentos mais difíceis porque só por portas abertas por Ele, foi possível a realização deste trabalho.

À Professora Dra. Lenir Cardoso Porfírio e ao Msc. Leonardo Oliveira Trivilin, pelo voto de confiança, dedicação e ensinamentos de seriedade à pesquisa. Muito obrigado!

Dedico também a meus mais que queridos professores, que me apoiaram e deram todo suporte científico e técnico, para que fosse então concluída: À Dra. Loiusiane de Carvalho Nunes, Dr. Marcos Santos Zanini e a Dra. Mariana Drummond Costa Ignacchiti.

Ao Professor Dr. Rodrigo Rodrigues pelo apoio e seção do laboratório, sem o qual o trabalho não poderia ser realizado, e a toda equipe do laboratório de Doenças Infecciosas pela oportunidade de convivência.

Aos Mscs. Lorenzo Lyrio Stringari e Flávia Dias Coelho da Silva do Departamento de Doenças Infecciosas da UFES e ao Jorge da Siva, técnico do laboratório de Patologia Clínica do HOVET e ao M.V. Paulo Sérgio Cruz de Andrade Junior, pela colaboração nos experimentos e pela grande ajuda.

Ao meu noivo Cleber Tófoli Viera, pelos longos períodos de estrada, execução e incentivo, em todas as partes deste trabalho.

À Tatiane Fiorotti, Lohaine Tosi Stocco, Giuliana Porfírio Passos, Fabiana Bravo, Luciana Medeiros, Sabrina de S. Miranda, Henrique Venial Jordem.

Muito Obrigada por tudo!!

O Temor do Senhor é o princípio da sabedoria...
Provérbios 1:7a, Bíblia Sagrada.

RESUMO

Araújo Cáo, Mirleide. **Autohemoterapia em ratos (*rattus norvegicus*): efeito sobre o nível do nível do fator de necrose tumoral (tnf- α) e leucócitos**. 2013. 46p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2013.

A auto-hemoterapia (AH), utilizada a mais de 30 anos é um procedimento antigo que nos últimos anos, está entre aos estudos que envolvem a medicina humana e veterinária. Ela tem a proposta de estimular o aumento dos macrófagos de modo a combater bactérias, vírus e células cancerosas. Pelo estímulo do sistema retículoendotelial, a medula óssea produz mais monócitos que vão colonizar os tecidos orgânicos e recebem então a denominação de macrófago. Por esta razão foi testado qualitativamente o Tnf- α para avaliar o sistema de defesa em ratos que poderia ser empregado, como uma alternativa para contribuir com a imunogenicidade e níveis de proteção em animais de companhia. O TNF- α quando liberado em baixas concentrações age nas células endoteliais promovendo vasodilatação, estimulando a secretarem um grupo de citocinas que tem ação quimiotática em relação aos leucócitos, promovendo, um processo inflamatório local que possibilita o combate a quadros infecciosos. Foram serão utilizados 16 ratos hípidos, da linhagem Wistar, de peso médio e idades iguais. Os animais foram divididos em dois grupos experimentais, G1 o grupo controle e G2 o grupo AH. Foram retirados sangue para realização do Leucograma, teste de Elisa e da Autohemoterapia, antes da aplicação (M1), 8 horas após aplicação (M2) e 7 dias após aplicação (M3). Para qualificação de TNF- α foi utilizado o kit de ELISA, e a intensidade da cor foi medido a 450 nm. Ao se avaliar nesse trabalho os valores de Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) presente, bem como o leucograma de ratos submetidos a dois procedimentos de AH, os resultados revelaram que há um aumento na produção de TNF- α , após a aplicação da AH e que o número de linfócitos e monócitos também aumenta nos momento M2, com uma redução na produção de células em M3. Com base no conjunto de dados obtidos neste trabalho, houve alteração nos níveis de TNF- α , com aumento 8 horas e 7 dias após o procedimento de AH. Em relação ao leucograma há aumento do número de células, como os linfócitos e monócitos 8 horas e 7 dias após a aplicação da AH.

Palavras-chave: Animais; Citocina; Sistema Imune.

ABSTRAT

Araújo Cáo, Mirleide. **Assessment of levels of tumor necrosis factor (TNF- α) and leucocyte count in rats (*Rattus norvegicus*) after procedure autohemotherapy.** In 2013. 42p. Dissertation (Master in Veterinary Science) - Center for Agricultural Sciences, Federal University of Espírito Santo, Alegre, ES, 2013.

The autohemotherapy (AH), used for more than 30 years is an old procedure that in recent years, are among the studies that involve human and veterinary medicine. The AH stimulating the proposal of increasing macrophages in order to combat bacteria, viruses and cancer cells. For stimulation of the reticuloendothelial system, bone marrow produces more monocytes that will colonize the tissues and given the name macrophage. For this reason, the Tnf-alpha was quantumly tested to evaluate the defense system in rats that could be used or not, as an alternative to contribute to immunogenicity and protection levels in pets. Among the important cintocinas is the tumoral necrosis factor-alpha (TNF- α), which is secreted by macrophages, T cells, B cells and fibroblasts, and can act on almost all nucleated cells. It is also a mediator of many inflammatory and immune functions, which regulates the growth of many cell types. For the evaluation were used 16 healthy rats, Wistar, with the same weights and ages. The animals were divided into two groups with eight animals each, being the G1 the control group (physiological saline) and G2 the AH group. All animals had their blood collected for laboratory analysis before any procedure. Blood was collected for laboratory analysis to determine the levels of TNF- α and CBC. For quantitation of TNF- α was used ELISA kit (-linked immunosorbent assay) b100784 Rat TNF- α and the color intensity was measured at 450 nm. When evaluating this work the values of Tumor Necrosis Factor (TNF- α) present, as well as WBC of rats submitted to two AH procedures. The results show that there is increased TNF- α after application of HA and the number of lymphocytes and monocytes in the moment M2 also increases with a reduction in the production of cell M3. Based on the data obtained in this work, there were changes in the levels of TNF- α , the increase is evident 8 hours 7 days after the procedure AH. In the WBC is increased number of cells, such as lymphocytes and monocytes 8 hours 7 days after application of HA.

Keywords: Cytokine; Immune System; Pets.

LISTA DE FIGURAS

Figura	Descrição	Página
Figura 1	Valores do número de monócitos no G2 grupo AH, onde há diferença significativa entre M1 e M3 *(p=0,024). O que não ocorre no G1 grupo controle. *Valores a um nível de 5% de significância pós-teste de Siegel e Castellan.....	43
Figura 2	Contagem de Linfócitos no G2 grupo AH, há diferença significativa entre M1 e M2 *(p=0,018). O que não ocorre no G1 grupo controle.*Valores a um nível de 5% de significância pós-teste de Siegel e Castellan.....	44

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Auto-hemoterapia.....	14
2.1.1 Técnicas utilizadas.....	15
2.1.2 Substâncias associadas à técnica de auto-hemoterapia.....	16
2.1.3 Autohemoterapia e sua relação com o sistema imunológico	167
2.2 Auto-hemoterapia em medicina veterinária	18
2.2.1 Hemoparasitoses	18
2.2.2. Papilomatose cutânea.....	19
2.2.3 Outras lesões em pele e anexos	19
3. Fator de necrose tumoral	180
4. REFERÊNCIAS.....	21
CAPÍTULO 1.....	25
RESUMO.....	26
ABSTRACT	27
INTRODUÇÃO.....	27
MATERIAL E MÉTODOS	28
Delineamento experimental.....	29
RESULTADOS	31
DISCUSSÃO	31
CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS	35
ANEXO 1 - Figuras.....	38
ANEXO 2 - Comitê de ética e Biossegurança.....	39

1 INTRODUÇÃO

A auto-hemoterapia foi introduzida como alternativa terapêutica por Ravaut em 1910, apud Leite, (2008), entre os anos de 1898 e 1913. Essa terapia foi utilizada especificamente para evitar infecções respiratórias e conforme Mettenleiter, (1936) com o passar dos anos, a auto-hemoterapia foi inserida no tratamento de diversas doenças como pneumonia, bronquites, furunculose, urticária e eczemas e mostrou-se eficiente no tratamento coadjuvante de feridas e lesões de pele.

O sangue extraído por punção venosa é rico em CO₂ e quando em contato com um corpo estranho (no caso a seringa), é suficiente para provocar modificações físico-químicas na estrutura da hemácia e, por isso, quando injetado no organismo, atua como uma proteína estranha. Conhece-se o efeito estimulante das proteínas parentais sobre o sistema simpático e o parassimpático, e sabe-se que ocorrem reações vasomotoras e teciduais em todo o organismo. Assim como a ação do sistema retículo endotelial estimulado pela auto-hemoterapia (TEIXEIRA, 1940)

Os macrófagos são células secretoras multifuncionais do sistema imune que participam da regulação da resposta imunológica, pela liberação de mediadores químicos, frente a um estímulo apropriado (ZHAO, 2001). A ativação endotelial e macrofágica provoca a liberação de citocinas, ou seja, das interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8) e do fator de necrose tumoral (TNF), amplificando, dessa forma, a resposta inflamatória (BASILE FILHO, 2001).

Para OLLIER (2004), complexas redes de citocinas interagem de forma dinâmica para regular homeostaticamente as respostas imunes e outras vias biológicas. Por conseguinte, não é surpreendente que a variação nos níveis de citocinas tenha sido correlacionada à susceptibilidade nas doenças e processos inflamatórios.

As citocinas são proteínas ou glicoproteínas secretadas que têm importante papel na comunicação celular e são elementos chave no controle da resposta imune, pois regulam a magnitude e natureza destas respostas, influenciando no crescimento e diferenciação de linfócitos. Elas exercem seus efeitos pela interação com receptores de membrana celular, caracterizados como

glicoproteínas transmembrânicas. Estes têm a capacidade de se ligarem às citocinas e de transferir a informação ao citoplasma da célula via componentes intracelulares. Como os receptores de citocinas têm distribuição ampla em diversos tipos celulares, uma citocina pode atuar em todos os tipos de células que possuem receptores para a mesma, sendo, portanto, chamadas de mediadores pleiotrópicos (VIZONI et al. 2008).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Auto-hemoterapia

A auto-hemoterapia consiste na retirada de sangue por punção venosa e sua imediata administração por via intramuscular ou subcutânea, em que o doador e o receptor são o mesmo indivíduo (METTENLEITER, 1936).

Segundo Satin e Brito (2004), os produtos da degradação eritrocitária são conhecidos por estimular a eritropoiese e ativar o sistema imune normal, permitindo a manutenção da homeostasia. Em análise de dados experimentais e clínicos do efeito estimulante da auto-hemoterapia em humanos e animais, bem como experimentos *in vitro* com linfócitos foi observado que os produtos da degradação eritrocitária exercem um efeito mais poderoso que eritrócitos intactos.

(...) As alterações físico-químicas, na totalidade do sangue e do soro, são tão delicadas e ocorrem rapidamente, que nenhuma comparação pode ser feita entre o sangue retirado de uma veia e reinjetado intramuscularmente, e o sangue acumulado em uma ferida para ser absorvida, estes dois processos são inteiramente diferentes (METTENLEITER, 1936. Pg.333).

Klemparskaya et al. (1986), ressaltam que em casos de doenças inflamatórias crônicas, pode levar a uma reativação orgânica. Silva (2009) comprovou em estudo a ativação do sistema imune por meio da aplicação de sangue autólogo intramuscular.

Estudos realizados em humanos por David (1924) observou somente a ocorrência de reações adversas locais imediatamente à injeção, em que o doente sente uma sensação de peso, de dificuldade nos movimentos no nível do glúteo que desaparece e rapidamente o paciente volta a suas atividades normalmente, e no caso da injeção no tecido subcutâneo abdominal ou tecido circunvizinho do local da picada, forma-se equimose mais ou menos duradoura que depende da quantidade de sangue injetado. Afirma que em todos os doentes envolvidos em seus estudos e que receberam as injeções por via intramuscular não foi observado qualquer alteração.

2.1.2 Técnicas utilizadas

Segundo Mettenleiter (1936), existem cinco diferentes métodos de aplicação da auto-hemoterapia: a) pela injeção intramuscular de sangue desfibrinado (20 mL de sangue são desfibrinados e injetados imediatamente); b) por uma injeção intramuscular de 16 mL de sangue fresco com 4mL de água destilada; c) pela injeção intramuscular de sangue fresco inalterado; d) pela injeção intravenosa de sangue desfibrinado ou sangue mantido no gelo por algumas horas ou mesmo dias; e) pela injeção intradérmica em pequena quantidade de 1 ou 2 mL de sangue fresco. Porém a injeção intravenosa pode causar sérios efeitos colaterais, preconizando então, a intramuscular, que mesmo em grandes quantidades de sangue injetado por essa via (até 40 mL) não se observa complicações, nem desconforto ao paciente.

Porém, é importante frisar que a auto-hemoterapia oferece os mesmos riscos de qualquer outro procedimento em que o cliente se submete a punções venosas e injeções intramusculares, quais sejam: lesões de nervos e vasos, necrose tecidual, hematomas e flebites. Acredita-se que estes riscos possam ser minimizados ou anulados se o procedimento for realizado por pessoa qualificada (GEOVANINI e NORBERTO, 2009).

Grande parte dos médicos que utilizavam a técnica de auto-hemoterapia preferiam a injeção intramuscular no músculo glúteo, outros no tecido subcutâneo da parede abdominal, ou ainda, injetavam sem mudar de agulha no tecido celular circunvizinho do local da colheita, sob o pretexto de evitar a coagulação do sangue na seringa (DAVID, 1924).

Em estudo realizado por Giovanni e Norberto (2009) em humanos, o sangue era colhido de veias periféricas escolhidas com critério, os locais da punção nos membros eram alternados semanalmente entre os superiores direito e esquerdo. As injeções do sangue colhido eram aplicadas nos músculos ventroglúteo, glúteos máximo e mínimo direito e esquerdo, também se alternando as regiões de aplicação e aplicando-se 5mL em cada uma de quatro regiões, por via intramuscular profunda utilizando-se seringa de 20mL e agulha 25 X 7 mm para a punção e 30X8 mm para as aplicações.

2.1.3 Substâncias associadas à técnica de auto-hemoterapia

A associação de substâncias a auto-hemoterapia se deve as propriedades imunomoduladoras que apresentam, pois, segundo Appolinário e Megid (2007), imunomoduladores são substâncias que atuam no sistema imunológico conferindo aumento da resposta orgânica contra determinados micro-organismos, incluindo vírus, bactérias e protozoários, mediante a produção de interferon e seus indutores.

Ainda há o uso da auto-hemoterapia associada a outras substâncias como: o gás ozônio, a ozonoterapia (Scrollavezza, 2002), porque também funcionam como moduladores do sistema imunológico o que aumenta sua função isto é, quando a imunidade está diminuída ele aumenta a resposta em níveis compatíveis com o estado de saúde. Sendo assim associações são interessantes para modulação mais eficaz.

A técnica com ozônio, isto é, retransusão do sangue ozonizado, vem sendo usada na Europa por mais de três décadas para a cura de doenças, particularmente para tratamento de doenças crônicas de origem viral e neoplasias. Estudos experimentais sugerem que o ozônio pode desencadear a produção de citocinas em leucócitos, levando a modulação do sistema imunológico do hospedeiro (BOCCI, 1992).

Utilizaram a auto-hemoterapia associada ao clorobutanol como no caso da papilomatose canina a aplicação de clorobutanol mais a auto-hemoterapia, que foram realizadas no mesmo dia na pesquisa de Silva, (2004), das nove terapias testadas, optou pela utilização da auto-hemoterapia associada ao clorobutanol em um grupo de 27 bovinos, obtendo um total de 36% de animais recuperados.

O aspecto modulador da imunidade do levamisol foi estudado, em 1971, por Renoux e Renoux (1971), e foram os primeiros a evidenciar o efeito imunomodulador do levamisol quando o composto demonstrou aumento da resposta contra *Brucella sp.* em camundongos.

Lomnitzer e Rabson (1978), estudando o cloridrato de levamisol descobriram enorme potencial no estímulo imunológico, além de restaurador da função de células imunodeficientes (fagócitos, linfócitos T e linfócitos B).

2.1.4 Auto-hemoterapia e sua relação com o sistema imunológico

O sistema imunológico (SI) protege o organismo animal contra antígenos estranhos com potencialidade patogênica ou não, ativando ação coletiva e coordenada entre células e moléculas. Embora apresente grandes benefícios, precisa de controle para evitar que auto-antígenos sejam destruídos (FARIA et. al. 2008).

Do ponto de vista imunológico o baço é o maior órgão linfóide do organismo e o principal local das respostas imunes a antígenos originados no sangue. Desta forma, pode-se afirmar que o baço assume importante função de defesa do hospedeiro (BRANDT, 2006). Como um filtro, captura e apresenta antígenos a um grande número de células T e B que residem ou circulam no sistema linfóide. É também a maior fonte de imunoglobulina G (IgG), imunoglobulina M (IgM) e o maior local de produção de fatores envolvidos no processo fagocítico de bactérias encapsuladas (KOREN et. al., 1984).

Segundo Guimarães et. al. (2009), em estágios iniciais de invasão microbiana ou de injúrias teciduais, a homeostase local e sistêmica é realizada por macrófagos, dando início a uma complexa série de eventos celulares e bioquímicos. Eles passam a circular na corrente sanguínea durante 24 a 72 horas e, em seguida move-se para os tecidos por todo o corpo. Nos tecidos, monócitos maduros se diferenciam em vários tipos de macrófagos. O sistema imune funciona a partir da estimulação antigênica iniciando a resposta imune que envolve cooperação celular entre macrófagos, linfócitos B e linfócitos T. O processo de migração de monócitos, pela corrente sanguínea, para outros tecidos, permite a diferenciação em macrófagos residentes, o que permite constatar que macrófagos de diferentes tecidos são conhecidos por diferir com respeito às funções desenvolvidas.

Para Teixeira, (1940) estudos comprovam que o sistema mononuclear fagocitário (SMF) é eficazmente estimulado pela auto-hemoterapia. Pela prova do vermelho congo, evidencia-se a capacidade do Sistema SMF de armazenar corantes, o que é acentuado após a terapia. Por meio de punção e coleta de conteúdo vesicular inflamatório e centrifugação, e análise depois de seco e corado, há incidência de 5% de monócitos, após a aplicação da terapia com sangue e nova coleta e análise do conteúdo vesicular, notou-se aumento de 22% de monócitos as 8:00 horas, 20% após 72 horas, diminuindo gradualmente em até

sete dias. Outro teste se resume em determinar o índice bactericida em tumores, notando-se que após a terapia, há acréscimo máximo do índice bactericida e de monócitos dentro de 8:00 horas, provando a estimulação de defesa pelo SMF.

Para Silva, (2009), os resultados da leucometria global após aplicação da auto-hemoterapia em ratos, apresentaram-se normais, indicando que não havia alterações no sistema imunológico. Dois dias após, a leucometria, apresentou significativa diferença mostrando a reação imunológica esperada no quantitativo leucocitário, aumentada em quase duas vezes em relação ao primeiro dia.

2.2 Auto-hemoterapia em medicina veterinária

2.2.1 Hemoparasitoses

A Erlichiose canina é causada por uma bactéria a *Ehrlichia canis* pertencente a família Anaplasmataceae (GREENE, 2012), são microrganismos pleomórficos Gram-negativas, imóveis e que se replicam somente nas células dos hospedeiros. Tem predileção por leucócitos e plaquetas (QUINN, 2005).

Garcia (2008) relata o caso de uma cadela de aproximadamente dois anos de idade, SRD, com diagnóstico laboratorial positivo para erlichiose (*Ehrlichia* sp.) no qual foi instituído um tratamento com auto-hemoterapia ozonizada, em dez sessões. O número de monócitos antes do tratamento estava ligeiramente baixo e houve significativo aumento após o início da ozonioterapia, que pode ser atribuído ao tratamento permitindo ao autor constatar que a auto-hemoterapia ozonizada foi eficaz na reversão do quadro clínico e laboratorial de erlichiose na paciente tratada.

Em outra situação, utilizando-se de 10 animais portadores de hemoparasitoses diagnosticados através do exame parasitológico sanguíneo, Melo (2010), observou a presença do agente *Anaplasma platys* parasitando plaquetas no esfregaço, e após tratamento convencional de auto-hemoterapia associado à doxiciclina observou-se que em 80% dos animais tratados com autohemoterapia houve um aumento dos bastonetes durante as duas semanas seguintes, sugerindo que este aumento ocorreu pelo estímulo na produção das células de defesa.

2.2.2. Papilomatose cutânea

Na medicina veterinária, Santin & Brito (2004) e Silva (2004) incluíram que a auto-hemoterapia no tratamento de papilomatose cutânea em bovinos leiteiros se mostrou estatisticamente eficaz, quando comparado aos demais tratamentos.

Em outro estudo utilizando 154 bovinos, de raças e idades variadas, mas portadores de papilomatose cutânea plana e pediculada, Silva (1998) observou que a auto-hemoterapia foi mais eficiente que o implante pediculado autólogo de papiloma no tratamento de papilomatose bovina.

2.2.3 Outras lesões em anexos e pele

Para avaliar se o ozônio, Scrollavezza (2002) administrou a auto-hemoterapia ozonizada em 60 vacas leiteiras afetadas por sinais clínicos da podridão do pé (fleimão interdigital aguda), para o tratamento. Observou a parada na claudicação após três dias de tratamento com o ceftiour (antibiótico pertencente ao grupo das cefalosporinas), três dias de tratamento com oxitetraciclina e um dia de tratamento de ozônio com auto-hemoterapia. uso de ozônio na auto-hemoterapia para podridão do pé da vacas leiteras foi tão eficaz como a antibioticoterapia com ceftiour e oxitetraciclina, mas resultou ser o melhor porque o leite e a carne proveniente de vacas tratadas com ozônio não estavam sujeitas à tempo de afastamento, pois não deixa resíduos no leite e carne.

Silva, (2009) observou os efeitos da aplicação de auto-hemoterapia em ratos que sofreram incisão dorsal de 1,0cm², onde observou diferenças significativas nos resultados da leucometria global, dois dias após as aplicações de auto-hemoterapia nos animais tratados, assim como a cicatrização apresentou-se notoriamente mais plana, de bordas regulares e cicatriz final quase imperceptível, sem apresentarem intercorrências.

3. Fator de necrose tumoral

Para Turner et al., (2011), as citocinas são moléculas de sinalização com um papel importante nos processos fisiológicos e imunológicos. Zhao, 2001 reporta que os macrófagos são células secretoras multifuncionais do sistema imune que participam da regulação da resposta imunológica, pela liberação de mediadores químicos, frente a um estímulo apropriado.

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), foi descoberto por Carswell et al. (1975), é uma das cinco famílias mais importante de citocinas observado nos últimos quinze anos e o emprego de técnica da biologia molecular tornou possível a descrição dos vários polimorfismos presentes. Acredita-se que a presença destes polimorfismos possa desempenhar papel crucial na regulação das funções do gene, propiciando em algumas situações a produção diferencial da citocinas que, por sua vez, desempenham papéis centrais nos mecanismos inflamatórios usualmente presente na resposta imunológica mediada por células. Para Thomas, (2001), Genov et al., (2007) e Ohkawara, et al., (1992) é reconhecido como importante mediador em muitos eventos inflamatórios dependentes de citocina, com base em estudos realizados em camundongos.

No começo da série de estudos *in vitro* feitos por (Van der Linden et al.,1998) em torno do TNF- α com células do sangue total de indivíduos saudáveis e concentrações diferentes de lipopolissacáridios (LPS) verificaram que a produção de TNF- α se mantinha apesar de diferenças decorrentes de método laboratorial e de variações entre indivíduos, mostrando que no homem é verdadeira a existência de fenótipos de alta ou baixa produção desta citocina.

O TNF- α pode ser produzido por macrófagos ativados, linfócitos ou monócitos. Após ser produzido e liberado, o TNF- α liga-se a receptores específicos denominados de receptores de TNF (TNF-R) I e II, para que possa produzir o seu efeito biológico (BINGHAM, 2002). Dados adicionais indicam que o TNF- α pode regular moléculas de adesão e facilitar a imigração de células inflamatórias (TOMAS, 2001). Também é liberado por mastócitos e por macrófagos, na resposta alérgica, via mecanismos IgE-dependentes (OHKAWARA, et al,1992).

4. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S.; **Imunologia celular e molecular**. 7ª edição, Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 592p.

APPOLINÁRIO, C.M.; MEGID, J. Uso de imunomoduladores nas enfermidades infecciosas dos animais domésticos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 3, p. 437-448, jul./set. 2007.

AZEVEDO, V.F.; SILVA, M. B.G.; MARINELLO, D. K.; SANTOS, F. D.; SILVA, G.B.G. Leucopenia e trombocitopenia induzidas por etanercepte: relato de dois casos e revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reumatologia**. 2011; 52(1):107-112.

BINGHAM, C.O. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. **Journal Reumatologic** 2002;29 supl 65:3-9.

BRANDT, C.; CASTRO, C.M.M.B.de; LAVOR, S.M.L.de; CASTRO, F.M.M.de. Fagocitose e viabilidade monocitária de pacientes com esquistossomose mansônica na forma hepatoesplênica submetidos à esplenectomia e ao auto-implante esplênico. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 39(5):439-445, set-out, 2006.

BASILE-FILHO, A.; MARQUES, V.; SUEN M.; MARTINS, M. A.; COLETTI, F. A.; MARSON, F. Trauma and sepsis metabolic response monitoring. Monitorização da resposta orgânica ao trauma e à sepse. **Medicina, Ribeirão Preto**, 34: 5-17, jan./mar. 2001.

BOCCI, V. Ozonization of Blood for the Therapy of Viral Diseases and Immunodeficiencies. A Hypothesis. Institute of General Physiology and Nutritional Sciences, University of Siena, 53100, Italy. **Medical Hypotheses**. 39, 30-34. 1992.

CARSWELL, E.A.; OLD, L.J.; KASSEL, R.L.; GREEN, S.; FIORE, N.; WILLIAMSON, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumor. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 1975;72:3666.

DANTAS, J.A.; AMBIEL, C.R.; CUMAN, R.K.N.; BARONI, S.; AMADO, C.A.B. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum. Health Sciences**. Maringá, v. 28, n. 2, p. 165-170, 2006.

DAVID, A. C. A Auto-hemoterapia nas dermatoses. Tese de doutoramento. Faculdade de Medicina do Porto. **Imprensa Nacional**. 80p. Porto, Out. 1924.

DRUMOND, K. O.; QUESSADA, A. M.; SILVA, S. M. M. S.; COSTA, F. A. L.; SILVA, L. S.; PINHO, F. A. & LOPES, R. R. F. B. Transmissible Venereal Tumor Treated with Autohemotherapy. **Acta Scientiae Veterinariae**, 2013. 41: 1107.

FARIA B.A.; SILVA, S.M.; ABREU, M.T.C.L.; NAPIMOGA, M.H. Ação dos linfócitos T regulatórios em transplantes. **Revista Brasileira Hematologia Hemoterapia**. 2008;30(4):309-315.

GARCIA, C.A.;; STANZIOLA, L .;; ANDRADE, I. C. V.;; NEVES, S. M. N., GARCIA, L. A. D. Autohemoterapia maior ozonizada no tratamento de habronemose em equino – relato de caso. **Anais**. In: 35º CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2008. Gramado/RS.

GRACER, R.I.; BOCCI, V. Can the combination of localized “proliferative therapy” with “minor ozonated autohemotherapy” restore the natural healing process? **Medical Hypotheses**. Volume 65, Issue 4, 2005, Pages 752–759.

GREENE, C. E. Ehrlichia and Anaplasma Infections. **Infectious Diseases of the dog and cat**. Fourth Edition. Ed. Saunders Elsevier. 2012. Cap. 26. P. 227 – 260.

GENOV, I.R.; SOLE, D. Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α) and Asthma: Is Meta-analysis the only way out? **Revista Brasileira Alergia e Imunopatologia**. 2007;30(1):2-8.

GEOVANINI, T.; NORBERTO, M.M.C. Treatment of scleroderma autoimmune disease using autohaemotherapy: a clinical case study. Artigo de Investigação. **Revista Referência - II Série - n.º9 - Mar. 2009**. p.51-59.

GUIMARÃES, M.C.C.; GAMA FILHO R.V. Diferenciação de Monócitos-macrófagos de *Gallus gallus*: uma abordagem morfológica. **Perspectivas online**. v..3, n.9, 2009.

LEITE, D.F.; BARBOSA, P.F.T., GARRAFA, V. Auto-hemoterapia, intervenção do estado e bioética. **Revista da Associação Médica Brasileira**. 2008; 54(2): 183-8.

KLEMPARSKAYA, N.N.; SHALNOVA, G.A.; ULANOVA, A.M.; KUZMINA, T.D.; CHUHROV, A.D. Immunomodulating effect of autohemotherapy. **Journal of Hygiene Epidemiology Microbiology and Immunology** - 3:331-336; 1986.

KOREN, A.; HAASZ, R.; TIATLER, A.; KATZUNI, E. Serum immunoglobulin levels in children after splenectomy – A prospective study. **American Journal of Diseases Children**. 138:53-55, 1984.

KUNKEL, S.L.; STRITER, R.M.; CHENSUE S.W.; CAMPBELL, D.G.; REMICK, D.G. The role of TNF in diverse pa-thologic processes. **Biotherapy**. 1991;3:135-141.

MACKAY, F.; LOESTER, H.; STUEBER, D.; GEHR, G.; LES-SLAUR, W. Tumor necrosis factor alpha (TNF-al-pha)-induced cell adhesion to human endotelial cells is under dominant control of one TNF recep-tor type, TNF-R55. **Journal of Experimental Medicine**. 1993;177:1277-1286.

MELO, T. B.;; FAUSTINO, M. A. DA G.;; TEIXEIRA, M. N.;; FRANÇA NETO, J.H. de.;; RAMOS, R. A. N.;; FERREIRA, M.A.;; ANDRADE, L. S. S.de. Auto-hemoterapia no tratamento de cães Acometidos de hemoparasitoses – **Anais da**

X Jornada de ensino, pesquisa e extensão – JEPEX 2010 – UFRPE: Recife, 18 a 22 de outubro.

METTENLEITER M.W. Auto-hemotranfusão como prevenção de complicações. Autohemotransfusion in preventing postoperative lung complications. **American Journal of Surgery**. 1936;32(2):321-3.

OHKAWARA, Y.; YAMAUCHI. K.; TANNO, Y.; TAMURA, G.; OHTANI, H.; NAGURA, H. Human lung mast cells and pulmonary macrophages produce tumor necrosis factor-alpha in sensitized lung tissue after IgE receptor triggering. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology** 1992;7: 385-92.
OLLIER, W.E. Genes de citocinas e susceptibilidade a doença. **Citocinas**. 2004, 21 nov - 7 dez, 28 (4-5) :174-8.

OLIVEIRA Jr. J.O. de, Tampão Sanguíneo Epidural: Um método a ser absoldido. Anestesiologia. **Prática Hospitalar**. Ano IX. Número 51. Mai-Jun/2007.

VARELLA, P.P.V.; FORTE, W.C.N. Citocinas: a revisão. **Revista Brasileira de alergia e imunopatologia**. 2001; 24(4):146-154.

VAN DER LINDEN, M.W.; HUIZINGA, T.W.; STOEKEN, D.J.; STURK, A.; WESTENDORP, R.G. Determination of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-10 production in a whole blood stimulation system: assessment of laboratory error and individual variation. **Journal Immunologic Methods** 1998;218: 63-71

VIZONI, S.L.; LIEBER, S.R.; SOUZA, C.A. de; SELL, A.M.; VISENTAINER, J.E.L. Papel das citocinas na imunopatogênese da Doença do Enxerto contra o Hospedeiro. Role of cytokines in the immunopathogenesis of Graft-versus-Host Disease. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. 2008;30(2):142-152.

RAMIREZ, J. In diabetes mellitus 2, the autoantibodies are turned negative through autohemoterapy. **Diabetes research and clinical practice** [0168-8227] yr:2000 vol:50 pg:173 -173.

RENOUX G.; RENOUX M. Effect immunostimulant d'un imidothiazole dans l'immunisation des souris contre l'infection par *Brucella abortus*. **Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences** Paris 1971; **272**: 349-350.

REZENDE, M.S.V.M.; SILVA, C.A. de A.; ANTUNES, V.C.; RIBEIRO, L.E. F.; TATSUI, N.; CVINTAL, T. Uso do concentrado de plaquetas em doença da superfície ocular. **Revista Brasileira de Oftalmologia**. 2007, vol.66, n.4, pp. 257-261.

LOMNITZER, R.; RABSON, A.R. The effect of levamisole on E-rosette formation by trypsinized lymphocytes. **Clinical & Experimental Immunology** (1978) 33, 499-502.

NARANJO, P.; LA J.; BARÓ, S.; DEL CARMEN, M.; PAIBA, P.; ELENA, M.; REYES, M.O. Hematopoyesis hepática en el ratón sometido a mielosupresión por

quimioterapia y tratado con *Aloe barbadensis* Miller. **Revista Cubana de Medicina Militar**. 30(3):172-175, jul.-sept. 2001.

SILVA, L. A. F. da.; JAYME, V. de S.; OLIVEIRA, M.A.B. de.; EURIDES, D.; FIORAVANTI, M.C.S.; DIAS FILHO, F. de C. Implante pediculado de papilomas cutâneos e autohemoterapia no tratamento da papilomatose bovina. **Veterinária Notícias**. v. 4, n. 1, 1998- ISSN 0104-3463. Acesso em 06/07/2011.

SILVA, L. de A.; CARLI, D. de.; CANGIANI, L.M.; GONÇALVES FILHO, J.B.M.; SILVA, I.F. da. Tampão sanguíneo peridural em pacientes testemunhas de Jeová. Relato de dois casos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. Informação clínica. vol.53 no.5 Campinas Sept./Oct. 2003. ISSN 0034-7094.

SILVA, L.A.F. da.; VERÍSSIMO, A.C.C.; VIANA FILHO, P.R.L.; FIORAVANTI, M. C.S.; EURIDES, D.; LINHARES, G.C.F.; ROMANI, A.F.; TRINDADE, B.R. Eficiência da repetição de diferentes protocolos de tratamentos para papilomatose bovina. **Revista da FZVA**. Uruguiana, v.11, n.1, p. 153-165. 2004.

SILVA, C.H.; SOUZA, L. de J.; PAPA-MARTINS, M. Avaliação dos efeitos da auto-hemoterapia sobre a cicatrização e presença de leucócitos séricos em ratos wistar. **Revista Eletrônica de Enfermagem do UNIEURO**. REEUNI, Brasília, v.2, n.1, p. 39-57, jan/abr, 2009.

SANTIN, A.P.I.; BRITO, L.A.B.; Estudo da papilomatose cutânea em bovinos leiteiros: comparação de diferentes tratamentos. *Ciência Animal Brasileira* v. 5, n. 1, p. 39-45, jan./mar. 2004.

SCROLLAVEZZA, P.; ANSALONI, F.; POLIDORI, P.; ABLONDI, M.; POGLIACANI, B. Ozonized autohemotherapy, a new method to treat dairy cow acute interdigital phlegmon. Comparison with ceftiofur and oxytetracycline. Sociedade Científica de Produção Animal. **Italian Journal Animal Science**. Vol. 1, 211-216, 2002.

STAUBACHA, P.; ONNENA, K.; VONENDA, A.; METZA M.; SIEBENHAARA, F.; TSCHENTSCHERA, I.; OPPERA, B.; MAGERLA, M.; LÜDTKEC, R.; KROMMINGAD, A.; MAURER, M. Autologous Whole Blood Injections to Patients with Chronic Urticaria and a Positive Autologous Serum Skin Test: A Placebo-Controlled Trial. **Dermatology** 2006;212:150–159 *Pharmacology and Treatment*.

TEIXEIRA, J. Complicações Pulmonares Pós-Operatórias. **Brasil-Cirúrgico**, 1940, v. 2, n. 3, p. 213 - 230.

TORRES, M.L.A.; VASCONCELOS, A. Tampão-sanguíneo e cefaléia pós punção da dura-máter. Centro de Estudos de Anestesiologia e Reanimação. **Normas e condutas**. Ano VI. Julho/Setembro-2002. Acesso em: 03/09/2011.

THOMAS, P.S. Tumour necrosis factor-alpha: the role of this multifunctional cytokine in asthma. **Immunology & Cell Biology** 2001;79:132-40.

TURNER, A.K.; BEGON, M.; JACKSON, J.A.; BRADLEY, J.E.; PATERSON, S.A. Diversidade genética de citocinas associadas à variação imunológico e resistência a vários patógenos em uma população natural de roedores. **PLOS Genetics**. 2011 Oct, 7 (10): e1002343. Epub 20 Oct 2011.

CAPÍTULO 1

Avaliação dos níveis de TNF alpha e leucograma de ratos submetidos a seções de autohemoterapia

Artigo a ser submetido à publicação no periódico Ciência Rural

Auto-hemoterapia em ratos (*Rattus Norvergicus*): efeito sobre o nível do fator de necrose tumoral (TNF- α) e leucócitos

Autohemotherapy in rats (*Rattus norvegicus*): nível effect on the tumor necrosis factor (TNF- α) and leukocytes

Mirleide de Araújo Cáo^{I,1}; Lorraine Stoco Tosi^{II} Tatiane Fiorotti^I Henrique Jordem Venial^I Leonardo Oliveira Trivilin^{II} Cleber Tofoli Vieira^{III} Lenir Cardoso Porfírio^{I*}

RESUMO

Com o objetivo de empregar como tratamento a técnica de auto-hemoterapia (AH) foi identificado os níveis de proteção em animais de companhia, pela quantificação do TNF- α em ratos submetidos a esta técnica. Os grupos experimentais consistiram de G1: Grupo controle e G2: Grupo AH. Com as amostras de sangue obtidas dos animais e armazenadas em tubo com anticoagulante foram utilizadas para a realização do leucograma e a determinação dos níveis de TNF- α por meio do teste ELISA, com plasma sanguíneo, em três momentos. Nos resultados observa-se aumento na produção de TNF- α dentro dos grupos G1 e G2 ($p < 0.05$). O número de monócitos diminui no M3 ($p = 0,024$) e o número de linfócitos diminui no M2 ($p = 0,018$) do G2. Com os dados obtidos neste trabalho, especula-se que a AH interfere significativamente nos valores de linfócitos e monócitos, após uma semana da aplicação da auto-hemoterapia.

Palavras-chave: Animais; Citocina; Sistema imune. *Auto-hemoterapia*.

^I Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Rua Alto Universitário, sn, Bairro Centro, 295000-000, Alegre, ES, Brasil. E-mail: lenircp@yahoo.com.br

^{II} Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias (CCA-UFES, Alegre, ES, Brasil

^{III} Administrador, Técnico de Suprimentos da Empresa Fibria Celulose S.A.

ABSTRACT

It was quantified TNF- α to evaluate the defense system in rats submitted to autohemotherapy (AH), since it could be used as an alternative diagnostic and increase levels of protection for pets. The experimental groups consisted of G1: control group and G2: AH group. Venipuncture was performed in the animals' blood into a tube with anticoagulant to perform the WBC in three stages. The determination of TNF- α was performed by ELISA using blood plasma. The results showed that there is increased production of TNF- α in the groups G1 and G2 ($p < 0.05$), after the application of autohemotherapy and the number of monocytes decreases in the moment M3 ($p = 0.024$) with a reduction in the production of lymphocytes in M2 ($p = 0.018$) in G2. Based on the data obtained in this work, it is speculated that the AH, significantly interferes, significantly the values of lymphocytes and monocytes, after a week of applying autohemotherapy.

Keywords: Animals; Cytokine; Immune system; *Autohemotherapy*.

INTRODUÇÃO

Auto-hemoterapia é uma técnica antiga empregada em doenças sistêmicas e de origem desconhecida. Observa-se que a técnica foi usada em humanos (TEIXEIRA, 1940) e animais (CORREIA e CORREIA, 1992).

O sangue extraído por punção venosa é rico em CO₂ e em contato com corpo estranho (no caso a seringa), provoca modificações físico-químicas na estrutura da hemácia e, por isso, quando injetado no organismo, atua como proteína estranha. Há efeito estimulante das proteínas parentais sobre o sistema simpático e o parassimpático e reações vasomotoras e teciduais no organismo, assim como a ação do sistema mononuclear fagocitário estimulado pela auto-hemoterapia (TEIXEIRA 1940).

Para VERONESI, (1976), um desses estímulos é o aumento do número e função de macrófagos no organismo e para Apolinário e Megid (2007), quando ativados produzem citocinas para a modulação da resposta inflamatória com ação mitógena para os timócitos, estimulando a resposta de fase aguda, proliferação e ativação de linfócitos T e B.

Dentre as citocinas de importância está o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) secretado pelos macrófagos, células T e B e fibroblastos, e podem agir em quase todas as células nucleadas. Quando liberado em baixas concentrações age nas células endoteliais promovendo vasodilatação e as estimulando a secretarem outro grupo de citocinas com ação quimiotática em relação aos leucócitos, promovendo processo inflamatório local que possibilita o combate a quadros infecciosos. Pode atuar de forma solúvel ou ligada à membrana. É também, um mediador de muitas funções imunes e inflamatórias, que regula o crescimento de diferentes tipos celulares (BINGHAM, 2002).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar a produção de TNF- α e de células leucocitárias em ratos (*Rattus norvegicus*) linhagem Wistar, em presença de auto-hemoterapia.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi delineado como um ensaio clínico pareado e obedeceu aos princípios da Comissão de Ética no uso de animais em pesquisa, da Universidade Federal do Espírito Santo, com protocolo experimental aprovado sob o número 067 – 2012.

Os animais utilizados neste experimento foram obtidos do Biotério Central, Unidade Técnica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e encaminhados ao Biotério do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo. Ao todo foram utilizados 12 ratos (*Rattus norvegicus*) machos hípidos, da linhagem Wistar, com 60 dias de idade e peso em torno de 500g. Foram alocados em caixa de polipropileno com lotação média de dois animais por caixa, mantidos em temperatura de

aproximadamente 21 °C a 23 °C, umidade e luminosidade controladas em foto período de 12 horas claro/escuro/por 28 dias, alimentados com ração específica e água *ad libidum*.

A eutanásia ao final do experimento, foi realizada de acordo com a Lei nº1000 de maio de 2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária. Aplicação de anestesia geral com Tiopental Sódico em dose letal de 100mg/kg e Hypnol a 3%, seguida de exsanguinação total.

Delineamento experimental

Grupo 1 (Controle) – grupo de seis animais. Cada animal, após sedação com a associação de 60 mg/Kg de cetamina e 10 mg/Kg de xilazina, tiveram o sangue coletado, por via intracardíaca.

M1: Para as análises laboratoriais antes do procedimento. Foram colhidos 0,7 mL de sangue de cada animal, separando-se 0,5 mL para o leucograma e posterior separação do plasma para dosagem de TNF- α . Neste grupo, após a coleta aplicou-se 0,2 mL de soro fisiológico, via intramuscular, em cada um animal.

M2: Após 8 horas da aplicação do soro fisiológico foram retirados mais 0,5 mL de sangue pela mesma via, com sedação, para nova análise do leucograma e dosagem de TNF- α .

M3: Após 7 dias da aplicação do soro fisiológico, os animais foram submetidos a sedação, por via intramuscular, para nova coleta de 0,5 mL de sangue, realização do leucograma, separação do plasma e verificação dos níveis de TNF- α .

Grupo 2 (Autohemoterapia) – grupo de seis animais. Cada animal, após sedação com a associação de 60 a 80mg/Kg de cetamina e 8 a 15mg/Kg de xilazina, tiveram sangue coletado por via intracardíaca.

M1: Para as análises laboratoriais antes do procedimento. Foram colhidos 0,7 mL de sangue de cada animal, separando-se 0,5 mL para o leucograma e posterior separação do

plasma para dosagem de TNF- α . Neste grupo, após a coleta aplicou-se 0,2 mL de sangue fresco, via intramuscular em cada um animal.

M2: Após 8 horas da aplicação do sangue fresco foram retirados mais 0,5 mL de sangue pela mesma via, com sedação, para nova análise do leucograma e dosagem de TNF- α .

M3: Após 7 dias da aplicação do sangue fresco, os animais foram submetidos a sedação por via intramuscular, para coleta de 0,5 mL de sangue, realização do leucograma, separação do plasma e verificação dos níveis de TNF- α .

As análises da leucometria e da dosagem de TNF- α ocorreram nos momentos M1, M2 e M3 do grupo controle (G1) e do grupo auto-hemoterapia (G2). Após a coleta, foi realizado o hemograma no equipamento Mindray® BC 2800 Vet, e posteriormente o sangue foi centrifugado em macro centrífuga sorológica marca Centribio® a 1800 g, para separação do plasma. Do hemograma foram separados os valores do leucograma.

Com o plasma foram realizadas as determinações dos níveis de TNF- α , em duplicata, por meio do teste ELISA (ABCAM (ab100784 TNF alfa Rat)) com sensibilidade <25pg/mL e faixa de avaliação entre 82.3 pg/mL-20000 pg/mL. As análises ocorreram segundo recomendação do fabricante e a densidade óptica foi determinada usando leitor automático de microplacas (BIO-RAD, PW40), no comprimento de onda de 450 nm.

Para análise dos dados foi utilizado o teste estatístico não paramétrico de Kruskal – Wallis para a verificação das possíveis alterações dos níveis de TNF- α para cada célula e verificação da associação entre a leucometria e níveis de TNF- α . Foi utilizado ainda o teste de Wilcoxon, para a identificação da possível diferença entre os grupos controle e auto-hemoterapia. Para os testes foi utilizado o nível de 5% de probabilidade uma vez que foi verificada a não normalidade, via pós-teste de Siegel e Castellan ($p < 0,05$) dos erros amostrais.

RESULTADOS

Os resultados obtidos na análise do leucograma observou-se que pós teste de Siegel e Castellan a 5% de significância no teste de Kruskal-Wallis, existe diferença significativa entre a produção de monócitos ($p < 0,05$) entre os momentos M1 e M3 do G2 (Auto-hemoterapia), quando diminui em número monócitos na corrente sanguínea, em M2 ($p = 0,024$) (Fig.1). Para o número de linfócitos, observou-se uma diferença significativa ($p < 0,05$), o que demonstra significância entre M1 e M2, com o número de linfócitos menor para o grupo M2 no G2, com ($p = 0,018$) (Fig.2). Esta diferença não ocorreu com as demais células consideradas, neutrófilos ($p = 0,943$), eosinófilos ($p = 0,663$) e leucometria total ($p = 0,489$) para o G2. No G1 (Grupo controle) não se observou diferenças em nenhuma das células da série leucocitária onde (monócitos ($p = 0,732$), linfócitos ($p = 0,113$), neutrófilos ($p = 0,593$), eosinófilos ($p = 0,393$)) nem na produção de leucócitos totais ($p = 0,174$).

Na análise dos níveis de TNF- α , diferença significativa dentro dos grupos sendo que para o G1 (Grupo controle) para o pós-teste de Siegel e Castellan ($p < 0,05$) entre M1 e M3. Para o G2 (Auto-hemoterapia) também há diferença significativa na produção de TNF- α com ($p < 0,05$), considerando entre os M1 e M3. Para a análise entre os grupos (G1 e G2) da produção de TNF- α foi usado o teste de Wilcoxon que mostrou diferença não significativa na produção de TNF- α entre os grupos ($p = 0,651$).

DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que houve diminuição de monócitos em M3 após aplicação da auto-hemoterapia, o que segundo LOPES, (2007) as funções dos monócitos e macrófagos incluem a transformação de monócitos em células efetoras teciduais; ação fagocítica e microbicida; e regulação da resposta imune. O que nos explica a alteração na quantidade dessas células no leucograma entre M1 e M3 após a auto-hemoterapia.

(DRUMOND, 2013) provavelmente, o mecanismo de ação da auto-hemoterapia é aumentar a imunidade orgânica.

Outra célula que tem importante diminuição em M2 são os linfócitos que segundo LOPES, (2007), as principais funções dos linfócitos incluem a imunidade humoral, imunidade celular, regulação imune, atividade citotóxica e vigilância imune e secreção de linfocinas. O que pode explicar a diminuição dessas células na corrente sanguínea em M2 após auto-hemoterapia, pois estas células possuem um fenômeno de recirculação, de suma importância biológica porque proporciona uma distribuição generalizada de células linfoides ocupadas com a resposta imune sistêmica e como resultado, grande número de linfócitos pode ser exposto a um antígeno depositado localmente no tecido (LOPES, 2007).

Os resultados revelaram que há aumento na produção de TNF- α , após a aplicação da auto-hemoterapia, com redução no número de monócitos em M3. Com a continuada produção de TNF- α e, como é uma citocina pró-inflamatória, o seu valor elevado estimula o aumento dos macrófagos nos tecidos, de acordo com MACKAY, (1993) a estimulação da adesão de leucócitos ao endotélio é uma das muitas atividades do TNF- α , com ações semelhantes à IL-1, sendo mediador na defesa anti-humoral e anti-viral (VARELLA, 2001).

Segundo ZHAO (2001) os macrófagos são células secretoras multifuncionais do sistema imune que participam da regulação da resposta imunológica, pela liberação de mediadores químicos, frente a um estímulo apropriado. Pode-se então explicar o mecanismo de ação da auto-hemoterapia, agindo como imunoestimulador e a interação com o sistema imune.

O TNF- α , regula as citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas (IL-1, IL-6 IL-8), principalmente a secreção e modulação da IL-1 e o fator de estimulação de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (AZEVEDO 2011). A IL-1, TNF- α e IFN- δ estimulam a produção de quimiocinas e moléculas de adesão, recrutando mais células

inflamatórias da corrente sanguínea e criam condições para amplificação da cascata inflamatória (BALDAIA, 2002). Sabendo disso, tem-se mais uma alternativa para a resposta de diminuição de monócitos apresentada em M3 inversamente aos valores de TNF- α , no mesmo momento, modulando a resposta inata.

Os linfócitos são outras células que declínam na leucometria e como comentou Vizoni et al, (2008) as citocinas têm importante papel na comunicação celular e influenciam no crescimento e diferenciação de linfócitos, especula-se que seja esse aumento de TNF- α , juntamente com outras citocinas, principalmente a IL-1, que estimulem essa diferenciação e os retirem da corrente sanguínea, visto que as citocinas são elementos essenciais no controle da resposta imune, regulam a magnitude e natureza destas respostas, como também novos receptores na superfície das células. Para Basile filho (2001) a produção de TNF- α e IL-1 promovem a liberação sistêmica de IL-6 e IL-8, amplificam a resposta inflamatória, portanto, uma explicação para o declínio dessas células na corrente sanguínea.

O excesso de TNF- α pode levar a sérias consequências (AZEVEDO, 2011). Altas concentrações de TNF no sangue de pacientes com septicemias estão relacionadas com a piora do prognóstico. Em animais de laboratório, injeções de TNF- α , mesmo na ausência de bactérias, levam a quadro semelhante ao choque séptico, sugerindo importante ação destrutiva quando sintetizado em quantidades excessivas (KUNKEL et al. 1991).

Como há o aumento de TNF- α , nos momentos iniciais, de forma branda, acredita-se que aja estimulando e modulando a resposta inata, mas em M3, ele continua a aumentar, mesmo com a diminuição na leucometria total, mas sabe-se que seu excesso pode levar a piora do prognóstico dos pacientes segundo AZEVEDO, (2011), mas este fato não tem sido relatado em estudos feitos com pacientes que utilizaram a auto-hemoterapia como tratamento.

Neste sentido, especula-se que a expressão de TNF- α pela aplicação da auto-hemoterapia, estimule as células da resposta inata, principalmente monócitos e linfócitos. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi verificar se há resposta imunológica, após o procedimento de auto-hemoterapia, comparada com a aplicação de soro fisiológico, após as aplicações.

Buscou-se evidenciar que a técnica empregada em várias áreas clínicas produz a imunoestimulação na produção de TNF- α , visto que macrófagos e monócitos participam ativamente no processo de sua produção e na fagocitose de células infectadas. Para RAMIREZ (2000), por exemplo, a auto-hemoterapia representa um novo método para tratamento e cura do Diabetes Mellitus 2, pela auto-negativação de anticorpos, atuando como auto-vacina ao estimular o sistema auto-imune.

Para STAUBACH, (2006) a auto-hemoterapia, é promissora e potencialmente curativa e mais uma opção terapêutica, além de seguro, outro exemplo, de pacientes que apresentavam urticária tiveram melhora significativa na sua qualidade de vida, além da diminuição do uso de anti-histamínicos e segundo GRACER, (2005) seus processos resultam em estimulação dos sistemas imunitários e cura dos pacientes.

A auto-hemoterapia pode ser empregado como uma alternativa para contribuir com a imunogenicidade e aumento dos níveis de proteção em animais de companhia.

Vale ressaltar que de acordo com os resultados obtidos é de suma importância a dosagem de outras citocinas, como a IL-1 e IL-6, levando em consideração a modulação da IL-1 exercida pelo TNF- α , e a função anti-inflamatória da IL-6, pois pode inibir grandes excessos de TNF- α , ao influenciar de forma positiva a estimulação da produção do TNF- α , pela auto-hemoterapia. Sugere-se também que o local de aplicação seja avaliado, por meio de técnicas histopatológicas a fim de observar se há aumento do número de macrófagos na região de aplicação. Por isso é importante estudos que mostrem os efeitos dessa técnica sobre a resposta imune nos animais.

CONCLUSÃO

Houve efeito da auto-hemoterapia no número de monócitos e linfócitos na corrente sanguínea.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA (em anexo)

REFERÊNCIAS

APPOLINÁRIO, C.M.; MEGID, J. Uso de imunomoduladores nas enfermidades infecciosas dos animais domésticos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.28, n. 3, p. 437-448, jul./set. 2007. Disponível em: < <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/seminariarias/index>> Acesso em: 21/08/2012.

AZEVEDO, V.F. et al. Leucopenia e trombocitopenia induzida por etanercepte: relato de dois casos e revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.52, n.1, p.107-112, 2011. Acesso em: 18/05/2012. Doi: 10.1590/S0482-5004201200010001.

BALDAIA, C. et al. Doença de Crohn: TNF- α e outras citocinas. Artigo de revisão. **GE**, v. 9, mai/jun 2002.

BASILE-FILHO, A. et al. Trauma and sepsis metabolic response monitoring. Monitorização da resposta orgânica ao trauma e à sepse. **Medicina**, Ribeirão Preto, v.34, p.5-17, jan/mar 2001. Acesso em: 06/07/2010. [Online] Disponível em: < <http://revista.fmrp.usp.br/2001/vol34n1/monitorizacao.pdf>>

BINGHAM, C.O. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. **Journal Rheumatologic**, v.29, supl.65, p.3-9, 2002.

Disponível em: <<http://www.jrheum.com/subscribers/02/65/3.html>> Acesso em: 17/03/2012.

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. 843p.

DRUMOND, K.O. et al. Transmissible venereal tumor treated with autohemotherapy. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.41, p.1107, 2013. Acesso em: 02/05/2013. [Online] Disponível em:< <http://www.ufrgs.br/actavet/41/PUB%201107.pdf>>

GRACER, R.I.; BOCCI, V. Can the combination of localized “proliferative therapy” with “minor ozonated autohemotherapy” restore the natural healing process? **Medical Hypotheses**, v.65, p.752–759, 2005. Acesso em: 22/07/2013. Doi:10.1016/j.mehy.2005.04.021.

KUNKEL, S.L. et al. The role of TNF in diverse pathologic processes. **Biotherapy**, v.3, p.135-141, 1991. Acesso em: 30/07/2012. Doi: 10.1007/BF02172086

LOPES, S.T. A. et al. **Manual de patologia clínica veterinária**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2007, 107p.

MACKAY, F. et al. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α)-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55. **Journal of Experimental Medicine**, v.177, p.1277-1286, 1993. Acesso em: 02/12/2012. Doi: 90022-1007/93/05/1277/10

RAMIREZ, J. In diabetes mellitus 2, the autoantibodies are turned negative through autohemoterapy. **Diabetes research and clinical practice**, v.50, p.173-173, 2000. Acesso em 05/12/2012. Doi: ez43.periodicos.capes.gov.br/10.1016/S0168-8227(00)82046-X

STAUBACH, P. et al. autologous whole blood injections to patients with chronic urticaria and a positive autologous serum skin test: A placebo-controlled trial. **Dermatology**, v.212 150–159p, 2006. Pharmacology and Treatment. Acesso em: 30/07/2012. Doi: 10.1159/000090656

TEIXEIRA, J. Complicações pulmonares pós-operatórias. **Brasil-Cirúrgico**, v.2, n.3, p. 213–230, 1940. Acesso em: 05/09/2012. [Online]. Disponível em:< http://www.rnsites.com.br/artigo_jesse_teixeira.pdf>

VARELLA, P.P.V.; FORTE, W.C.N. Citocinas: a revisão. **Revista Brasileira de alergia e imunopatologia**, v.24, n.4, p.146-154, 2001. Acesso em: 23/12/2012. [Online]. Disponível em: < <http://www.asbai.org.br/revistas/Vol244/citocinas.htm>>

VERONESI R. **Imunoterapia: O impacto médico do século**. Medicina de Hoje, mar/1976, 9p. Acesso em: 05/07/2011. [Online]. Disponível em:< <http://www.scribd.com/doc/28238648/Imunoterapia-O-Impacto-medico-Do-seculo>>

VIZONI, S.L. et al. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.30, n.2, p.142-152, 2008. Acesso em: 05/07/2011. [Online]. Disponível em: < http://www.scielo.br/pdf/rbhh/v30n2/a13_v30_n2.pdf>

ZHAO, Z.Z. et al. Mast cell degranulation and the role of T cell Rantes in oral lichen planus. **Oral Diseases**, v.7, n.4, p.246-251, 2001.

Anexo: Figuras

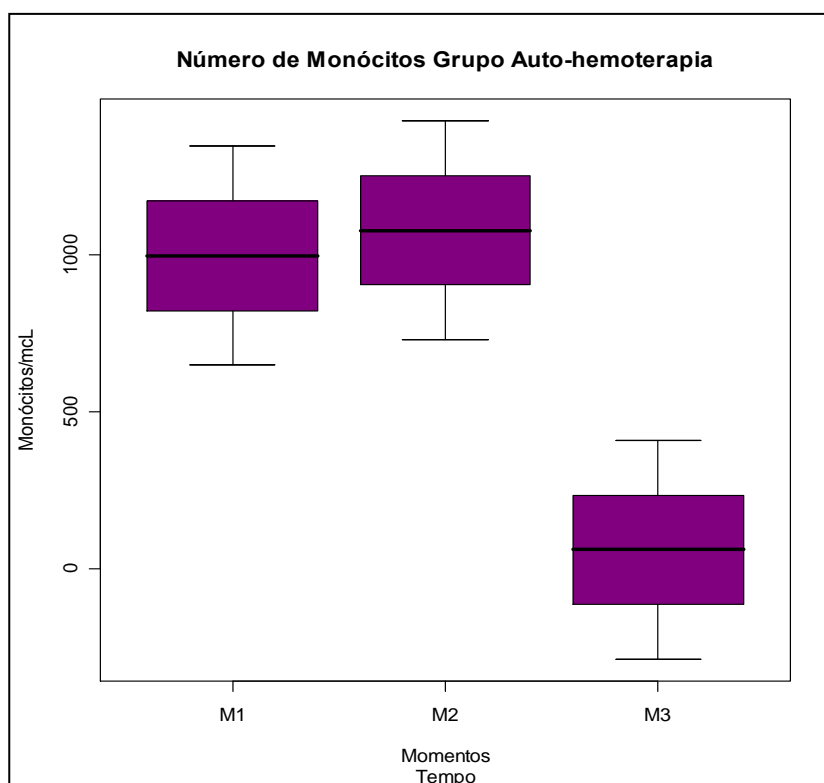


Fig. 1 Valores do número de monócitos no G2 grupo AH, onde há diferença significativa entre M1 e M3 *($p=0,024$). O que não ocorre no G1 grupo controle. *Valores a um nível de 5% de significância pós-teste de Siegel e Castellan.

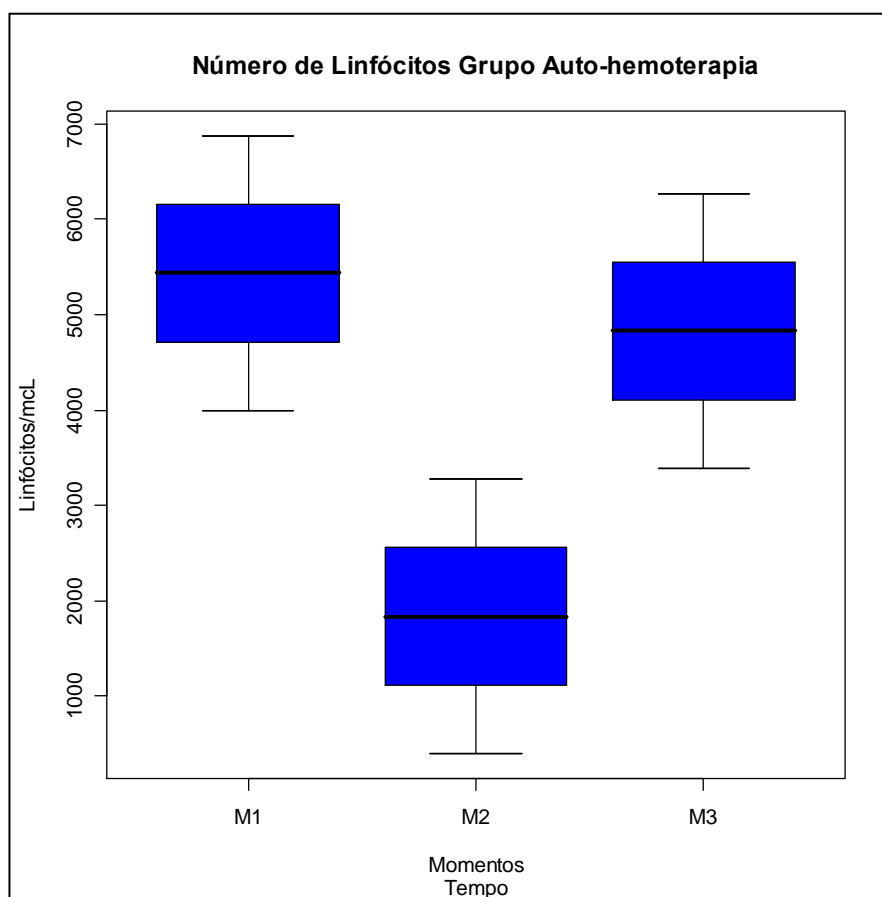


Fig. 2 Contagem de Linfócitos no G2 grupo AH, há diferença significativa entre M1 e M2 *($p=0,018$). O que não ocorre no G1 grupo controle.*Valores a um nível de 5% de significância pós-teste de Siegel e Castellan.

Anexo 2: COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 067/2012, relativo ao projeto de pesquisa intitulado **“Avaliação dos níveis do fator de necrose tumoral (TNF- α) e do hemograma em ratos (*rattus norvegicus*) após procedimento de auto-hemoterapia.”**, que tem como responsável o (a) docente **Leonardo Oliveira Trivilin**, está de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES), tendo sido aprovado na reunião ordinária de 14/09/12.

Vitória (ES), 17 de setembro de 2012.



Presidente do
Comitê de Ética no Uso de Animais
CEUA/UFES