

ALICE MARIA MELVILLE PAIVA DELLA LIBERA

**AVALIAÇÃO DOS FAGÓCITOS NO LEITE DE BÚFALAS
(*Bubalus bubalis*) HÍGIDAS CRIADAS NO ESTADO DE
SÃO PAULO**

**São Paulo
2002**

ALICE MARIA MELVILLE PAIVA DELLA LIBERA

**AVALIAÇÃO DOS FAGÓCITOS NO LEITE DE BÚFALAS
(*Bubalus bubalis*) HÍGIDAS CRIADAS NO ESTADO DE
SÃO PAULO**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor, junto à Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade de
São Paulo

Departamento:
Clínica Médica

Área de concentração:
Clínica Veterinária

Orientador:
Prof. Dr. Wanderley Pereira de Araujo

**São Paulo
2002**

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1170 Della Libera, Alice Maria Melville Paiva
FMVZ Avaliação dos fagócitos no leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) híbridas criadas no Estado de São Paulo / Alice Maria Melville Paiva Della Libera. – São Paulo : A. M. M. P. Della Libera, 2002.
125 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo.
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
Departamento de Clínica Médica, 2002.

Área de concentração: Clínica Veterinária.
Orientador: Prof. Dr. Wanderley Pereira de Araujo.

1. Búfalo. 2. Leite. 3. Leucócitos. 4. Fagocitose.
5. Imunologia. I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: DELLA LIBERA, Alice Maria Melville Paiva

Título: Avaliação dos fagócitos no leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) híidas criadas no Estado de São Paulo

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Clínica Veterinária

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

*O sentido da vida
é o que a gente sente*

*por um filho
que é a cara da gente*

*por um trabalho
que ocupa a mente*

*por um amor
que nos deixa doente*

Martha Medeiros

DEDICATÓRIAS

*Eu dedico esse trabalho à **benção** de ter a **família** que eu tenho e ao grande **amor** que eu tenho por eles...*

*Aos meus avós sempre presentes e incentivadores,
Aos meus pais, Ena e Argemiro, que sempre me apoiaram,
Às minhas irmãs, Luísa e Flávia, minhas grandes amigas e companheiras,*

Aos meus filhos, Pedro Henrique e Camila, que caminham comigo e são a minha absoluta referência,

Ao meu marido, Ermelindo, meu amor e melhor amigo, sem o qual nada disso teria sentido....

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof Dr. Wanderley Pereira de Araujo, pela sua amizade e confiança.

Ao Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel por ter sido o grande interlocutor, viabilizador e motivador desse estudo.

Ao Prof. Dr. Mauricio Garcia, grande amigo e incentivador, fundamental influência em toda a minha formação.

A Regina Mieko Sakata Mirandola, pela extrema competência e senso ético além da amizade e coerência

Prof. Dr. Fernando José Benesi que me acolheu e apoiou, mostrando o caminho na minha “nova casa”.

Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani, mestre sempre disponível nas muitas dúvidas e exemplo de determinação.

Ao Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel Junior que sobrecarregou ainda mais sua rotina me liberando para a conclusão desse trabalho.

A Profa. Dra. Lilian Gregory pelo apoio e companheirismo no dia-dia.

Ao Prof. Dr. Wilson Roberto Fernandes que, como tantas vezes o fez, me pegou pelas mãos na fase mais “abstrata” desse estudo e me mostrou o caminho.

Aos professores do departamento de Clínica Médica: Prof. Dr. Archivaldo Reche Junior, Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson, Prof. Dr. Cássio Xavier de Mendonça Junior, Profa. Dra. Marcia Mery Kogika, Profa. Dra. Maria Helena Matiko Akao Larsson, Profa. Dra. Mitika Kuribayashi Hagiwara, Profa. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin e Profa. Dra. Sílvia Regina Ricci Lucas pela convivência harmoniosa.

Aos amigos Ênio e Cláudia Mori, que me alfabetizaram nos procedimentos aqui apresentados e que foram um exemplo de dedicação e seriedade de trabalho, com muito bom humor.

A amiga Cristina Massoco que de aluna se revelou a melhor das mestras além de motivadora.

A amiga Sandra Kitamura meu braço direito na execução desse trabalho.

Aos amigos Mary e Francisco Leydson Feitosa pela amizade e incondicional apoio por todos esses anos.

Agradeço aos bubalinocultores, Sr. Luís, José Luis, Daniele, Fábio, Fernanda e Renato, por terem aberto as portas de seus criatórios permitindo a colheita de amostras e me ensinando os encantos dessa espécie.

Ao Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli pela sua inabalável boa vontade e serenidade, sempre contribuindo nos momentos críticos desse estudo.

Ao Prof Dr. Benjamin Eurico Malucelli que abriu as portas de seu laboratório permitindo a realização da etapa inicial desse estudo.

Ao amigo, Prof. Dr. Juarez Távora, sempre alto astral e que nunca economizou palavras de estímulo.

Ao Prof. Dr. Mario Mariano que me esclareceu dúvidas com extrema boa vontade.

Ao Dr Max Paape do USDA-Beltsville - EUA, pelos vários esclarecimentos e contatos com outros pesquisadores.

A Dra. Indira Silva da Universidade de Peradeniya no Sri Lanka pelo envio de diversas separatas e esclarecimentos de dúvidas.

A uma dupla muito especial, além de divertida e eficiente, que dividiu comigo muitos quilômetros de estrada, madrugadas no laboratório, no computador e pesquisas: Sandra Kitamura e Andrea Rosenfeld.

A Cláudia Regina Stricagnolo que garantiu a infra-estrutura das colheitas e foi suporte indispensável no processamento das amostras com a sua determinação e competência mantendo um harmonioso ambiente de trabalho.

A dupla Viviani Gomes e Karina Médici que além de toda colaboração no experimento contribuíram com amizade e apoio incondicionais.

A Fernanda Biojone, a primeira a trilhar comigo os caminhos das afecções mamárias dos bubalinos, pela amizade e confiança, além do precioso levantamento bibliográfico e material fotográfico.

À Clara Satsuki Mori pelo apoio e serena competência.

Aos Prof. Dr. Nilson Roberti Benites e Profa. Dra. Elisabeth de Oliveira Costa pelas frutíferas conversas sobre células da glândula mamária.

A pós-graduanda Paula Bastos companheira nos desafios do leite de búfalas.

Ao médico veterinário Fernando Galis, que mesmo ingressando tardiamente à equipe, contribuiu de maneira indispensável.

As funcionárias da biblioteca da FMVZ-USP pelo profissionalismo, cordial atendimento e amizade.

À Harumi, Sandra, Cláudia e Daise pela paciência e grande colaboração em todo período da pós-graduação.

À Adelaide Borges, Maria Alice e Maria Aparecida Freitas pela constante boa vontade, amizade e colaboração.

À Carmem, Creide, Edna, Florência, Marli, Maria Luíza e Maria Helena, sempre solidárias nas épocas mais atribuladas.

Às médicas veterinárias, Fátima, Sabrina e Camila pelo carinho e torcida principalmente nas épocas de maior sobrecarga.

À Clarisse Coelho pela execução do resumo em inglês deste trabalho.

Aos pós-graduandos: Agnes, Alexandre, Alir, Andréia Parra, Carla, Celso, Cláudia, Consuelo, Daniel, Daionete, Gláucia, Heloísa, João, Júlio, Leonardo, Luís, Lillian, Lúcia, Marcelo, Márcia, Meiri, Maria Aparecida, Macau, Maria do Carmo, Marta, Melanie, Paulo Matos, Paulo, Pierre, Ricardo, Rinaldo, Severino, Valdemir, Valéria e Wagner, pelo agradável convívio, troca de conhecimentos e amizade.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP que forneceu condições favoráveis para a execução dessa pesquisa e da minha formação,

À FAPESP pela concessão do auxílio pesquisa, sob responsabilidade do Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel, que incluiu esse estudo.

DELLA LIBERA, A. M. M. P. **Avaliação dos fagócitos no leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) híidas criadas no Estado de São Paulo.** [Evaluation of phagocytes from healthy buffaloes (*Bubalus bubalis*) milk bred in Sao Paulo state]. 2002. 125 f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

O presente estudo teve por objetivo avaliar quantitativa e qualitativamente os fagócitos presentes no leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) híidas criadas nos Estado de São Paulo. Para tal, o experimento foi subdividido em três etapas, designadas capítulos, conforme os objetivos: (1) determinar e estudar a celularidade do leite de búfalas híidas; (2) estabelecer metodologia adequada para a recuperação das células somáticas do leite de búfalas, possibilitando a avaliação *in vitro*; (3) descrever e avaliar as provas de atividade fagocítica das células presentes no leite de búfalas híidas, através de testes de mensuração direta (espraiamento e fagocitose de partículas de Zymosan) e por testes indiretos, que mensuram os metabólitos de oxigênio gerados na “explosão respiratória”. Foram colhidas 132 amostras de leite de 35 búfalas híidas (sem alterações ao exame físico da glândula mamária, bem como resultado da prova de CMT e exame microbiológico negativos). Após as avaliações do CMT, da CCS, da contagem diferencial, da viabilidade celular, do exame bacteriológico, dos testes de fagocitose, de espraiamento e da liberação de peróxido de hidrogênio, concluiu-se que: (1) os resultados das contagens de células somáticas, microscópica e automática, foram semelhantes, mas a predominância celular diferiu conforme a técnica empregada, sendo identificadas percentualmente mais células mononucleares na lâmina de suspensão celular citocentrifugada, e mais polimorfonucleares no leite submetido à técnica de Prescott e Breed; o leite diluído e citocentrifugado permitiu melhor avaliação da morfologia celular sendo identificados: 61,1% de monócitos e macrófagos; 32,9% de neutrófilos; 5,3% de linfócitos e 0,7% de eosinófilos; os fagócitos mononucleares apresentaram uma acentuada plasticidade na estrutura, com variados padrões morfológicos; (2) a baixa celularidade do leite necessitou maiores volumes da amostra mas, o aumento do volume da amostra

aumenta a concentração celular obtida, mas não de forma ilimitada pois pode passar a comprometer a viabilidade das mesmas pelo excesso de manipulação e tempo exigidos pelas amostras mais volumosas; não foi necessária a elicitacão, sendo possível a recuperaçã de 2×10^6 células viáveis/mL de leite de búfalas híidas com 500 mL de leite, no mínimo; (3) os macrófagos aderidos espraíram significativamente, além de apresentarem correlaçã com outro marcador de ativaçã celular, no caso, a liberaçã de peróxido de hidrogênio; mais da metade dos macrófagos aderidos fagocitaram partículas de Zymosan; os fagócitos mantêm sua capacidade de liberar peróxido de hidrogênio, espontaneamente ou não, em grau máximo, com uma significativa variaçã entre amostras.

Palavras-chave: Búfalo. Leite. Leucócitos. Fagocitose. Imunologia.

DELLA LIBERA, A. M. M. P. **Evaluation of phagocytes from healthy buffaloes (*Bubalus bubalis*) milk bred in Sao Paulo state.** [Avaliação dos fagócitos no leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) híidas criadas no Estado de São Paulo]. 2002. 125 f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

The aim of this study was to make a quantitative and a qualitative evaluation of phagocytes from healthy buffaloes (*Bubalus bubalis*) milk bred in Sao Paulo state. For this purpose, the experiment was divided in three parts, called chapters, as specific objectives: (1) establish and study the cellularity of healthy buffaloes milk; (2) establish an adequate method for the recuperation of somatic cells from buffaloes milk, making possible an *in vitro* evaluation; (3) standardize and evaluate the phagocytic activity tests of cells from healthy buffaloes milk, through direct measurement methods (spreading and phagocytosis of Zymosan particles) and indirect methods, which measure the oxygen metabolites from the respiratory burst. Milk samples (n=132) of healthy 35 buffaloes (without alterations on the physical examination of the mammary gland, and also negative results on CMT and microbiologic exams) were obtained. After the evaluations of CMT, SCC, differential cells count, cellular viability, bacteriologic exam, phagocytic tests, spreading and hydrogen peroxide liberation, the conclusions were: (1) the results of somatic cells count, microscopic and automatic, were similar but the cellular predominance differed with the utilized method, being percentually identified more mononuclear cells on slide of cytocentrifugation cellular suspension and more polymorphonuclear on milk submitted to the Prescott and Breed methods; the diluted and cytology by cytocentrifugation of milk permitted a best evaluation of the cellular morphology, being identified: 61.1% of monocytes and macrophages; 32.9% of neutrophils; 5.3% of lymphocytes and 0.7% of eosinophils; mononuclear phagocytes showed a high plasticity on structure with many morphological patterns; (2) a lower cellularity on milk requires higher quantities of the samples but an increase on sample volume increases cellular concentrations obtained, not on an unlimited way because it can compromise the cells viability with the

excess of manipulation and time required by the biggest samples; it was not necessary the elicitation, being possible the recuperation of 2×10^6 viable cells/mL on milk of healthy buffaloes with 500 mL of milk minimum (3) adherent macrophages spreaded and were correlated with hydrogen peroxide release; majority of adherent macrophages phagocyted Zymosan particles; milk phagocytes showered a high oxidative metabolism, undependably of PMA stimulation, but with a great individual variation.

Key words: Buffalo. Milk. Leucocytes. Phagocytosis. Immunology.

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1.1 Contagens automática e microscópica direta, de células somáticas de amostras de leite de búfalas, negativas ao CMT e ao bacteriológico, valores expressos em células/mL – São Paulo – 2002	45
TABELA 1.2 Frequência dos tipos de células somáticas do leite de búfalas negativas à prova do CMT e do exame bacteriológico. Valores relativos (%) obtidos pelas técnicas da microscopia direta e da citocentrifugação – São Paulo – 2002	46
TABELA 1.3 Frequência dos tipos células somáticas do leite de búfalas, negativas à prova do CMT e do exame bacteriológico. Valores relativos (%) obtidos pelas técnicas de microscopia direta e citocentrifugação – São Paulo – 2002	47
TABELA 1.4 Contagem diferencial de células somáticas de suspensões celulares citocentrifugadas extraídas de amostras de leite de búfalas. Resultados expressos em valores absolutos (cel/mL) e relativos (%), em termos de médias, mediana e desvio padrão – São Paulo – 2002	48
TABELA 2.1 Viabilidade média, frequência de obtenção de suspensão com 2×10^6 células lácteas viáveis e medianas do número de células isoladas de leite de búfalas, negativo ao CMT e sem isolamento bacteriano, conforme o volume – São Paulo – 2002	72
TABELA 3.1 Parâmetros funcionais e citológicos das amostras de leite de búfalas, híidas, negativas ao exame microbiológico e CMT – São Paulo – 2002.....	101
TABELA 3.2 Índices de fagocitose, de espraiamento e de liberação de peróxido de hidrogênio, com e sem estimulação <i>in vitro</i> , de células do leite de búfalas híidas. Os resultados foram expressos em mediana, média, desvio padrão e coeficiente de variação – São Paulo – 2002	103
TABELA 3.3 Relações entre as diversas variáveis das amostras dos animais que constituíram o grupo 2 analisadas na suspensão celular de leite de búfalas sadias – São Paulo – 2002.....	104

LISTA DE GRÁFICOS

	Página
GRÁFICO 1.1 Distribuição dos valores das células somáticas diferenciadas em esfregaços citocentrifugadas coradas do leite de búfalas, negativas ao CMT e do exame bacteriológico – São Paulo – 2002	48
GRÁFICO 2.1 Valores médios das freqüências das amostras contendo 2×10^6 células/mL ou mais e da viabilidade celular nos diferentes volumes de leite das amostras colhidas, no leite de búfalas sadias – São Paulo – 2002	72
GRÁFICO 2.2 Relação entre o volume de leite das amostras colhidas (mL) e a concentração de células viáveis ($\times 10^6$ células/mL) na suspensão celular de células de leite de búfalas sadias – São Paulo – 2002	73
GRÁFICO 2.3 Relação entre contagens de células somáticas (células/mL) e a concentração de células viáveis ($\times 10^6$ células/mL) do leite de búfalas sadias – São Paulo – 2002	74

LISTA DE FIGURAS

		Página
FIGURA 1	Fluxograma dos grandes grupos de mecanismos de defesa à invasão bacteriana	24
FIGURA 2	As funções dos macrófagos.	27
FIGURA 1.1	Fotomicrografias de células de amostras de búfalas (<i>Bubalus bubalis</i>) hípidas, identificadas morfológicamente empregando microscopia óptica de imersão (1000x)	49
FIGURA 3.1	Caracterização dos grupos experimentais segundo critérios de inclusão do animal na amostragem e provas realizadas.....	93
FIGURA 3.2	Distribuição no ensaio de determinação da liberação de peróxido de hidrogênio na placa de 96 poços	97
FIGURA 3.3	Fotomicrografia de macrófago lácteo de búfala, aderido e espreado <i>in vitro</i> , com projeções e vacúolos citoplasmáticos. Microscopia óptica de contraste de fase, aumento de 600x	101
FIGURA 3.4	Fotomicrografia de macrófago lácteo de búfala, aderido <i>in vitro</i> , com partículas de Zymosan no interior do citoplasma, indicando fagocitose. Microscopia óptica de contraste de fase, aumento de 600x	101

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	porcentagem
<	menor
>	maior
®	marca registrada
NaOH	hidróxido de sódio
PMA	forbol 12- miristrato 13-acetato
mm	milímetros
SFV	solução de fenol vermelho
MHC	complexo de histocompatibilidade principal
CMT	<i>California Mastitis Test</i>
CCS	contagem de células somáticas
cm ²	centímetros quadrados
µL	microlitro
g	gravidade
FCR	força centrífuga relativa
MD	mediana
N	Normal
PB	Prescott e Breed
mono	mononucleares
poli	polimorfonucleares
nm	nanômetro
mm ²	milímetros quadrados
mm ³	milímetros cúbicos
n	número
MEC	macrófagos-células epiteliais
Graf.	gráfico
IL-1	interleucina-1
NBT	<i>nitrobluetetrazolium</i>
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
NADPH	nicotinamida adenosina-difosfato oxidase
O ₂	oxigênio
O ₂ ⁻	superóxido
SOD	superóxido dismutase
OH ⁻	radical hidroxila
¹ O ₂	oxigênio singleto
HOCl	ácido hipocloroso
Fig.	figura
mL	mililitro
mm	milímetro
°C	grau Celsius
p	nível de significância
pH	concentração hidrogeniônica
r	coeficiente de correlação
Tab.	tabela

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	20
1.1 IMUNOLOGIA DA GLÂNDULA MAMÁRIA – IMUNIDADE CELULAR INATA	23
1.2 IMPORTÂNCIA DOS MACRÓFAGOS NA DEFESA DA GLÂNDULA MAMÁRIA.....	25
1.3 IMPORTÂNCIA DA AVALIAÇÃO FUNCIONAL DOS FAGÓCITOS LÁCTEOS.....	28
2 OBJETIVOS GERAIS	30
3 DIRETRIZES DO MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 ETAPA PADRÃO.....	32
3.1 a Animais empregados nesse estudo.....	32
3.1 b Exame clínico da glândula mamária	32
3.1 b1 Exame físico da glândula mamária.....	33
3.1 b2 Exame do leite.....	33
3.1 c Colheita das amostras de leite.....	33
3.1 d Exame microbiológico das amostras de leite de búfalas.....	35
3.1 e Contagem de células somáticas (CCS) nas amostras de leite de búfalas	35
 CAPÍTULO 1 – CITOLOGIA DO LEITE DE BÚFALAS (<i>Bubalus bubalis</i>) HÍGIDAS CRIADAS NO ESTADO DE SÃO PAULO	
RESUMO	36
1 INTRODUÇÃO	37
2 OBJETIVO	40
3 MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 ETAPA PADRÃO.....	41
3.2 ETAPA ESPECÍFICA.....	41
3.2 a Colheita das amostras de leite.....	41
3.2 b Contagem de células somáticas.....	42

3.2 c	Contagem diferencial de células somáticas (CCS) no leite....	43
3.3	Análise estatística.....	44
4	RESULTADOS	45
5	DISCUSSÃO	50
6	CONCLUSÕES	58
	REFERÊNCIAS	59

CAPÍTULO 2 – ISOLAMENTO DE FAGÓCITOS VIÁVEIS DO LEITE DE BÚFALAS (*Bubalus bubalis*) HÍGIDAS, SEM ELICITAÇÃO, CRIADAS NO ESTADO DE SÃO PAULO

	RESUMO	62
1	INTRODUÇÃO	63
2	OBJETIVO	64
3	MATERIAL E MÉTODOS	64
3.1	ETAPA PADRÃO	64
3.2	ETAPA ESPECÍFICA.....	65
3.2 a	Colheita de amostras de leite.....	65
3.2 b	Isolamento das células do leite.....	66
3.2 c	Concentração e teste de viabilidade por exclusão do azul de tripan.....	68
3.3	Análise estatística.....	69
4	RESULTADOS	70
5	DISCUSSÃO	74
6	CONCLUSÕES	81
	REFERÊNCIAS	82

CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO DOS MACRÓFAGOS LÁCTEOS DE BÚFALAS (*Bubalus bubalis*) HÍGIDAS CRIADAS NO ESTADO DE SÃO PAULO

	RESUMO	84
1	INTRODUÇÃO	85
2	OBJETIVO	91
3	MATERIAL E MÉTODOS	92
3.1	ETAPA PADRÃO.....	92

3.2	ETAPA ESPECÍFICA.....	92
3.2 a	Colheita das amostras e composição dos grupos experimentais.....	92
3.2 b	Preparo da suspensão celular.....	94
3.2 c	Contagem diferencial por citocentrifugação.....	94
3.2 d	Indução de hemólise.....	94
3.2 e	Isolamento dos leucócitos aderentes.....	94
3.2 f	Teste de espraçamento e teste de fagocitose.....	95
3.2 g	Avaliação da liberação de peróxido de hidrogênio.....	96
3.3	Análise estatística.....	99
4	RESULTADOS	100
5	DISCUSSÃO	104
6	CONCLUSÕES	113
	REFERÊNCIAS	114
	REFERÊNCIAS	118
	ANEXOS	123

INTRODUÇÃO

1. Introdução

Existem cerca de 166 milhões de búfalos domesticados sendo criados no mundo, cujas aptidões produtivas vêm se especializando através do adequado emprego da tecnologia (VALE, 2002).

O Brasil possui o nono maior rebanho de bubalinos do mundo com 1,15 milhões de cabeças (FAO, 2001) e, o Estado de São Paulo, possui o sexto rebanho nacional (IBGE, 2000). Sua exploração leiteira e produção de derivados apresentam importância econômica crescente em algumas regiões do país, com produção cada vez mais especializada, contrapondo-se às poucas informações sobre as alterações inflamatórias e/ou infecciosas da glândula mamária de búfalas (COSTA [...], 2000; LÁU [...], 1986), muito estudadas em outras espécies produtoras de leite, principalmente a bovina (CONCHA, 2001; MALLARD [...], 1998).

O leite é composto de vários fatores nutricionais e elementos imunoprotetores solúveis e celulares, capazes de conferir atividade defensiva frente a uma variedade de microrganismos patogênicos (HONÓRIO, 1995). Esse princípio se repete em todos os mamíferos, apesar de doenças que comprometem a glândula mamária, principalmente a mamite, apresentarem extrema importância por superarem as

defesas do hospedeiro e causarem significativos prejuízos econômicos inclusive aos bubalinos cujo leite apresenta composição específica (LÁU, 1994; MACEDO [...], 2001).

Shukla e Supekar (1987) e Láu (1994) referiram serem as búfalas menos susceptíveis à mamite que as vacas embora existam semelhanças quanto aos microrganismos envolvidos na infecção (DHILLON [...], 1995; NAG, 1995; KAPUR; SINGH, 1978; SAINI [...], 1994) e os fatores predisponentes, como a precariedade da higiene na ordenha, falhas na atividade do ordenhador, bem como deficiência no preparo e limpeza dos equipamentos e do estábulo (BADRAN, 1985; FAGLIARI [...], 1989). Outra similaridade entre a ocorrência das mamites em bubalinos e nos bovinos foi demonstrada pela observação do aumento da incidência das mamites com o suceder das lactações (SAINI [...], 1994), sendo os quartos posteriores mais freqüentemente acometidos, talvez pela maior proximidade dos tetos ao solo contaminado pelos excrementos do animal como ressaltaram Behra e Dwivedi (1982).

No Brasil, Vianni [...] (1990) afirmaram que a taxa de prevalência de mamites em búfalas era de 8,81%. Apesar disso, Silva e Silva (1994) consideraram as búfalas mais resistentes às infecções mamárias do que os bovinos, além desses animais apresentarem diferenças quantitativas e qualitativas da celularidade do leite.

Os bubalinos contam com esfíncter do canal do teto (*ductus papilaris*) mais musculoso, com maior quantidade de fibras e vasos sanguíneos que as vacas, podendo funcionar como uma barreira mais eficiente contra as infecções, apesar dos

tetos dos búfalos serem relativamente pendulosos e longos, mais sujeitos às injúrias que os bovinos (LÁU, 1994).

No Brasil, Costa [...] (1997a,b) e Costa [...] (2000) estudaram características das mamites dos bubalinos, e nesse último trabalho, apresentaram o resultado da avaliação de amostras de leite colhidas de 778 búfalas, criadas em 44 propriedades de exploração leiteira em 8 municípios do Estado de São Paulo, destacando que: 1,5% das búfalas apresentavam no mínimo um quarto do úbere acometido por mamite caracterizada por quadro clínico específico (0,44% dos quartos examinados); 18,77% dos animais apresentaram pelo menos um quarto com as manifestações que os autores classificaram como "mamite subclínica" (7,15% dos quartos avaliados) e 1,6% dos animais examinados apresentavam quartos perdidos em consequência de processos infecciosos anteriores.

A freqüência dos processos patológicos da glândula mamária foi considerada por Araújo (1994) e Costa (1991), como sendo diretamente proporcional ao aumento e intensificação da produção leiteira, determinando significativos prejuízos econômicos. Tal observação já houvera sido feita, em bubalinos por Bansal e Singh (1990).

Estudar os mecanismos de defesa da glândula mamária, relacionados à mamite é de extrema importância, mas não poderia ser o único objetivo nas pioneiras pesquisas sobre o assunto no Estado de São Paulo realizadas no Centro de Pesquisa e Diagnóstico de Enfermidades dos Ruminantes (CPDER), pois pouco se conhece sobre os problemas da bubalinocultura de leite, e os búfalos, quer como

animais hígidos ou portadores de enfermidades deveriam ter suas constantes fisiológicas adequadamente avaliadas, sendo importante compreender melhor os mecanismos imunológicos disponíveis na glândula mamária sadia desses animais, a exemplo do que já ocorreu em outras espécies de animais domésticos.

1.1 Imunologia da glândula mamária – imunidade celular inata

O sistema imune foi considerado um sistema complexo e sofisticado que proviria à glândula mamária dos ruminantes de dois mecanismos essenciais de proteção: o primeiro mecanismo destina-se a mobilizar meios para produção de colostro e transferência de imunidade passiva ao neonato e, o segundo, para fornecer proteção contra a mamite (KEHRLI; HARP, 2001).

Dentre as estratégias de defesa da glândula mamária, encontram-se as barreiras físicas (anatômicas e fisiológicas), as respostas inatas ou localizadas e a imunidade específica, também chamada humoral ou adaptativa, que envolve produção de anticorpos mediada por células (TIZARD, 2002) (Fig. 1).

Segundo o que pesquisas específicas de imunologia da glândula mamária estabeleceram, a resposta imune apresenta quatro componentes: 1- células que capturam e processam antígenos; 2- células com capacidade de conjugar e responder aos estímulos dos antígenos e das células sensíveis a esses; 3- células efectoras, produtoras de anticorpos ou que participariam das respostas imunes mediadas por células contra os antígenos e, 4 - descreveram-se células que reteriam a memória do evento e reagiriam rapidamente ao antígeno específico, numa

exposição futura (NICKERSON, 1994; NORCROSS, 1996; MALLARD [...], 1998). Paape [...], (1991) descreveram a defesa celular da glândula mamária dos bovinos através da atividade de dois grupos de leucócitos: os linfócitos, consistindo de células dos tipos B e T, com função de imunidade humoral e mediada por células; e os fagócitos, neutrófilos e macrófagos, que entre outras funções, fagocitam e destroem patógenos causadores de processos inflamatórios da mama.



Figura 1- Fluxograma dos grandes grupos de mecanismos de defesa à invasão bacteriana.

Os fagócitos, segundo Tizard (2002), distribuiriam-se basicamente em dois sistemas complementares: sistemas mielóide e mononuclear fagocitário. Os neutrófilos pertenceriam ao primeiro, e os monócitos e macrófagos ao segundo. Os neutrófilos, com ação mais fugaz, seriam degradados após a fagocitose, enquanto as células do sistema mononuclear fagocitário, com ação mais lenta, seriam habilitadas a executarem repetidas fagocitoses, liberando estímulos seguidos de apresentação de antígeno às células mielóides, para que houvesse a deflagração da resposta imune.

Apesar de serem células diferentes, macrófagos e neutrófilos, e de ainda possuírem subgrupos, os fagócitos apresentam algumas características comuns, que os dotariam de mecanismos tanto dependentes, como independentes de oxigênio (CHAMPE; HARVEY, 1996; TIZARD, 2002). A busca de esclarecimentos sobre os mecanismos específicos de quimiotaxia e fagocitose, levou ao estudo destes processos e sua manipulação direta *in vitro* (PAAPE [...], 1991).

Os mecanismos imunológicos inatos, precedem os adaptativos e são principalmente representados pela resposta celular da qual os macrófagos são os responsáveis por mecanismos precursores.

1.2 Importância dos macrófagos na defesa da glândula mamária

Os monócitos sanguíneos foram definidos como sendo as células precursoras dos macrófagos teciduais. Na circulação sanguínea, os monócitos

permaneceriam ativos durante três dias, antes de penetrarem nos tecidos orgânicos, tornando-se macrófagos. Essas células tissulares poderiam em algumas circunstâncias resultar de sua proliferação nesses tecidos. No leite, foram encontradas e descritas células da linhagem completa de monócito-macrófago (JENSEN; EBERHART, 1981; LEE [...], 1980; ÖSTENSSON, 1993).

Segundo Elgert (1996), os macrófagos seriam células com múltiplas funções, algumas dessas precursoras dos demais mecanismos imunológicos, pois fagocitam e apresentam antígenos, bem como, intermediam a função de outras células. O conjunto formado pelo macrófago, antígeno e antígeno de histocompatibilidade classe II, seria então reconhecido pelos linfócitos T auxiliares, que a partir de então, liberariam interferon gama, ativando outros macrófagos e estimulando a destruição de patógenos intracelulares (MENDES, 1996).

Os macrófagos foram considerados secretores de vários fatores biologicamente importantes como: C2; C3; C4; C5; lisozima; colagenase; elastase e liberadores de plasminogênio. Regulariam e também definiriam respostas imunitárias pela ação de glicoproteínas reguladoras (monocinas) como o interferon e a interleucina 1, como também pelas prostaglandinas e leucotrienos (CONCHA; HOLMBERG, 1990; ELGERT, 1996; KEHRLI; HARP, 2001; POLITIS [...], 1991a; POLITIS [...], 1991b; POLITIS [...], 1991c; POLITIS [...], 1992) (Fig.2). Muitos desses fatores, comprovadamente variariam suas concentrações nos fluidos orgânicos das vacas, na dependência de fatores individuais, interferindo na capacidade de estimulação dos leucócitos (RAINARD; POUTREL, 2000). Ressalta-se,

todavia, que semelhantes observações foram escassamente pesquisadas e determinadas na glândula mamária e na secreção láctea de bubalinos.

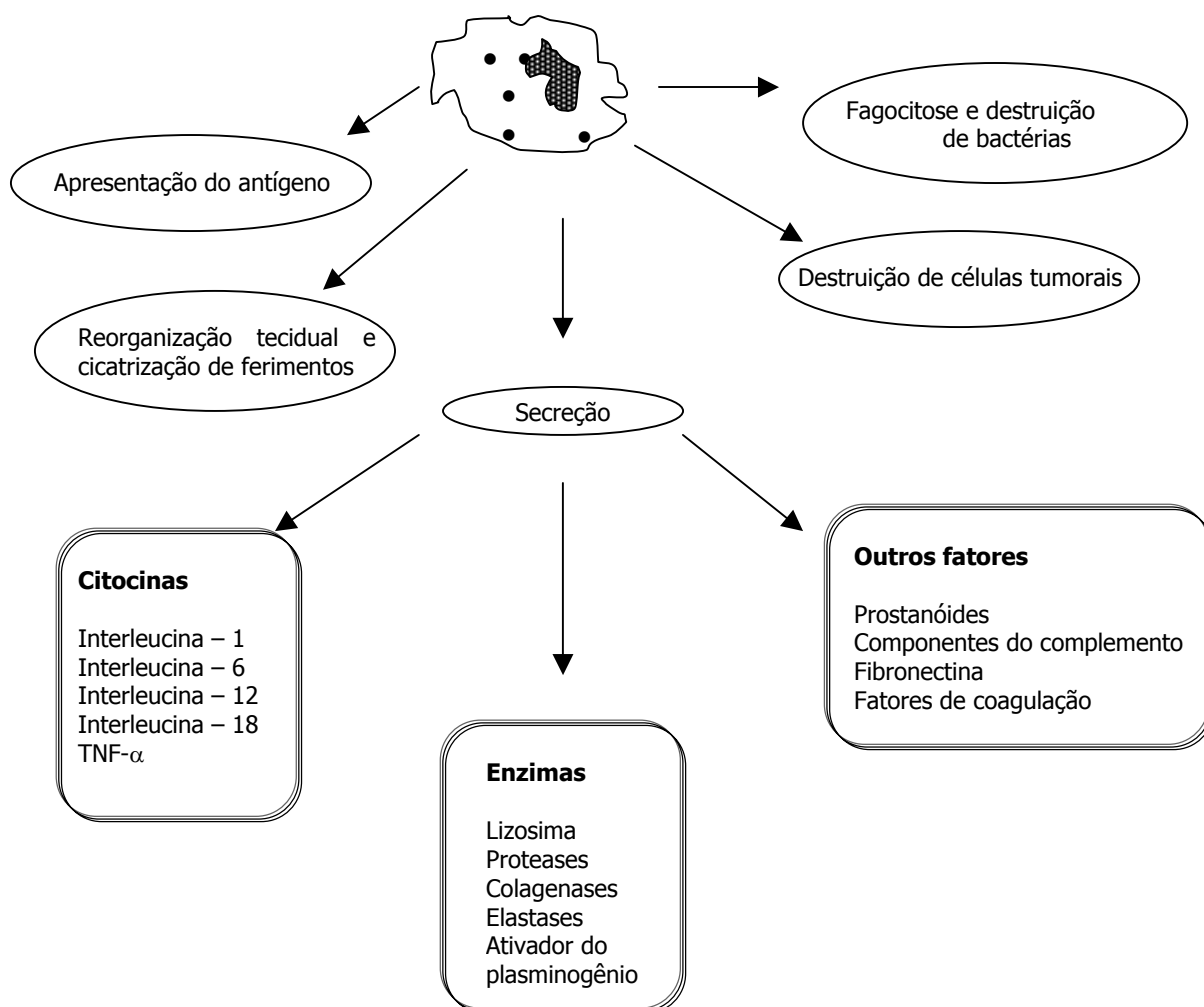


Figura 2 – As funções dos macrófagos.
Fonte: Tizard (2002)

1.3 Importância da avaliação funcional de fagócitos lácteos

Em pesquisas preliminares foram reconhecidas a necessidade e importância da padronização de metodologias que pudessem permitir o reconhecimento e a compreensão dos mecanismos imunes presentes na glândula mamária (SEARS [...], 1993). A necessidade do perfeito entendimento da patogenia das inúmeras enfermidades da mama foi acompanhada da crescente importância que a imunologia clínica recebeu dos veterinários responsáveis pela saúde animal. Dessa forma, freqüentemente os métodos imunológicos têm sido utilizados como exames complementares ao diagnóstico diferencial dessas doenças, colaborando também no acompanhamento da evolução de diferentes quadros clínicos, propiciando o estabelecimento de seus prognósticos e contribuindo na definição dos tratamentos e, às vezes, avaliando sua eficácia.

No que diz respeito à glândula mamária, a avaliação funcional dos fagócitos também tem permitido investigar a eficiência das células da glândula que possam se envolver na inibição de mecanismos de defesa e mesmo, orientar estratégias imunomoduladoras para aumentar os mecanismos imunes da glândula mamária de bovinos (CONCHA, 2001; HU [...], 1995; SORDILLO [...], 1997). Os procedimentos de imunologia clínica devem ser considerados incipientes em clínica de ruminantes, principalmente quando se referir aos bubalinos. Por tal razão foi considerado fundamental descrever as características básicas do leite de búfalas híginas para então estabelecer os padrões de referência dos parâmetros constituintes da secreção láctea em diferentes enfermidades da glândula mamária, determinando como elas

ocorrem, como evoluem, como devem ser avaliadas para o estabelecimento do diagnóstico clínico e como poder-se-ia interferir na evolução pelo uso do tratamento adequado. Dentre as formas de avaliação da função dos fagócitos, temos como exemplo: a determinação da capacidade de fagocitose; a avaliação da liberação de mediadores inflamatórios; a expressão de antígenos do complexo de histocompatibilidade principal - MHC classe II (SORDILLO [...], 1997), o isolamento e identificação de substâncias secretadas pelos fagócitos (como citocinas e interferon); a capacidade de estimular linfócitos e a propriedade de aderência do macrófago ao vidro (CONCHA, 2001; ELGERT, 1996; JENSEN; EBERHART, 1981; NONNECKE; KEHRLI, 1985).

Sobre a função de fagócitos e a possibilidade de avaliá-la, a literatura poderia ser considerada como inconclusiva nos aspectos envolvendo os mecanismos de imunidade celular inata de bubalinos, como também pela não existência de pesquisas específicas sobre a avaliação funcional dos fagócitos mononucleares ou mesmo de técnicas que por testes de mensuração direta (espraiamento e fagocitose de partículas de Zymosan) ou indireta poderiam quantificar os metabólitos de oxigênio gerados na "explosão respiratória".

2. Objetivos gerais

O objetivo precípua deste projeto de pesquisa é o de avaliar os fagócitos presentes no leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) híidas criadas nos Estado de São Paulo, utilizando para tanto, o seguinte delineamento:

- determinar e estudar a celularidade do leite de búfalas híidas;
- estabelecer metodologia adequada para recuperação das células somáticas de leite de búfalas possibilitando, a avaliação dessas células *in vitro*, sem prévia elicitación;
- descrever e avaliar as provas de atividade fagocítica das células presentes no leite de búfalas híidas, por testes de mensuração direta (espraiamento e fagocitose de partículas de Zymosan) e por testes indiretos, que mensuram os metabólitos de oxigênio gerados na “explosão respiratória”.

3. Diretrizes do material e métodos

Para facilitar a compreensão e o cumprimento dos objetivos pré-estabelecidos, esta tese foi delineada para ser apresentada em três capítulos, conforme as metas a seguir detalhadas:

- **Capítulo 1** - Citologia do leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) híidas criadas no Estado de São Paulo.
- **Capítulo 2** - Isolamento de fagócitos viáveis do leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) híidas, sem elicitacão, criadas no Estado de São Paulo.
- **Capítulo 3** – Avaliação da função dos macrófagos de amostras de leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) híidas, criadas no Estado de São Paulo.

O planejamento proposto para esta pesquisa dividiu a metodologia em duas etapas. A primeira foi denominada “Etapa Padrão” e compreendeu os critérios de inclusão amostral e as técnicas preliminarmente padronizadas.

A segunda etapa designada de “Etapa Específica”, incluiu os procedimentos descritos na “Etapa Padrão” aos quais, foi-se gradualmente incluindo os procedimentos necessários em seus respectivos capítulos.

As análises foram realizadas nos laboratórios de pesquisas do Departamento de Clínica Médica da FMVZ/USP.

3.1. Etapa Padrão

a. Animais empregados nesse estudo

Na presente pesquisa foram analisadas amostras de leite colhidas de 35 búfalas, totalizando 132 amostras (uma amostra de cada quarto do úbere) distribuídas distintamente nos capítulos subseqüentes. Os animais pertenciam à raça murrâh, em lactação, sendo mantidas em rebanhos produtores de leite do Estado de São Paulo (municípios de Pirassununga, Santa Rita do Passa Quatro, São Carlos e Natividade), que não tinham sido submetidas ao tratamento para mamite nos últimos 30 dias.

b. Exame clínico da glândula mamária

A avaliação clínica das búfalas lactantes foi realizada por exames semiológicos, tanto físicos da glândula mamária, como também celulares e microbiológico do leite (BIRGEL, 1982). Nesse estudo incluíram-se apenas as amostras colhidas dos quartos mamários de búfalas pré-selecionadas, cujo exame clínico da mama e do leite demonstrou-se sem alterações.

b 1. Exame físico da glândula mamária

Os quartos da glândula mamária das búfalas incluídas nesta pesquisa foram avaliados por inspeção e palpação, examinando-se o parênquima, tetos e estruturas internas (*ductus papilaris*, *sinus papilaris* e *sinus lactifer*).

b 2. Exame do leite

- **Exame físico-químico do leite** - Após o exame físico da glândula mamária, foram avaliadas as características organolépticas, macroscópicas da secreção láctea, primeiramente pela prova da caneca telada ou de fundo escuro, segundo Birgel (1982), observando-se cor e consistência da secreção e a presença de massas ou grumos.
- **Prova do CMT** (SCHALM; NOORLANDER, 1957) – para realizar essa prova foram misturados 2 mL de reagente¹ a 2 mL de leite, verificando a intensidade da alteração da viscosidade da mistura. As amostras que na avaliação do teste demonstraram significativas alterações de viscosidade na mistura, independentemente à intensidade, não foram incluídas nesse estudo.

c. Colheita de amostras de leite

Após o exame clínico e a caracterização das amostras que corresponderam aos pré-requisitos experimentais (sem alterações ao exame clínico da glândula mamária), as colheitas foram realizadas no início da ordenha da manhã.

¹ CMT Fatec®

A primeira amostra foi colhida assepticamente, para tanto o úbere era inicialmente higienizado, retirando-se as sujidades depositadas sobre a pele da glândula e dos tetos, com papel toalha. Posteriormente, mergulhava-se cada teto em solução fraca de anti-séptico, sendo a seguir, os tetos secos com folhas individuais descartáveis de papel toalha, para finalmente, fazer-se a anti-sepsia do teto, friccionando um chumaço de algodão embebido em álcool 70%, principalmente no óstio do *ductus papilaris*. A amostra de leite foi colhida em frasco estéril, que no momento da colheita era inclinado, formando um ângulo de 90° graus em relação ao teto, para evitar assim, a entrada de qualquer sujidade que pudesse contaminar a amostra; o frasco no momento da colheita permanecia aberto por no máximo 5 segundos, de acordo com as recomendações do *National Mastitis Council* (HARMON [...], 1990). As amostras foram transportadas sob refrigeração ao laboratório e destinadas ao exame bacteriológico.

A segunda amostra da “Etapa Padrão” foi colhida em frasco contendo como conservante o bronopol e destinou-se a contagem automática de células somáticas.

Após a colheita das amostras de leite destinadas ao exame bacteriológico, colheu-se as amostras para a avaliação da função dos fagócitos que, dependendo da fase do experimento, empregou metodologia específica, conforme descrito na “Etapa Específica”, dos capítulos.

d. Exame bacteriológico das amostras de leite de búfalas

As amostras de leite colhidas assepticamente foram semeadas em placas de Petri contendo ágar-sangue de carneiro (5%) e incubadas (37° C por 24 e 48 horas). Apenas as amostras negativas foram consideradas, para serem submetidas ao conjunto de provas incluídas na metodologia pré-selecionada.

e. Contagem de células somáticas (CCS) nas amostras de leite de búfalas

Além da avaliação indireta da contagem de células somáticas pelo CMT, a contagem dessas células foi diretamente determinada por contagem em contador eletrônico infravermelho².

² Bentley 2000; Análises realizadas no Programa de Análise de Rebanhos Leiteiros, Curitiba-PR.

CAPÍTULO 1

Capítulo 1

Citologia do leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) híginas criadas no Estado de São Paulo

Resumo

A interpretação das avaliações quantitativas e qualitativas das células presentes no leite foi considerada de extrema valia para a compreensão de diversos processos, fisiológicos ou não da glândula mamária. Essas informações, além de raras em relação à glândula mamária de búfalas sadias, foram conflitantes. Nesse trabalho, avaliou-se a celularidade do leite de búfalas híginas criadas no Estado de São Paulo. Para tanto, foram colhidas amostras de 108 quartos mamários de búfalas híginas em lactação, provenientes de diferentes criatórios, submetendo-as à contagem automática e por microscopia óptica, das células somáticas (CCS), verificando a predominância celular em lâminas de esfregaço de leite como também após citocentrifugação da suspensão celular, com avaliação citológica diferencial desses preparados. Os resultados das contagens de células somáticas do leite, por técnicas microscópica e automática foram semelhantes, mas a predominância celular diferiu conforme a técnica empregada, pois em valores relativos foram, identificadas mais células mononucleares nas lâminas de suspensão celular citocentrifugada, e mais leucócitos polimorfonucleares quando se utilizou a técnica de Prescott e Breed. A lâmina de citocentrifugação de amostras de leite de búfalas permitiu melhor avaliação da morfologia celular sendo identificados 61,1% de monócitos e macrófagos; 32,9% de neutrófilos; 5,3% de linfócitos e 0,7% de eosinófilos. Os fagócitos mononucleares apresentaram uma acentuada plasticidade de suas estruturas, com variados padrões morfológicos.

1. Introdução

As células presentes no leite poderiam, em várias circunstâncias, representar a existência de alterações na glândula mamária das mais diversas ordens, quer sejam fisiológica ou patológica (DULIN [...], 1982; PAAPE [...], 2000; SANDGREN [...], 1991).

Em bovinos, o aumento da celularidade do leite observado diretamente pela contagem de células somáticas (CCS) ou indiretamente por meio de provas como o *California Mastitis Test* (CMT), foi consagrado como indício de inflamação (PAAPE [...], 1991; SCHALM [...], 1971; VIANNI [...], 1990), sendo tal fato também considerado para bubalinos (RANUCCI [...], 1988; SILVA [...], 1996). As células responsáveis por esse aumento de celularidade láctea derivariam predominantemente da circulação sangüínea e, apesar de serem mobilizadas principalmente quando houver estímulos específicos ao parênquima mamário, muitas delas foram observadas em condições fisiológicas normais e representariam um recurso permanentemente disponível para a eventual necessidade de defesa orgânica da glândula mamária.

Schalm [...] (1971) descreveram no leite de vacas a presença de dois grupos de células epiteliais (vacuolizadas e não vacuolizadas), neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos, grande célula escamosa, além da presença de debris de células epiteliais, núcleos livres e corpúsculos de colostro, também denominado de corpúsculos de Niessen, esse último, apenas na fase colostrálica da secreção láctea.

Esses autores, compilando a literatura da época, consideraram as células epiteliais como predominantes no leite normal.

Jensen e Eberhart (1981), Lee [...] (1980) e Östensson (1993) justificaram a importância do exame diferencial das células do leite de bovinos na interpretação da condição inflamatória, pois a presença ou predomínio de uma determinada célula representaria a necessidade específica da função celular por ela exercida. Cunha (1988) e Östensson (1993) procuraram em suas pesquisas determinar possíveis variações que pudessem ocorrer durante a lactação, entre as ordenhas ou nas diferentes fases dessas, enquanto Kelly [...] (2000) consideraram que a contagem diferencial das células do leite seria um importante indício das condições imunológicas do tecido mamário, bem como eficiente complementação para o diagnóstico clínico das mamites, e assim sendo, representaria um importante sinal de qualidade do leite dos bovinos.

Os leucócitos representariam significativo elo na imunidade celular da glândula mamária e os polimorfonucleares neutrófilos seriam os mais importantes agentes de defesa orgânica nas inflamações agudas, sendo suas principais funções: a fagocitose e a atividade microbicida. Os macrófagos originários dos monócitos sanguíneos constituiriam a forma mais evoluída do sistema mononuclear fagocitário, podendo ser encontradas na secreção láctea, todas as formas evolutivas dessa série celular (monócito/macrófago). Além de fagocitar, essas células reconheceriam os antígenos, apresentando-os aos linfócitos e liberando mediadores dos processos inflamatórios, que teriam significativa ação na evolução da inflamação, realizando a atração dos polimorfonucleares – neutrófilos para o foco do processo (ELGERT,

1996). Os linfócitos, células não fagocíticas da glândula mamária, estariam relacionados à resposta imune mediada por células (linfócitos-T) ou como precursores de anticorpos (linfócitos-B). A atuação das células epiteliais das cisternas da glândula mamária tanto do *sinus papilaris* como *lactíferos* nos processos inflamatórios foi considerada ambígua, pois houve descrição delas, inclusive fagocitando partículas (SCHALM [...], 1971).

Em pesquisas realizadas com bubalinos, Silva e Silva (1994) inferiram serem as búfalas mais resistentes às infecções da glândula mamária do que os bovinos e apresentarem diferenças quantitativas e qualitativas da celularidade do leite desses dois espécimes de ruminantes. Dhakal [...] (1992) ao realizarem a contagem diferencial de células somáticas no início e no fim da ordenha de búfalas sadias, descreveram um predomínio de células epiteliais sobre as demais (polimorfonucleares neutrófilos e mononucleares linfócitos e monócitos). Nos casos de amostras de leite proveniente de búfalas acometidas por mamite e daquelas portadoras de processos inflamatórios inespecífico (CCS > 500.000 células/mL e cultura bacteriológica negativa), tanto no início, como no final da ordenha, os mencionados pesquisadores acima referiram predomínio de polimorfonucleares neutrófilos, seguidos de linfócitos, células epiteliais e monócitos. Nas infecções latentes (CCS < 500.000 células/mL e exame microbiológico positivo) também houve predomínio de neutrófilos embora esse valor fosse menor do que o obtido nas amostras de búfalas acometidas por mamites. Paradoxalmente, os autores sugeriram que o pequeno número de células somáticas não indicaria necessariamente leite obtido de glândula mamária livre de mamite.

Silva e Silva (1994) avaliaram a celularidade do leite de diversas raças de búfalos criados no Sri Lanka e relataram que nas amostras de leite consideradas normais (CMT negativo e valores médios de pH de 6,58), a contagem de células somáticas total variou de 50.000 a 375.000 células/mL, sendo leucócitos do tipo polimorfonuclear neutrófilo as células predominantes, apresentando maior número relativo (56%) do que o obtido no leite de vacas, a seguir, em ordem decrescente destacaram os linfócitos (28%), macrófagos (8%), células epiteliais (5%) e os polimorfonucleares eosinófilos (1%). Concluindo esses pesquisadores afirmaram a ocorrência de maior número de polimorfonucleares neutrófilos disponíveis para combater patógenos no leite de búfalas sadias do que no leite das vacas.

Guarino [...] (1994) consideraram que as células que predominavam no leite oriundo de glândulas mamárias não infectadas, independentemente da fase da lactação, eram os macrófagos e esses poderiam ser encontrados no leite dos bubalinos em três principais formas: 1- células espumosas; 2- em forma de anel; 3- como monócitos comuns.

2. Objetivo

Avaliar quantitativa e qualitativamente a celularidade de amostras de leite de quartos mamários de búfalas híidas criadas no Estado de São Paulo, comparando as técnicas empregadas.

3. Material e métodos

3.1 Etapa Padrão

A Etapa Padrão seguiu a metodologia proposta nas diretrizes do material e métodos, tendo sido colhidas para o presente estudo 108 amostras de leite de 28 búfalas cujos quartos mamários atendiam aos pré-requisitos clínicos, descritos nas diretrizes do material e métodos, incluindo o exame bacteriológico e à contagem de células somáticas do leite anteriormente descritos (vide página 31).

3.2 Etapa Específica

a. Colheita das amostras de leite

Cada amostra foi colhida em quatro alíquotas, duas foram descritas na etapa padrão e destinavam-se ao exame bacteriológico e a contagem automática de células somáticas.

A terceira alíquota foi colhida em frasco plástico do tipo transurina e destinava-se a CCS microscópica direta (PRESCOTT; BREED, 1910).

A quarta alíquota destinava-se à contagem diferencial de células somáticas e foi colhida em frasco plástico, cujo conteúdo era imediatamente filtrado em gaze estéril e transferido para frasco de polipropileno tipo Falcon, também estéril, com capacidade para 50 mL, já contendo 25 mL de PBS gelado.

b. Contagem de células somáticas (CCS)

Além da avaliação indireta da contagem de células somáticas pelo CMT, a contagem dessas células foi determinada em contador eletrônico infravermelho¹ (etapa padrão) e por microscopia direta empregando a técnica de Prescott e Breed (1910).

Para a contagem celular direta por microscopia, como preconizada no método de Prescott e Breed (1910), utilizou-se a seguinte técnica: 10 μ L de leite era distendido numa área de 1 cm^2 em lâmina de vidro previamente limpa e desengordurada, a seguir o esfregaço de leite era secado, em temperatura ambiente, apoiada numa superfície plana e protegida por 12 a 24 horas. Após a secagem, a lâmina era fixada em metanol por 10 minutos e, a seguir escorridas e seca, para ser submetida à coloração de Rosenfeld (1947). No processo de coloração o esfregaço de leite era coberto com 1 mL da solução corante, adicionando-se 2 mL de água Milli-Q; homogeneizava-se a solução corante/água e aguardava-se 10 minutos para lavar a lâmina com água destilada. Após secar-se completamente o esfregaço corado, foram contadas as células presentes em 100 campos visuais, usando uma objetiva de imersão (100x e objetiva 10x). Para obtenção do resultado final multiplicava-se o número de células contadas pelo fator do microscópio previamente calculado (BIRGEL, 1982) expressando-se o resultado em número de células por mL de leite.

¹ Bentley 2000; Análises realizadas no Programa de Análise de Rebanhos Leiteiros, Curitiba-PR.

c. Contagem diferencial de células somáticas (CCS) do leite

- Contagem diferencial em lâmina: técnica de Prescott e Breed

Ao se fazer contagem total de células do leite pela técnica de Prescott e Breed, elas foram diferenciadas e categorizadas em mononucleares e polimorfonucleares, tendo seus valores relativos calculados e expressos em porcentagem (SCHALM [...], 1971).

- Contagem diferencial pela técnica da citocentrifugação

Nas amostras de leite destinado à contagem diferencial pela técnica da citocentrifugação as células foram inicialmente separadas por centrifugação com força centrífuga relativa (FCR) igual a 450 g, durante 20 minutos em refrigeração de 4°C. O sobrenadante mais viscoso, na fase de separação entre a fração líquida e o ambiental da amostra, constituído principalmente de gordura, era retirado com um auxílio de uma espátula ou simplesmente, pelo seu descolamento de suas bordas do frasco, antes da reversão do conteúdo líquido e gorduroso do frasco.

Após desprezar a fração sobrenadante invertendo-se o frasco uma única vez, mantinha-se o frasco invertido, sendo os lados do frasco limpos com papel macio e absorvente. Dessa forma restava apenas o botão de células decantado no fundo do frasco. Subseqüentemente, esse botão de células era desprendido do frasco pela aspensão, em fracos jatos de PBS, sendo então o conteúdo homogeneizado, completando-se o volume com PBS refrigerado (refazendo o volume primitivo de 50 mL). A suspensão era novamente centrifugada, nas condições já mencionadas, e o sobrenadante desprezado e o botão de células ressuspendido em 1mL de meio

enriquecido (RPMI 1640), melhorando assim as condições de sua preservação.

Alíquotas de 200 μ L da suspensão celular do leite de búfalas preparadas como descrito anteriormente foram submetidas a citocentrifugação² a uma força centrífuga relativa (FCR) de 28 g durante 6 minutos. Com o sedimento confeccionavam-se, em duplicatas que eram coradas, posteriormente, pelo método de Rosenfeld (1947) como já foi descrito. Os esfregaços de leite corados eram examinados em microscopia de campo claro, com magnitude de 1000x, observando-se a qualidade e os tipos celulares predominantes, realizando-se assim a contagem diferencial das células somáticas do leite de búfalas. Os resultados para os diferentes tipos celulares foram expressos em valores relativos (em porcentagem).

Foram colhidas amostragens dos sobrenadantes, após as centrifugações para obtenção da suspensão celular. Estas foram novamente citocentrifugadas para avaliar a perda de células durante o preparo da suspensão celular.

3.3 Análise estatística

Os resultados obtidos segundo as variáveis estudadas foram, inicialmente, submetidos ao teste estatístico de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Por apresentarem distribuição paramétrica os valores relativos de mononucleares e polimorfonucleares obtidos pela da técnica de Prescott e Breed (1910), bem como as determinadas por citocentrifugação da suspensão celular, as comparações estatísticas puderam ser submetidas à análise de variância e as diferenças avaliadas pelo teste de Duncan (SAMPAIO, 1998).

² CITOSPIN, INCIBRAS®

As contagens de células somáticas apresentaram distribuição não-paramétrica sendo então as comparações pareadas estabelecidas pelo método de Wilcoxon e seus valores foram expressos como mediana. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software estatístico SAS (2001), complementarmente foram calculados as médias e valores percentuais dos tipos de células identificados nas lâminas de citocentrifugação do leite de búfalas.

4. Resultados

As medianas das contagens de células somáticas do leite de búfalas criadas no Estado de São Paulo determinada por contagem automática em contador eletrônico infravermelho e por microscopia óptica segundo técnica de Prescott e Breed (1910) foram, respectivamente 13.000 células/mL e 18.000 células/mL. Não se demonstrou, entre esses valores diferenças significativas ($p > 0,31$) quando submetidas à avaliação pelo método de Wilcoxon (Tab. 1.1).

Tabela 1.1 – Contagens automática e microscópica direta, de células somáticas de amostras de leite de búfalas, negativas ao CMT e ao exame bacteriológico, valores expressos em células/mL - São Paulo – 2002

	Contagem de células somáticas	
	Células/mL	
	Automática	Microscopia direta
Valores de mediana	13000	18000
nº de amostras	73	73
Significância	$p > 0,31$	

As freqüências de células mononucleares e polimorfonucleares expressos em valores relativos, identificadas no leite de búfalas pela técnica de Prescott e Breed,

não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p>0,5$) e entre os mesmos valores relativos determinado pela técnica de citocentrifugação demonstraram diferenças estatisticamente significativas ($p<0,0001$; Tab. 1.2).

Tabela 1.2 – Frequência dos tipos de células somáticas do leite de búfalas negativas à prova do CMT e do exame bacteriológico. Valores relativos (%) obtidos pelas técnicas de microscopia direta e citocentrifugação – São Paulo – 2002

	Distribuição segundo os tipos celulares			
	Microscopia direta		Citocentrifugação	
	Mononucleares	Polimorfonucleares	Mononucleares	Polimorfonucleares
	%	%	%	%
Média	51,6 ^a	48,4 ^a	66,4 ^a	33,6 ^b
Desvio padrão	$\pm 27,0$	$\pm 27,0$	$\pm 19,0$	$\pm 19,0$
n° de amostras	70	70	108	108
Significância	$p>0,5$		$p<0,0001$	

Na avaliação da citocentrifugação da suspensão celular observou-se um valor relativo médio, expresso em porcentagem de células mononucleares maior do que o obtido por microscopia direta em campo claro pela técnica de Prescott e Breed sendo a diferença estatisticamente significativa ($p<0,0001$). Por outro lado os valores relativos médios de células polimorfonucleares verificados por microscopia direta foram significativamente maiores por citocentrifugação ($p<0,0001$; Tab. 1.3).

Tabela 1.3 – Frequência dos tipos de células somáticas do leite de búfalas negativas à prova do CMT e do exame bacteriológico. Valores relativos (%) obtidos pelas técnicas de microscopia direta e da citocentrifugação – São Paulo – 2002

	Predominância celular			
	Mononucleares		Polimorfonucleares	
	Microscopia direta	Citocentrifugação	Microscopia direta	Citocentrifugação
Média	51,6 ^b	66,4 ^a	48,4 ^a	33,6 ^b
Desvio padrão	+27,0	+19,0	+27,0	+19,0
nº de amostras	70	108	70	108
Significância	p < 0,0001		p < 0,0001	

A partir da identificação e contagem de 400 células somáticas de búfalas em esfregaços de suspensão celular citocentrifugada, calculou-se as médias e os desvios padrão das seguintes células: mononucleares monócitos/macrófagos e linfócitos; bem como polimorfonucleares neutrófilos e eosinófilos. Destaca-se que estas últimas células não apresentaram distribuição normal e por isso o resultado foi expresso em mediana e dois desvios padrão. Os resultados avaliados neste item foram expressos com valores absolutos e relativos (Tab. 1.4).

Para ilustrar a grandeza desses percentuais, foram apresentados os valores médios em porcentagens (Graf. 1.1), assim como as fotomicrografias de suspensão celular citocentrifugada apresentando as células identificadas (Fig. 1.1).

Tabela 1.4 – Contagem diferencial de células somáticas de suspensões celulares citocentrifugadas de amostras de leite de búfalas. Resultados expressos em valores absolutos (cel/mL) e relativos (%), em termos de média, mediana e desvio padrão – São Paulo – 2002

	Contagem diferencial de células somáticas do leite			
	macrófagos/monócitos	Neutrófilos	Linfócitos	Eosinófilos
Val. absolutos	244,65	131,51	21,14	-
Desvio padrão	(±72,96)	(±76,07)	(±19,28)	-
Média - valores relativos (%)	61,1	32,9	5,3	0,7
Mediana	-	-	-	0,00 (0 – 8)
n° de amostras	108	108	108	108

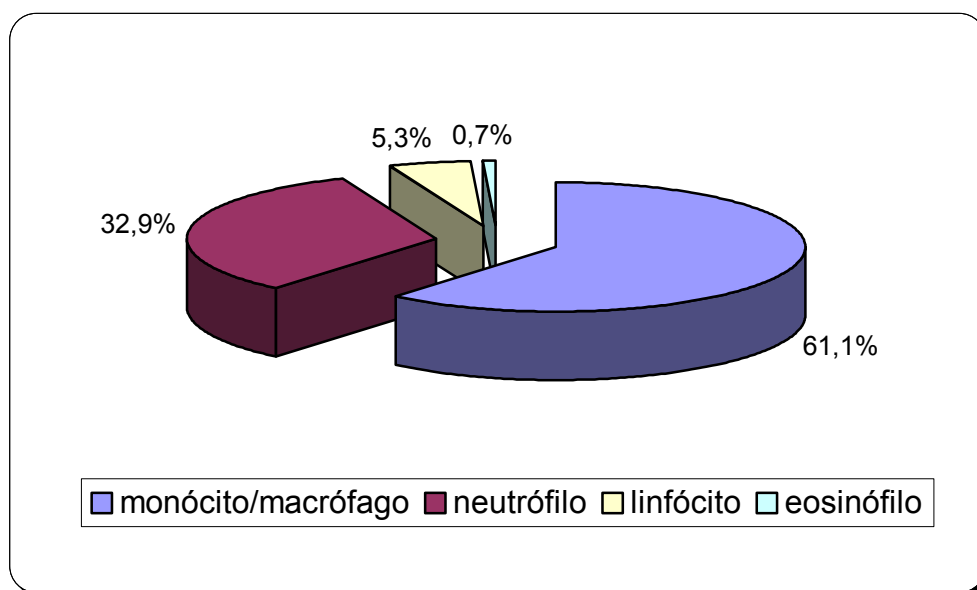
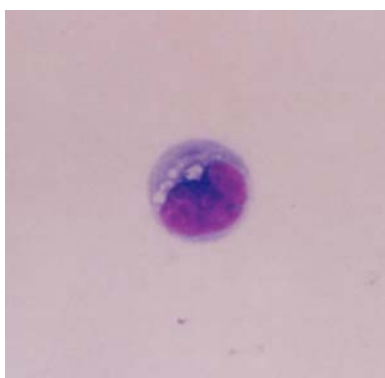
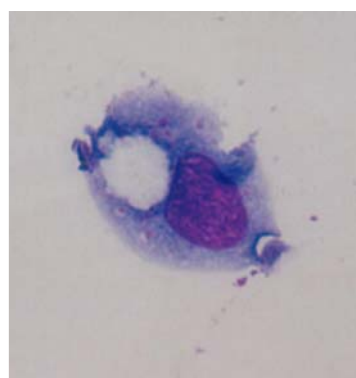


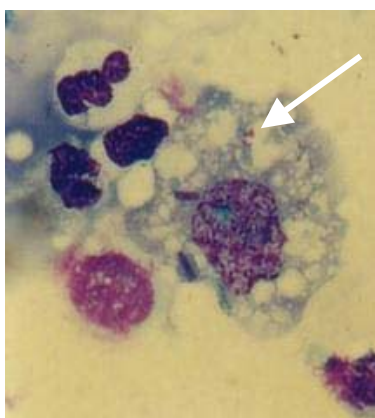
Gráfico 1.1 – Distribuição dos valores das células somáticas diferenciadas em esfregaços citocentrifugados corados do leite de búfalas negativa à prova do CMT e do exame bacteriológico.



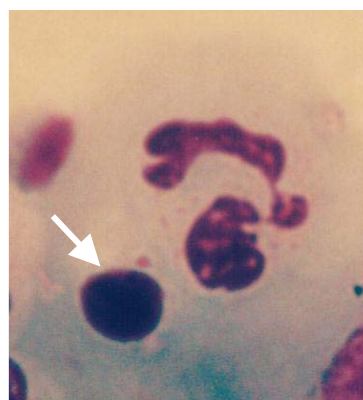
a) Monócito



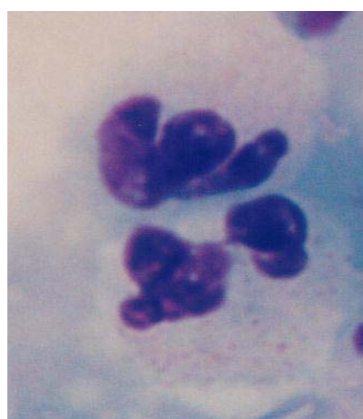
b) Macrófago com vacúolo



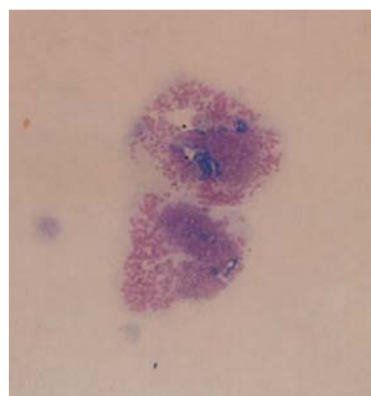
c) Macrófago vacuolizado tipo espumoso (seta)



d) Linfócito (seta)



e) Polimorfonucleares – Neutrófilos



f) Eosinófilos

Figura 1.1 – Fotomicrografias de células de amostras de búfalas (*Bubalus bubalis*) hígdas, identificadas morfológicamente empregando microscopia óptica de imersão (1000x).

Cabe ao final do capítulo, destacar que entre as amostras avaliadas e processadas em 50 sobrenadantes dos citocentrifugados de leite de búfalas, realizou-se minuciosa verificação para detectar a presença de células somáticas que porventura não tivessem sido separadas e sedimentadas no fundo do frasco formando após a centrifugação o botão celular (sedimento). Nesses 50 casos não foram observadas células nos sobrenadantes das duas centrifugações, que integram essa técnica de separação celular.

5. Discussão

As técnicas utilizadas para as avaliações celulares devem ser consideradas junto aos resultados obtidos, pois as limitações dessas podem interferir nas conclusões do examinador (DULIN [...], 1982; SANDGREN [...], 1991; SCHALM [...], 1971).

Nas principais espécies produtoras de leite, inclusive na bubalina, a contagem de células somáticas acompanhou, praticamente, a evolução significativa dos resultados obtidos em bovinos. Ressaltou-se que na bibliografia compulsada, que o desenvolvimento obtido tem se revestido de importância crescente como exame subsidiário ao diagnóstico de alterações mamárias e como referência têm permitido melhoria da qualidade de leite oferecido ao consumo das populações (KELLY [...], 2000; PAAPE [...], 1991; RANUCCI [...], 1988; SILVA [...], 1996). Entendemos assim não ser justificável concentrar-se estudos apenas nas avaliações de alterações patológicas sem o prévio entendimento do organismo sadio.

A presente pesquisa, preliminarmente restringiu-se ao estudo de amostragem,

obtida em búfalas com úbere sem alterações físicas e cujas amostras de leite foram negativas na prova do CMT e no exame microbiológico. A análise dos resultados demonstrou contagens de células somáticas, um número de células cujas medianas foram de 13.000 e 18.000 células/mL, respectivamente, em contagem automática realizadas com contadores eletrônicos infravermelho e contagens por microscopia óptica em campo claro, técnica de Prescott e Breed. Esses resultados foram menores do que descritos pela grande maioria das referências relacionadas ao leite de bovinos não acometidos de mamite (SCHALM, 1971) e mesmo em bubalinos (SILVA; SILVA, 1994).

A diferença entre o número de células somáticas do leite de búfalas obtidas por Silva e Silva (1994) e os determinados nesta tese pode ter sido causada pela diversidade de técnicas de contagem celular utilizadas, pois os referidos pesquisadores contaram essas células usando hemocitômetro específico para contagem de leucócitos sangüíneos. Além do mais, cabe destacar a diferença de conceitos e critérios considerados para definir amostras de leite de búfalas: na presente pesquisa utilizou-se, além do exame físico da glândula mamária, o resultado negativo da prova do CMT e do exame bacteriológico, enquanto Silva e Silva (1994) usaram apenas o resultado do CMT e do pH. Ressalta-se que a CCS em hemocitômetro não foi empregada nesse estudo mas, as duas técnicas utilizadas apresentaram resultados semelhantes o que tornou viável a utilização e recomendação da contagem eletrônica automática de células somáticas do leite de bubalinos, pois seus resultados foram semelhantes aos obtidos por técnica padrão, contagem por microscopia direta, segundo a técnica de Prescott – Breed. Tal fato é

fundamental para o desenvolvimento de pesquisa sobre a celularidade do leite de búfalas, pois a contagem automática agiliza a avaliação mas, em algumas espécies, ruminantes domésticas, como por exemplo nas caprinas, existiriam limitações relacionadas à tecnologia utilizada e o tipo de secreção láctea, modificando a composição de elementos figurados no leite. Essa constituição particular da secreção láctea apócrina promoveriam resultados diferentes conforme a técnica automática empregada, particularmente, quando a contagem foi realizada em contadores eletrônicos de partículas.

O valor relativo dos diferentes tipos de células presentes no leite de búfalas sadias mereceu ser avaliada por refletir a atividade celular predominante no momento da colheita. A contagem dessas células pela técnica de Prescott - Breed, demonstrou valores semelhantes de células polimorfonucleares e mononucleares no leite desses hígidos, e aparentemente estavam disponíveis no leite quantidades semelhantes. Nessa técnica recomenda-se que sejam contadas as células presentes em 100 campos microscópicos, sendo o número de células contadas multiplicadas pelo fator do microscópio. A celularidade do leite de búfala foi considerada pequena e muitas vezes o número de células contadas nos 10 uL necessários à técnica era tão pequeno que talvez não representasse a realidade, uma vez que cada célula equivaleria a 4000 células/mL após a conversão.

No entanto, avaliando-se o sedimento ressuspendido e citocentrifugado, como se fez nesta tese, foi encontrado maior número de células mononucleares do que na contagem de células somáticas no leite pela técnica de avaliação direta de Prescott e Breed (1910) e o resultado diametralmente oposto ocorreu para as células

polimorfonucleares. As técnicas de contagens de células somáticas no leite que permitiram avaliar a predominância considerando apenas as células mononucleares e polimorfonucleares praticamente representaram um predomínio de células da série de monócito/macrófago para as células mononucleares, pois se considerou o número de linfócito muito pequeno. No caso de polimorfonucleares essas células quase que exclusivamente foram representadas por leucócitos polimorfonucleares neutrófilos, sendo apenas alguns polimorfonucleares eosinófilos detectados em poucas amostras, como já foram descritos para bovinos por Schalm [...] (1971). Ressalta-se esses autores que a técnica descrita por Prescott e Breed (1910), apesar de adequada para a contagem de células somáticas, apresentava significativas limitações para o exame diferencial, sendo indicada no máximo avaliações qualitativas de esfregaços corados de leite, determinando apenas a predominância do tipo celular caracterizando essas células como mono e polimorfonucleares.

Dhakal [...] (1992), Silva e Silva (1994) estabeleceram valores padrões relativos diferentes daqueles observados nos resultados desta tese, principalmente por ser o número de linfócitos maiores do que os encontrados neste estudo.

Schalm [...] (1971) referiram que a diversidade dos resultados referidos na literatura compulsada poderia ser atribuída não só as variações resultantes das manifestações intrínsecas e das próprias da glândula mamária como também, serem resultantes das utilizadas no procedimento das contagens. Por tal razão consideraram que a análise do esfregaço do sedimento celular do leite após a centrifugação permitiria melhor avaliação das condições fisiológicas e da atividade celular na glândula mamária, com adequada interpretação das características morfo-

tinturiais das células (avaliação qualitativa da celularidade) mas, haveria o risco de perda de células durante o processo e isso deveria ser considerado na interpretação do exame. Segundo os mencionados autores, essas células poderiam se perder não só no sobrenadante centrifugado como também no tampão de gordura que se concentra como a fração menos densa do material, pois ressaltaram ainda que as células somáticas do leite apresentariam afinidade pela gordura e portanto podendo interferir quantitativamente na avaliação dos esfregaços de leite.

Nesse estudo, o sobrenadante foi avaliado nas provas de citocentrifugação e não foi constatada a perda de células no sobrenadante, suposta por Dulin [...] (1982) e Schalm [...] (1971), todavia deve-se enfatizar que tal avaliação não foi feita no tampão de gordura.

A diferença encontrada na determinação dos predomínios celulares pelas técnicas propostas por este estudo poderia ser atribuída a perda de células que por ventura ficassem inclusas no tampão de gordura do leite foi considerada pouco provável, pois não houve diferença quantitativa dos resultados obtidos pelas duas técnicas. Caso houvesse, a célula que apresentaria maior afinidade pela gordura e assim representaria maior perda na citocentrifugação do leite, seria o macrófago, justamente a célula que predominou nessa técnica.

Fator limitante da excelência de identificação celular nas contagens microscópica de Prescott-Breed foi detectada por Schalm [...] (1971). Todavia na padronização da contagem de células somáticas por microscopia direta, as lâminas de esfregaços lácteos pela técnica de Rosenfeld (1947) permitiram razoável identificação das células, e Benites [...] (2001) consideraram o uso desta coloração

prática e satisfatória, apesar de preferirem a coloração com hematoxilina e eosina, quando realizaram contagens de células somáticas.

Os resultados das contagens de células identificadas entre as 400 contadas nos esfregaços obtidos na citocentrifugação foram expressos em termos de média e desvios padrão para monócitos/macrófagos, polimorfonucleares neutrófilos e linfócitos. Como os polimorfonucleares eosinófilos não apresentaram distribuição normal, os resultados foram apresentados como mediana e dois desvios-padrão, encontrando-se 61,1% de monócitos/macrófagos; 32,9% de polimorfonucleares neutrófilos; 5,3% de linfócitos e 0,7% de polimorfonucleares eosinófilos. Tal resultado discordou do apresentado por Dhakal [...] (1992), que referiram para contagens de células somáticas em amostras de leite de búfala sadias, predomínio de células epiteliais, seguidas em ordem decrescente de magnitude, dos linfócitos, polimorfonucleares neutrófilos e monócitos. Silva e Silva (1994) também encontraram resultados divergentes aos obtidos nesta tese, pois ao avaliarem a celularidade do leite de diversas raças de búfalos criados no Sri Lanka, observaram predomínio de polimorfonucleares neutrófilos cujo valor percentual seria maior que o observado em vacas. No leite de búfalas segundo autores citados as demais células somáticas estaria assim distribuídas: linfócitos (28%), macrófagos (8%), células epiteliais (5%) e polimorfonucleares eosinófilos (1%). Baseado nos resultados obtidos por Silva e Silva (1994) a maior resistência das búfalas à mamite se deveria a maior disponibilidade de polimorfonucleares neutrófilos. Entretanto os presentes resultados não permitiram essa afirmação uma vez que os valores relativos foram diferentes. Houve diferenciação evidente na conceituação de glândula mamária

hígida pois, os autores não submeteram suas amostras ao exame bacteriológico considerando a higidez da mama a partir da prova de CMT e do pH.

Paape [...] (2000), resumindo informações sobre as células presentes no leite de bovinos, referiram valores percentuais de células da série monócito/macrófago de 35-79%, semelhantes aos encontrados em leite de búfalas nesse estudo (61,1%) mas, diferentes em relação às demais células.

No leite de bovinos demonstrou-se que células anteriormente consideradas epiteliais e com capacidade de fagocitar, como definida por Schalm [...] (1971), eram na realidade células da série dos monócitos/macrófagos (JENSEN; EBERHART, 1981; LEE [...], 1980; ÖSTENSSON, 1993). Essas células por apresentarem diferentes graus de ativação e funções, apresentavam morfologia nuclear variada (ELGERT, 1996), condição morfológica que aumentaria a margem de erro. Schalm [...] (1971) mesmo apresentando resultados divergentes, salientavam a diversidade de descrições ao se diferenciar as células somáticas do leite das vacas, afirmando que inúmeras vezes o mesmo tipo celular era classificado como células diferentes, por diversos pesquisadores. Talvez por tal razão Sandgren [...] (1991) preferiram classificar essa população de células como macrófagos e células epiteliais (MEC), relatando porém que os macrófagos eram as células predominantes. Afirmação com a qual os resultados obtidos nessa pesquisa concordam.

Os trabalhos de Jensen e Eberhart (1981), Lee [...] (1980) e Östensson (1993) utilizaram técnicas extremamente sensíveis e específicas para a identificação dos tipos celulares como: citometria de fluxo; imunohistoquímica e provas funcionais específicas. Os resultados que obtiveram permitiram concluir que seriam da série

monócito/macrófagos a maioria das células anteriormente consideradas como de origem epiteliais. A dificuldade de diferenciação dessas células seria determinada pelas fases evolutivas variando de monócitos a macrófagos, com morfologia nuclear que, quando avaliadas por técnicas menos precisas, em esfregaços mais espessos e com colorações que não definem os contrastes nucleares e citoplasmáticos das células, induziram erros de interpretação que poderiam ser consideradas polimorfonucleares. Além disso, segundo Lee [...] (1980) as células epiteliais presentes no leite tanto de bovinos como de bubalinos representariam um valor percentual mínimo na celularidade.

Independentemente dos fatores de variação da tipificação celular descrito acima, é fundamental conhecer-se a população celular presente na lâmina da suspensão celular citocentrifugada, pois mesmo se os valores relativos não correspondessem as condições da própria glândula mamária, por exemplo por terem sido alterados durante o processamento, essa conferia as células que poderiam ser analisadas *in vitro* como, inclusive será descrito no Capítulo 3.

6. Conclusões

As condições estabelecidas pelo delineamento experimental no qual avaliou-se a celularidade do leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) híbridas criadas no Estado de São Paulo permitiram as conclusões apresentadas a seguir:

- a. a contagem de células somáticas por microscopia direta e automática apresentaram resultados semelhantes e extremamente diminutos;
- b. a predominância celular avaliada em lâminas pela técnica de Prescott - Breed e de suspensão celular citocentrifugada diferiu significativamente;
- c. pela técnica de contagem por microscopia direta de Prescott - Breed, encontraram-se valores semelhantes de células mononucleares e polimorfonucleares; enquanto que pela técnica de citocentrifugação da suspensão celular, determinou-se predomínio de mononucleares, principalmente monócitos e macrófagos, em diferentes fases evolutivas;
- d. a perda de células nas diferentes fases do preparo da suspensão celular para citocentrifugação não foi considerada significativa.

Referências

BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A.; COSTA, E. O. Modificação da técnica de contagem de células somáticas de Prescott e Breed utilizando-se a coloração de Hematoxilina e Eosina. **NAPGAMA**, v. 4, n. 3, p. 6-9, 2001.

BIRGEL, E. H. Avaliação das provas utilizadas no diagnóstico da mamite bovina. In: BIRGEL, E. H.; LARSSON, M. H. M. A.; HAGIWARA, M. K.; VASCONCELLOS, S. A.; LARSSON, C. E.; OGASSAWARA, S.; BENESI, F. J. **Patologia clínica veterinária**, São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982, p. 177-213.

CUNHA, M. S. **Contribuição ao diagnóstico clínico das mastites. Influência das fases da lactação, fases de ordenha e dos processos inflamatórios na composição físico-química, celular e microbiológica do leite de vacas da raça holandesa preta e branca**. São Paulo, 1988. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

DHAKAL, I. P.; KAPUR, M. P.; SHARMA, A. Significance of differential somatic cell counts in milk for the diagnosis of subclinical mastitis in buffaloes using foremilk and strippings milk. **Indian Journal of Animal Health**, v. 31, n. 1, p. 39-42, 1992.

DULIN, A. M.; PAAPE, M. J.; WEINLAND, B. T. Cytospin centrifuge in differential counts of milk somatic cells. **Journal of Dairy Science**, v. 65, p. 1247-1251, 1982.

ELGERT, K. D. **Immunology**. Understanding the immune system. Wiley-Less, p. 30-32, 1996.

GUARINO, A.; BALDI, L.; FUSCO, G.; LANDOLFI, M. C.; RUSSO, A. Types of cells present in buffaloes milk. **Proceedings IVth World Buffalo Congress**, vol. II. São Paulo, p. 187-189, 1994.

HARMON, R. J.; EBERHART, D. E.; JASPER, B. E.; LANGLOIS, B. E.; WILSON, R. A. Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infections, ed. 3 Arlington, VA, **National Mastitis Council**, 1990.

JENSEN, D. L.; EBERHART, R. J. Total and differential cell counts in secretions of the nonlactating bovine mammary gland. **American Journal Veterinary Research**, v. 42, p. 743-747, 1981.

KELLY, A. L.; TIERNAN, D.; SULLIVAN, C. O.; JOYCE, P. Correlation between bovine milk somatic cell count and polymorphonuclear leukocyte level for samples of bulk milk and milk from individual cows. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 2, p. 300-304, 2000.

LEE, C.; WOODING, F. B.; KEMP, P. Identification, properties, and differential counts of cell populations using microscopy of dry cows secretions, colostrum and milk from normal cows. **Journal of Dairy Research**, v. 47, p. 39-50, 1980.

ÖSTENSSON, K. **Trafficking of leukocytes and immunoglobulin isotypes in the bovine udder**. Studies of milk, lymph and blood from cows with healthy and mastitic mammary glands. Uppsala, Sweden, 1993. 67 p. Tese (Doctor) - University of Agricultural Sciences, Faculty of Veterinary Medicine Swedish University of Agricultural Sciences.

PAAPE, M. J.; GILDY, A. J.; JAIN, N. V.; MILLER, R. H. Leukocytic defense mechanisms in the udder In: BURVENICH, C.; VANDEPUTTE-VAN MESSON, G.; PAAPE, M. J.; SHAFER-WEAVER, K.; CAPUCO, A. V.; VAN OOSTVELDT, K.; BURVENICH, C. Immune surveillance of mammary tissue by phagocytic cells. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 480, p. 259-277, 2000.

PAAPE, M. J.; GILDY, A. J.; JAIN, N. V.; MILLER, R. H. Leukocytic defense mechanisms in the udder In: BURVENICH, C.; VANDEPUTTE-VAN MESSON, G.; HILL, A. W. (ed.). **New insights into the pathogenesis of mastitis**. Gent, Rijksuniversiteit, p. 95-105, 1991.

PRESCOTT, S. C.; BREEED, R. S. The determination of the number of body cells in milk by a direct method. **Journal of Infection Disease**, n. 7, p. 632, 1910.

RANUCCI, S. C.; FRUGANTI, G.; VALENTE, C. [...] Sul valore diagnostico di alcune prove di laboratorio nella mastite subclinica della bufala. **Sel. Vet.**, v. 29, p. 507-518, 1988.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes de May-Grunwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Mem. Inst. Butantan**, v. 20, p. 329-335, 1947.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1998. 221 p.

SANDGREN, C.H.; NORDLING, K.; BJÖRK, I. Isolation and phagocytic properties of neutrophils and other phagocytes from nonmastitic bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 2965-2975, 1991.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide: statistics**. Cary, SAS Institute, 2001. 956 p.

SCHALM, O. W.; CARROL, E. J.; JAIN, N. C. **Bovine mastitis**. Philadelphia, Lea e Febiger, 1971. 360 p.

SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. O. Experiments and observations leading to development of the California mastitis test. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 130, n. 5, p. 199, 1957.

SILVA, I. D.; SILVA, K. F. S. T. Total and differential cell counts in buffalo (*Bubalus bubalis*) milk. **Buffalo Journal**, v. 10, n. 2, p. 133-137, 1994.

SILVA, I. D.; SILVA, K. F. S. T.; AMBAGALA, A. P. N.; COORAY, R. Markers of inflammation in buffalo milk. IN: REGIONAL SYMPOSIUM, Peradeniya, Sri Lanka, **Proceeding**. p. 403-414, 1996.

VIANNI, M. C. E.; NADER FILHO, A.; ROSSETTI, D. J. G.; LONGHI, J. L.; SICHER, M. Eficiência do *California Mastitis Test* (CMT) na estimativa do número de células somáticas do leite bubalino. **Ciência Veterinária** – Jaboticabal, v. 4, n. 2, p. 3-4, 1990.

CAPÍTULO 2

Capítulo 2

Isolamento de fagócitos viáveis do leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) híidas, sem elicitación, criadas no Estado de São Paulo

Resumo

A obtenção de células viáveis do leite em quantidade adequada tem sido considerada limitante para a avaliação das funções celulares. O presente estudo teve por objetivo padronizar o volume e descrever o processamento das amostras para a recuperação de 2×10^6 células viáveis/mL de leite de búfalas híidas, sem elicitación, criadas no Estado de São Paulo. Para tal, foram colhidas 114 amostras de leite de quartos mamários de búfalas, negativas no CMT e ao isolamento bacteriológico, compondo três grupos com amostras constituídas de diferentes volumes (100 a 125, 500 e 750 mL) de leite. As amostras foram submetidas a CCS e cálculo do número e percentuais de células viáveis. Foi descrita a técnica para isolamento das células viáveis em quantidade e qualidade adequadas e, face a pequena concentração de células do leite de búfalas híidas, fez-se necessário maiores volumes da amostra mas, para conseguir-se o número necessário de células viáveis para adequada avaliação da atividade dos fagócitos, o simples aumento do volume da amostra poderia aumentar a concentração celular obtida, mas não de forma ilimitada pois haveria a possibilidade de comprometer-se a viabilidade das células pela manipulação excessiva e tempo exigidos para processamentos das amostras mais volumosas. Além disso, mesmo sem elicitación, foi possível a recuperação de 2×10^6 células viáveis/mL de leite de búfalas híidas com uso de amostras com volume mínimo de 500 mL de leite.

1. Introdução

A avaliação, quer quantitativa, quer qualitativa, das células somáticas, representadas quase exclusivamente por leucócitos presentes no leite, sinaliza a atividade do principal mecanismo de defesa da glândula mamária, ou seja a imunidade celular (CONCHA, 2001). A diversidade e complexidade das mesmas devem ser ainda investigadas (JENSEN; EBERHART, 1981), principalmente em bubalinos.

Dhakal [...] (1991) referiram que, apesar da importância que os resultados da contagem de células somáticas do leite poderia representar para bubalinos, só deveriam ser considerados funcionais as células viáveis, que representassem uma correlação positiva entre o número de células viáveis presente no leite de búfalas e o número total de células, assim como seria significativa a tendência de correlacionar o número de células viáveis e a contagem bacteriana do leite.

A compreensão total dos mecanismos das funções celulares da glândula mamária das búfalas requer, ainda a complementação dos resultados de inúmeras pesquisas realizados *in vitro* (SILVA [...], 1996) e, conseqüentemente, que essas células sejam obtidas em quantidade e qualidade adequadas e passíveis de serem preservadas em condições próximas às condições *in vivo* (NONNECKE; KEHRLI, 1985; SCHALM [...], 1971). Essas limitações se acentuam sobremaneira em amostras de secreções lácteas com pequena concentração de células, provenientes de

glândulas mamárias não acometidas por qualquer forma de mamite (SANDGREN [...], 1991).

Várias técnicas de avaliação funcional dos leucócitos do leite foram descritas (KEHRLI; HARP, 2001) e sempre eram precedidas pela necessidade de obtenção de uma suspensão celular com uma concentração geralmente igual a 2×10^6 células lácteas viáveis/mL.

Na grande maioria das vezes, os experimentos empregaram leite bovino como padrão e testaram funcionalmente a atividade dos polimorfonucleares neutrófilos, após indução de mamite asséptica (mediante elicitacão), conseguindo assim um grande número dessas células, recém mobilizadas da circulação. Essas células estariam distribuídas nas várias estruturas da glândula mamária e na secreção láctea, e poderiam ser recuperadas nas amostras de leite (SANDGREN [...], 1991).

Apesar da permanente preocupação com a qualidade das células obtidas em amostras representativas de leite para as diferentes avaliações funcionais das células *in vitro*, a literatura compulsada apresentou e caracterizou expressiva variabilidade de técnicas recomendadas, incluindo amostragens sem elicitacão prévia para pesquisas com bovinos (CONCHA; HOLMBERG, 1990; DESIDERIO; CAMPBEL, 1980), ainda não descritas para bubalinos.

As raras pesquisas específicas sobre a função de células do leite de búfalos, além de avaliarem a contagem total de células, priorizaram estudos envolvendo neutrófilos após indução, mas deixaram claro que existem diferenças quantitativas e qualitativas na celularidade desses animais, quando comparados a bovinos (SILVA; SILVA, 1994) tornando então, óbvia a necessidade de padronização da obtenção de

células viáveis de búfalas, inclusive sem elicitção, para viabilizar a execução das etapas subseqüentes de inúmeras outras provas, a exemplo do que já foi descrito e realizado para células do leite bovino (NONNECKE; KEHRLI, 1985; SANDGREN [...], 1991).

2. Objetivo

Pelas razões anteriormente descritas, o objetivo dessa pesquisa foi descrever o processamento das amostras de leite de búfalas híginas para obtenção de células em suspensão celular com concentração adequada de células lácteas viáveis, bem como padronizar o volume das amostras para preparo de suspensão celular contendo 2×10^6 células viáveis/mL de leite de búfalas híginas.

3. Material e métodos

3.1 Etapa Padrão

A Etapa Padrão seguiu a metodologia proposta nas diretrizes do material e métodos, tendo sido colhidas para o presente estudo 114 amostras de leite de 29 búfalas cujos quartos mamários atendiam aos pré-requisitos clínicos, incluindo o exame bacteriológico e à contagem de células somáticas do leite (vide página 29).

3.2 Etapa Específica

a. Colheita das amostras de leite

Cada amostra foi colhida em três alíquotas, duas foram descritas na etapa padrão e destinavam-se ao exame bacteriológico e a contagem automática de células somáticas e foram anteriormente descritas.

A terceira alíquota, para a obtenção de suspensão celular, foi colhida em frasco plástico, cujo conteúdo era imediatamente filtrado em gaze estéril ou nylon, e a seguir, transferido para frasco de polipropileno contendo igual quantidade de PBS livre de cálcio e magnésio (pH 7,2-7,4); sendo então identificadas, embaladas e mantidas sobre refrigeração. O transporte era feito em continentes isotérmicos contendo gelo picado, do qual as amostras eram isoladas com papel toalha impedindo contato direto dos frascos com o gelo, e também para preencher os espaços mortos, evitando movimentação excessiva do leite que constituiu essa amostra. Esse sistema objetivou manter as amostras refrigeradas à 4°C. Para controle da temperatura foi colocado no continente isotérmico um termômetro digital cujo sensor era mantido dentro de uma amostra controle, além de um termômetro de mínimo e máximo dentro do isopor, garantindo-se as condições térmicas do transporte.

Em termos gerais foram colhidas 114 amostras, sendo: 42 com volumes variando entre 100 e 125 mL; 60 com 500 mL de leite e 12 com 750 mL de leite. Esses volumes correspondiam a quantidade de leite colhido de cada glândula mamária e era acondicionado em quantidade equivalente de PBS refrigerado.

b. Isolamento das células do leite de búfalas

As amostras de leite destinadas à obtenção de células foram encaminhadas ao Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP para serem processadas o mais rapidamente possível, empregando-se para tanto, material plástico e estéril. Tais amostras de leite foram mantidas continuamente em refrigeração (aproximadamente 4°C).

No laboratório, as amostras acondicionadas em frascos tipo Falcon com capacidade de 50 mL cada, foram submetidas à força real de centrifugação (FRC) de 450 g por 20 minutos em temperatura de 4°C. Essas constantes de manipulação das amostras tinham os valores prévia e constantemente testados e controlados por avaliações freqüentes do sobrenadante citocentrifugado. Pelas razões anteriormente destacadas, torna-se necessário descrever uma metodologia adequada para padronizar o volume de leite necessário para quantificar e qualificar a função dessas células lácteas.

O sobrenadante mais viscoso formado na porção superior dos frascos centrifugados constituindo o tampão de gordura, foi retirado com auxílio de uma espátula ou simplesmente, tiveram os bordos descolados das paredes do frasco, para depois reverter o conteúdo do frasco. Após desprezar totalmente a fração sobrenadante líquida por uma única inversão do frasco preservava-se apenas o botão de células sedimentadas, formado no fundo do frasco. Subseqüentemente, o botão de células era desprendido do fundo do frasco de colheita da amostra, com fracos jatos de PBS. A seguir, fazia a concentração dos sedimentos, reunindo o conteúdo

celular de todos os frascos de cada uma das amostras. Isso era feito em outro frasco tipo Falcon, com capacidade de 50 mL completando-se o volume de 50 mL com PBS refrigerado. A suspensão com os sedimentos do leite concentrados, era novamente centrifugada, nas condições anteriormente mencionadas, desprezando-se o sobrenadante e o botão de células formado no fundo do frasco era desprendido e ressuspendido em 1mL de meio enriquecido¹ melhorando assim as condições de preservação e viabilidade das células. O produto obtido a partir desse processo de isolamento das células passa a ser designado: suspensão celular.

c. Concentração e teste de viabilidade de células de búfalas por exclusão do azul de tripan

Para determinar se a amostra de leite submetida ao processo de concentração celular para obtenção da suspensão celular a partir do isolamento das mesmas do leite de búfalas híidas, possuía 2×10^6 células viáveis por mL, no mínimo, a suspensão de células era submetida ao seguinte processamento: a uma alíquota de 10 μ L da suspensão de celular (células ressuspendidas em 1mL de RPMI²) adicionava-se 90 μ L de solução de azul de tripan² a 0,1%, para a seguir realizar-se a contagem de leucócitos do leite em câmara hematimétrica de Newbauer modificada, utilizando para tanto o reticulado dos quadrantes utilizados para a contagem dos leucócitos (área de 1mm^2 , subdividida em quadrados menores que $1/16 \text{mm}^2$). A contagem foi realizada utilizando microscopia óptica de campo claro,

¹ RPMI 1640; GIBCO® 31800-04

² MERCK®

com magnitude de 400 aumentos.

O número total de células contadas em um retículo específico para contagem de leucócitos do hemocitômetro corresponderia a concentração celular da **suspensão celular nº 1**, sendo o resultado expresso em número de células/mm³. Para converter o número de células contadas no resultado final expresso em células/mL, utilizou-se a seguinte fórmula: nº de células contadas x 10 x 10 x 1.000, ou seja, deve-se multiplicar o número de células por 100.000 (10⁵)³ e depois converter para 10⁶.

A concentração de células viáveis, correspondeu às células contadas que não adquiriram coloração azul, isto é, não se impregnaram com o corante, expressando o resultado em valor relativo, caracterizando o percentual destas células. A seguir o número relativo de células foi transformado em número absoluto expressando esses valores em milhões por mL (nº de células x 10⁶/mL)⁴.

3.3 Análise estatística

Inicialmente aplicou-se o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov para verificar se as variáveis apresentavam distribuição paramétrica ou não-paramétrica. Concluindo-se que a determinação da viabilidade apresentava distribuição

³ Os fatores de multiplicação correspondem a: x 10 – correção da altura do hemocitômetro, que é de 0,1 mm; novamente x 10 que corresponde à diluição da suspensão de células e x 1000 para transformar o número de células/mm³ em número de células/mL.

⁴ Como supra citado, o primeiro valor, obtido a partir da contagem em câmara, foi expresso e grandeza de 10⁵ (centenas de milhares) mas é posteriormente convertido em 10⁶ (alterando uma casa decimal e tornando a grandeza de milhões) por mera convenção, pois o objetivo é atingir 2 x 10⁶ células/mL.

paramétrica e a contagem de células somáticas não-paramétrica, submeteram-se os resultados às análises específicas.

As variáveis foram analisadas por grupo conforme o volume de leite da amostra, como também, quando a distribuição mostrou-se paramétrica, os resultados foram avaliados por análise de variância e as diferenças significativas foram comparadas pelo teste de Duncan. Para as variáveis não-paramétricas as comparações foram realizadas pelo teste de Mann-Whitney (SAMPAIO, 1998), usando o *software* estatístico SAS (2001) e MINITAB (2000).

Foram calculadas as frequências de amostras adequadas (que obtiveram 2×10^6 células/mL, no mínimo).

Quando houve necessidade de outras avaliações estatísticas para apresentar os resultados em melhores condições de interpretação, calculou-se o coeficiente de correlação de Pearson entre os valores de volume das amostras de leite de búfalas e a concentração de células viáveis das mesmas, bem como, a contagem de células somáticas e a concentração de células viáveis.

4. Resultados

A viabilidade média de 114 amostras de leite de búfalas negativas na prova do CMT e sem crescimento bacteriano criadas no Estado de São Paulo, foi de 62,1% com desvio padrão de 19,3 e a mediana da contagem de células somáticas de todas as amostras foi 14.000 células/mL.

As 42 amostras cujo volume de leite de búfalas era de 100 a 125 mL, apresentaram viabilidade média da suspensão celular obtida a partir das mesmas de $65,3\% \pm 21,4$, obtendo-se um aproveitamento de $35,7\%$ das amostras para utilização nas demais provas de avaliação da função celular. A mediana da concentração celular da suspensão foi igual a $1,050 \times 10^6$ células/mL.

As 60 amostras que possuíam volume de 500 mL de leite, apresentaram viabilidade média de $61,4\% \pm 17,0$, obtendo-se um maior aproveitamento das amostras, ou seja, $56,7\%$, sendo a mediana da concentração celular igual a $2,138 \times 10^6$ células/mL.

Finalmente, as 12 amostras com volume de 750 mL de leite, apresentaram a menor viabilidade celular média apesar do maior aproveitamento das amostras e maior concentração celular, a saber: $46,1\% \pm 17,2$; 100% e $3,775 \times 10^6$ células/mL, respectivamente. Esses resultados foram detalhados na Tabela 2.1 e configurados nos Gráficos 2.1 e 2.2. Na Tabela 2.1. foram destacadas também as características estatísticas: as diferenças das medianas das concentrações celulares foram todas estatisticamente diferentes, o mesmo não ocorrendo com relação às médias da viabilidade onde os grupos contendo 100-125 mL e 500 mL demonstraram resultados equivalentes e superiores aos do grupo contendo amostras com 750 mL de leite de búfalas (Tab. 2.1).

Tabela 2.1 – Resultados da viabilidade média, freqüência de obtenção de suspensão com 2×10^6 células lácteas viáveis e medianas do número de células isoladas por mL. Distribuição segundo o volume das amostras de leite colhidas de búfalas negativas na prova do CMT e no exame bacteriológico, conforme o volume – São Paulo – 2002

Volume de leite colhido (mL)	n°	Média da viabilidade celular (%)	% de amostras adequadas*	Mediana ($\times 10^6$ células/mL)
100-125	42	65,3 \pm 21,4 ^{a #}	35,7	1,050 ^{c ##}
500	60	61,4 \pm 17,0 ^a	56,7	2,138 ^b
750	12	46,1 \pm 17,2 ^b	100	3,775 ^a

* foram consideradas adequadas as amostras que obtiveram concentração mínima de 2×10^6 células/mL; # $p < 0,04$; ## $p < 0,016$; letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre si.

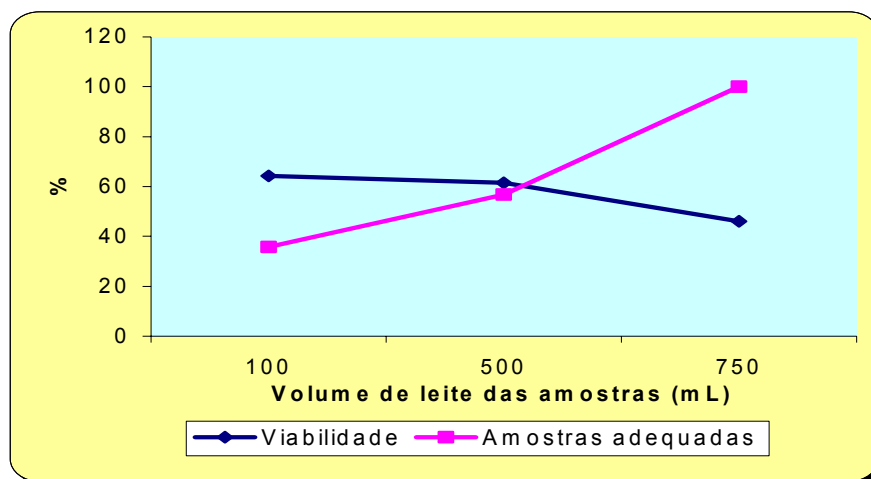


Gráfico 2.1 - Valores médios das freqüências das amostras contendo $2,0 \times 10^6$ células/mL ou mais e da viabilidade celular nos diferentes volumes de leite das amostras colhidas, no leite de búfalas sadias – São Paulo – 2002

Os resultados configurados no gráfico 2.2 demonstraram que houve correlação positiva ($r=0,24$; $p<0,009$) entre volume da amostra de leite de búfalas e o número de células viáveis determinadas nessas amostras.

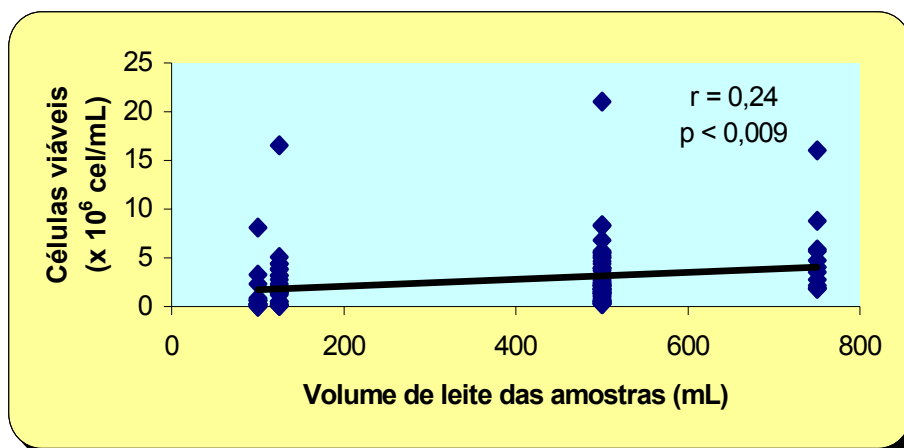


Gráfico 2.2 – Correlação entre o volume de leite das amostras colhidas (mL) e a concentração de células viáveis ($\times 10^6$ células/mL) na suspensão celular do leite de búfalas sadias – São Paulo – 2002

Entre os valores obtidos para as contagens de células somáticas e a concentração de células viáveis nas amostras, como pode-se observar no Gráfico 2.3, houve correlação positiva ($r=0,59$; $p<0,0001$), entre esses resultados, indicando que quanto maior fosse o número de células somáticas, maior era a concentração obtida de células viáveis.

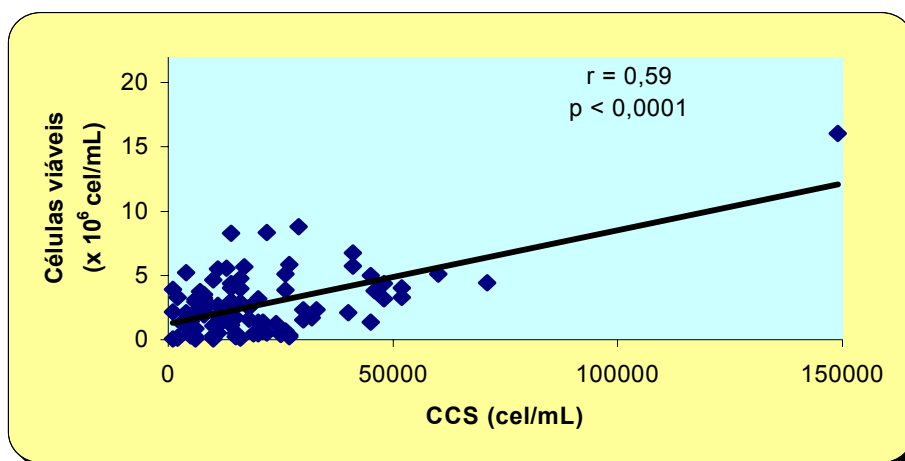


Gráfico 2.3 – Correlação entre a contagem de células somáticas (células/mL) e a concentração de células viáveis ($\times 10^6$ células/mL) do leite de búfalas sadias – São Paulo – 2002

5. Discussão

Inicialmente houve a necessidade de padronização da técnica de obtenção das células viáveis do leite de búfalas, em concentração adequada, principalmente nas condições propostas nesse delineamento experimental em que se destacou a expectativa de alcançar resultados significativos em amostras de leite de glândulas mamárias híginas, não elicitados, pré-selecionados pelo resultado negativo na prova do CMT e no exame microbiológico. A proposta de triagem das amostras para serem incluídas no processo experimental, foi mais rígida do que a adotada por Silva e Silva (1994). Optou-se pela descrição detalhada deste capítulo da presente tese, descrevendo essa etapa separadamente, pois houve grande perda de amostras de leite, pela quantidade insuficiente de células viáveis obtidas nas etapas experimentais preliminares, prejudicando significativamente a execução de técnicas

mais complexas e laboriosas a serem descritas no capítulo subsequente (Capítulo 3), cuja confiabilidade dependeria dessa etapa (SANDGREN [...], 1991).

As amostras foram processadas empregando material plástico para que não houvesse qualquer possibilidade de células da série dos macrófagos por inadequação do material utilizado (JENSEN; EBERHART, 1981), por idênticas razões as amostras colhidas e ou em processamento foram mantidas sob refrigeração contínua. Mesmo fora do refrigerador a 4°C ou da centrífuga refrigerada, empregou-se um continente isotérmico com gelo triturado, dentro do qual as amostras foram mantidas durante o balanceamento dos tubos para centrifugação e na ressuspensão dos sedimentos celulares, procurando preservar a temperatura à 4°C, conforme descrito por Silva [...] (1996) para avaliação de neutrófilos, embora Nonnecke e Kehrli (1985) tivessem mantido as amostras de leite bovino em temperatura ambiente.

Várias forças de centrifugação foram testadas nessa pesquisa para padronizar o processamento das amostras da secreção láctea de búfala, fazendo-se sempre a avaliação citológica da fração sobrenadante. Assim sendo, selecionou-se a metodologia aqui descrita. Após a primeira centrifugação, todos os sedimentos ressuspensos de uma mesma amostra foram depositados em outro frasco limpo pois, apesar de realizar-se adequadamente a limpeza dos lados internos do frasco, se a gordura que porventura não fosse completamente removida haveria comprometimento da qualidade dos preparados para as provas subsequentes. Avaliações preliminares demonstraram que apenas a limpeza da parede interna dos frascos era insuficiente para dar qualidade suficiente para a continuidade das

determinações. Essas observações não foi encontrada na literatura compulsada e pode ser uma necessidade inerente ao tipo de gordura do leite da búfala.

A diversidade de força real de centrifugação descrita na literatura é muito grande e muitas vezes um mesmo autor refere metodologias diversas como no trabalho de tese de Concha (2001), com diferentes protocolos de centrifugação. Como a diversidade das informações era significativa nos trabalhos com leite de bovinos, optamos por tomar como ponto de partida em nossas avaliações os procedimentos descritos por Mori (2000), por apresentarem-se bem detalhados e também serem citados para células de leite.

A contagem de células somáticas revelava valores que foram considerados de pequena magnitude (mediana igual a 14.000 células/mL) ao compararem-se os valores obtidos em bovinos. Por tal razão houve necessidade de utilizar maiores volumes expressivos de leite de búfalas, optando-se por manter a relação 1:1 entre o leite e o PBS gelado. Nonnecke e Kehrli (1985) recomendaram aumentar da quantidade de PBS em relação ao leite pois favoreceria a recuperação celular, diminuindo-se a perda de células na centrifugação. Todavia, essa hipótese não confirmou-se em etapas preliminares desta pesquisa com a diluição 1:1 (Capítulo 1). Além da importância em se definir a relação de diluição entre o PBS e o leite, verificou-se também que seria importante selecionar a composição do PBS, como detalhado nos Anexos desta pesquisa, utilizando-o com pH controlado entre 7,2 e 7,4. Discretas oscilações do pH do PBS, causaram perdas das amostras de leite colhidas. Assim sendo o PBS foi mantido refrigerado nos frascos de colheita, onde o leite, que constituiria a amostra era colocado imediatamente após a filtração através

de gaze estéril, para ser então, a amostra identificada e acondicionada no continente isotérmico.

A prova negativa do CMT utilizada como critério amostral para esta investigação, permitiu que se fizesse uma inferência da pequena magnitude do número de células presentes, sem que se pudesse identificar ou estimar quantas estariam viáveis. Nesse estudo todas as amostras foram negativas no CMT o que poderia ser aceito como previsão que as mesmas apresentassem uma contagem de células somáticas menor do que 200.000 células/mL de leite (SCHALM [...], 1971). Tal suposição confirmou-se pois, como já mencionado, a mediana do número de células somáticas foi igual a 14.000 células/mL.

Objetivando-se obter 2×10^6 células viáveis/mL, inicialmente colheram-se entre 100 mL e 125 mL de leite de búfalas pré-selecionadas e, baseado na expectativa da celularidade de pequena magnitude e de possíveis perdas no processamento, testaram-se amostras de maiores volumes: 500 mL e finalmente 750 mL.

Os resultados demonstraram que quanto maior o volume de leite colhido, maior a concentração de células viáveis na suspensão celular (expressas em termos de medianas). Assim justificou-se a necessidade de aumentar-se, gradativamente, o volume da amostragem após avaliação do rendimento da amostra, buscando identificar o menor volume necessário para a obtenção da concentração adequada e necessária para as provas de avaliação funcional que comporão a próxima etapa experimental (Capítulo 3). O grupo de avaliações que reuniu amostras com 500 mL de volume, apresentou os melhores resultados expressos como mediana, embora o

grupo com volume 50% maior, ou seja, de 750 mL de secreção láctea, quase tenha dobrado o valor da mediana do número de células viáveis ($3,775 \times 10^6$ células/mL).

Viabilidade significaria o percentual de células que seriam disponibilizadas para manifestar determinadas atividades, ou mesmo a população celular funcional (DHAKAL [...], 1991). Isso foi valorizado por Piccinini [...] (1999) que descreveram maior viabilidade em amostras com mamite e consideraram a viabilidade como um “fator imunológico” e que portanto deve ser considerado junto aos demais.

Os valores relativos de viabilidade (expressos em percentagem de células viáveis na suspensão celular) determinados na presente tese, foram iguais aos descritos por Nonnecke e Kehrli (1985), discordando daqueles referidos por Concha e Holmberg (1990), por terem sido evidentemente menores, pois esses últimos pesquisadores trabalhando com amostras da secreção láctea de bovinos sem elicitação, com amostras de 400 mL obtiveram 3×10^6 células/mL, com até 90% de viabilidade celular. Os autores referidos fizeram a primeira centrifugação com 800 g, durante 20 minutos, usando diluição de 1:2 PBS.

Detalhe da presente metodologia de avaliação da viabilidade celular do leite de búfala que precisa ser citado, referiu-se ao fato de entre a colheita e a avaliação da viabilidade não decorreram menos de quatro horas, utilizados para o transporte do material da propriedade ao laboratório. No laboratório, os frascos contendo as amostras de leite foram imediatamente balanceados, e a seguir, centrifugados durante 20 minutos por duas vezes. Subseqüentemente concentraram-se os sedimentos, obtendo-se a suspensão celular o mais rápido possível. No delineamento do processo de manipulação das amostras, considerou-se que essa etapa consumiria

muito tempo e poderia comprometer a viabilidade de algumas células. Poucas pesquisas referiram essa tolerância mas é muito provável que o tempo de processamento interfira no resultado final. Talvez esse fator pudesse, ser ainda mais minimizado, com a utilização de uma centrífuga que acondicionasse frascos de 500 ou 1000 mL. Mesmo as pesquisas clássicas sobre o assunto e que utilizaram amostras de grande volume, a já mencionada etapa de processamento não foi adequadamente descrita (NONNECKE; KEHRLI, 1985).

Apesar disso, a correlação entre volume da amostra e a concentração celular obtida, ou seja, o número de células viáveis recuperadas, foi pequeno ($r=0,24$) mas, a diferença detectada foi significativa ($p<0,009$), sugerindo que, na dependência da amostra, as células poderiam ser mais susceptíveis a perdas durante o processamento ou então serem mais frágeis e com menor vitalidade.

Ao discutirem-se os resultados obtidos considerou-se fundamental referir que o aumento do volume da amostra, poderia aumentar a concentração celular obtida, mas não de forma ilimitada pois, o excesso de manipulação poderia comprometer a viabilidade das células, principalmente se a manipulação for excessiva. Outro fato significativo que os resultados revelaram foi que o maior número de células somáticas nas amostras de leite aumentaria também a concentração de células viáveis como também salientado em amostras de leite de bovinos por Kehrlí e Harp (2001).

Deve-se lembrar que na presente pesquisa as amostras foram colhidas de búfalas que não apresentavam qualquer alteração da glândula mamária, principalmente processos inflamatórios e, mesmo as amostras com maior número de

células somáticas no leite, tinham oscilações dentro da amplitude fisiológica de variação da celularidade. Nestas condições, as células do leite não estariam sendo mobilizadas intensamente da circulação sanguínea como aconteceria nos casos de mamite. Nos casos de inflamação de origem bacteriana, as células mobilizadas com objetivo de controlar o processo, teriam seguramente, maior atividade, mas talvez suportassem menos o processamento. Esse realce foi feito, embora Dhakal [...] (1991) e Piccinini [...] (1990) tenham apresentado resultados condizentes com as afirmações dos presentes resultados e, ao compararem a viabilidade com a contagem de células somáticas em grupos de acometidos por mamite e sadios, os autores detectaram realmente maior celularidade e viabilidade no grupo com mamite, independentemente da fase da ordenha em que as amostras foram colhidas.

O maior volume de leite necessário para obtenção de células em quantidade e qualidade suficientes para a realização das provas de avaliação funcional, poderiam limitar a realização dessas provas às búfalas que produzam quantidade suficiente de leite, excluindo dessas avaliações os animais com pequena produção. Nonnecke e Kehrli (1985) ao desenvolverem suas pioneiras pesquisas em bovinos, colhiam 8 litros de leite, mas deve-se ressaltar que seus objetivos eram avaliar especificamente linfócitos do leite, cuja ocorrência tem sido considerada pequena no leite de bovinos sadios. Mesmo assim, esses os autores concluíram que as análises poderiam ser conduzidas sem elicitación prévia, e portanto em condições mais próximas às fisiológicas (DESIDERIO; CAMPBELL, 1980).

6. Conclusão

Nas condições deste experimento, avaliando a recuperação de 2×10^6 fagócitos viáveis/mL do leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) híidas, foi possível apresentar as conclusões a seguir detalhadas:

- A pequena celularidade do leite de búfalas sadias sem elicitção, requer amostras de maior volume mas, embora, o aumento do volume da amostra pudesse aumentar a concentração da suspensão celular, esse aumento foi limitado pois havia comprometimento da viabilidade das células pelo excesso de manipulação e tempo exigidos nos processamentos das amostras de maior volumes.
- O volume de 500 mL de leite foi o mais eficiente para recuperação de 2×10^6 células viáveis/mL de leite de búfalas híidas.

Referências

BIRGEL, E. H. Avaliação das provas utilizadas no diagnóstico da mamite bovina. In: BIRGEL, E. H.; LARSSON, M. H. M. A.; HAGIWARA, M. K.; VASCONCELLOS, S. A.; LARSSON, C. E.; OGASSAWARA, S.; BENESI, F. J. **Patologia clínica veterinária**, São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982, p. 177-213.

CONCHA, C. **Activity of leukocytes in bovine mammary secretion and their responsiveness to mitogens and Ginseng saponin**. Uppsala, Sweden, 2001. 81 p. Tese (Doctor) - University of Agricultural Sciences, Faculty of Veterinary Medicine Swedish University of Agricultural Sciences. 2001.

CONCHA, C.; HOLMBERG, O. Ability of bovine mammary macrophages to enhance proliferation of autologous blood and mammary secretion lymphocytes. **Journal of Dairy Research**, v. 57, p. 7-16, 1990.

DESIDERIO, J. V.; CAMPBELL, S. G. Bovine mammary gland macrophage: Isolation, morphologic features, and cytophilic immunoglobulins. **American Journal Veterinary Research**, v. 41, n. 10, p. 1595-1599, 1980.

DHAKAL, J. P.; KAPUR, M. P.; BHARDWAY, J. R. M. Diagnosis of subclinical mastitis in buffaloes using somatic and viable cell counts. **Indian Journal of Dairy Science**, v. 44, n. 9, 1991.

HARMON, R. J.; EBERHART, D. E.; JASPER, B. E.; LANGLOIS, B. E.; WILSON, R. A. Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infections, ed.3 Arlington, VA, **National Mastitis Council**, 1990.

JENSEN, D. L.; EBERHART, R. J. Total and differential cell counts in secretions of the nonlactating bovine mammary gland. **American Journal Veterinary Research**, v. 42, p. 743-747, 1981.

KEHRLI, M. E.; HARP, J. A. Immunity in the mammary gland. **Veterinary Clinics of North America: Food animal practice**, v. 17, n. 3, p. 495-515, 2001.

MINITAB – **The Student Edition of MINITAB Statistical software adapted for education – 13.0 Release**. User's Manual. New York: Addison – Wesley, 2000.

MORI, E. **Avaliação da função dos macrófagos alveolares após infecção experimental em cavalos (*Equus caballus* – Linnaeus, 1758) por Herpesvírus eqüino tipo 1 (HVE-1)**. 2000, 98 p. Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo.

NONNECKE, B. J.; KEHRLI JR, M. E. Isolation of mononuclear cells from bovine milk by continuous-flow and density gradient centrifugation: Response cells to nitrogens. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, n. 6, p. 1259-1262, 1985.

PICCININI, R.; BRONZO, V.; MORONI, P.; LUZZAGO, C.; ZECCONI, A. Study on the relationship between milk immune factors and *Staphylococcus aureus* intramammary infections in dairy cows. **Journal of Dairy Research**, v. 66, p. 501-510, 1999.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1998. 221 p.

SANDGREN, C. H.; NORDLING, K.; BJÖRK, I. Isolation and phagocytic properties of neutrophils and other phagocytes from nonmastitic bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 2965-2975, 1991.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide**: statistics. Cary, SAS Institute, 2001. 956 p.

SCHALM, O. W.; CARROL, E. J.; JAIN, N. C. **Bovine mastitis**. Philadelphia, Lea e Febiger, 1971. 360 p.

SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. O. Experiments and observations leading to development of the California mastitis test. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 130, n. 5, p. 199, 1957.

SILVA, I. D.; SILVA, K. F. S. T. Total and differential cell counts in buffalo (*Bubalus bubalis*) milk. **Buffalo Journal**, v. 10, n. 2, p. 133-137, 1994.

SILVA, I. D.; SILVA, K. F. S. T.; AMBAGALA, A. P. N.; COORAY, R. Markers of inflammation in buffalo milk. IN: REGIONAL SYMPOSIUM, Peradeniya, Sri Lanka, 1996. **Proceeding**. P. 403-414.

CAPÍTULO 3

Capítulo 3

Avaliação da função dos macrófagos de amostras de leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) híidas, criadas no Estado de São Paulo

Resumo

Para avaliar as funções dos macrófagos do leite de búfalas híidas sem eliciação, por de testes de mensuração direta e por testes indiretos que mensuram os metabólitos de oxigênio gerados na "explosão respiratória", foram colhidas amostras de leite de búfalas sadias e nelas determinados o número total e diferencial de células somáticas, a viabilidade, bem como os índices de espraimento, de fagocitose e de liberação de peróxido de hidrogênio. As amostras foram analisadas em dois grupos, no primeiro (G1) distribuíram-se as amostras em diferentes fases da lactação e, no segundo (G2) incluíram-se apenas as amostras colhidas exclusivamente do início da lactação de búfalas, controladas previamente com 3 exames microbiológicos e CMT negativos. As amostras do G2 foram pareadas avaliando também a liberação de peróxido de hidrogênio. O G1 apresentou maior número de células somáticas do que o G2, embora os valores relativos de polimorfonucleares neutrófilos e os resultados do espraimento tenham sido maiores nesse último grupo. Não houve diferença significativa entre as comparações das demais variáveis, bem como entre as determinações de liberação de peróxido de hidrogênio, tanto espontânea como induzida. Os resultados demonstraram correlação positiva entre fagocitose e espraimento, fagocitose e linfócitos e correlação negativa entre o espraimento e liberação de peróxido de hidrogênio, bem como, entre o valor relativo de polimorfonucleares neutrófilos e a determinação da liberação de peróxido de hidrogênio. Concluiu-se ainda que: os macrófagos isolados do leite de búfalas híidas, aderidos espraíram significativamente, como também apresentaram correlação com outro marcador de ativação celular, no caso, a liberação de peróxido de hidrogênio; mais da metade dos macrófagos aderidos fagocitaram partículas de

zymosan e os fagócitos mantiveram sua capacidade de liberar peróxido de hidrogênio, espontaneamente ou não, em grau máximo, com uma significativa variação entre amostras.

1. Introdução

Os mecanismos desenvolvidos pelas células na execução de suas funções foram considerados fundamentais para a defesa da glândula mamária (PICCININI [...], 1999; CONCHA, 2001).

Os resultados referidos na literatura demonstraram que os bubalinos apresentavam uma menor quantidade de células somáticas no leite do que os bovinos em condições semelhantes de manejo e higiene e, em vacas, valores de pequena magnitude das células somáticas do leite foram considerados como fatores de risco para a ocorrência de mamites infecciosas (SURIYASATHAPOM [...], 2000). Apesar disso, trabalhos específicos realizados com leite de búfalas demonstraram de forma patente a menor susceptibilidade desses espécimes às mamites (SHUKLA; SUPEKAR, 1987), capacidade que diminuiria com o avançar da lactação, todavia, ao final das lactações observar-se-ia menor número de exames microbiológicos (COSTA [...], 1997).

Os polimorfonucleares neutrófilos e macrófagos foram considerados como fagócitos funcionais da glândula mamária dos bovinos (CRAVEN; WILLIAMS, 1985; PAAPE [...], 1991). Essas células fagocitariam e destruiriam microrganismos na defesa da glândula contra a instalação de patógenos invasores. Apesar de atribuir-se

aos polimorfonucleares neutrófilos a maior responsabilidade na proteção da glândula mamária frente à ação dos microrganismos (PAAPE [...], 1991), esses necessitariam da ação prévia dos mononucleares monócitos/macrófagos, mantendo-se a delicada inter-relação que regeria os mecanismos imunológicos (POLITIS [...], 1992).

Esclarecimentos dos mecanismos específicos sobre a estimulação e liberação das células somáticas do leite e da fagocitose, induziu os pesquisadores a desenvolverem pesquisas que possibilitassem a manipulação direta destes processos e das avaliações funcionais das referidas células *in vitro*, contribuindo no estudo da glândula mamária de bovinos (PAAPE [...], 1991).

A maioria das provas descritas refere-se à avaliação da função de neutrófilos e geralmente utilizam a indução experimental de mamites, inclusive em bubalinos (DHAKAL [...], 1991; SILVA, 1993; SILVA; KARIYAWASAM, 1996). Todavia, escassas foram as pesquisas referentes aos macrófagos presentes no leite, tanto de bovinos (CONCHA, 2001; DESIDERIO; CAMPBELL, 1980; NONNECKE; KEHRLI, 1985; SANDGREN [...], 1991) como também em bubalinos, nos quais, até onde é do nosso conhecimento, não existe nenhum trabalho específico sobre a avaliação funcional desses fagócitos mononucleares no leite de búfalas.

Fagócitos

Os fagócitos – monócitos/macrófagos e polimorfonucleares neutrófilos – foram as células predominantes em amostras da secreção láctea de búfalas, cujas glândulas mamárias foram consideradas por vários parâmetros como híginas, como

foi confirmado nos resultados do Capítulo 1 desta tese.

Aos macrófagos das secreções lácteas foram atribuídas funções consideradas como acessórias, secretórias, efetoras e reguladoras (ELGERT, 1996), algumas das quais já demonstradas em macrófagos de bovinos (CONCHA; HOLMBERG, 1990; POLITIS [...], 1991; POLITIS [...], 1992).

As células da série monócitos/macrófagos segundo inúmeros pesquisadores, representam a principal população de células ativas na glândula mamária de bovinos não infectada (JENSEN; EBERHART, 1981; LEE [...], 1980; Mc DONALD; ANDERSON, 1981; ÖSTENSSON, 1993; SORDILLO [...], 1997). Essa observação foi confirmada para o leite de búfalas, experimentalmente pelos resultados obtidos no Capítulo 1 dessa tese. Onde, também foram extensivamente discutidas as dificuldades de se obter consenso de opiniões na literatura compulsada e que, por muito tempo esses grandes fagócitos foram classificados como células epiteliais (JENSEN; EBERHART, 1981; LEE [...], 1980) ou mesmo a eles se atribui uma nova categoria celular: a dos "macrófagos-células epiteliais" (MCE) pela dificuldade em diferenciá-las por processos morfo-tinturiais (SANDGREN [...], 1991).

Os macrófagos teriam capacidade de localizar partículas, tanto opsonizadas, como não opsonizadas para fagocitar e as destruir intracelularmente, assim como, também poderiam remover gotículas (glóbulo) de gordura em glândulas mamárias em fase de involução (OUTERRIDGE; LEE, 1988; SORDILLO; NICKERSON, 1988). Nos macrófagos da secreção do tecido mamário de bovinos foi descrita a liberação de interleucina-1 (IL-1) além da capacidade de apresentação de antígenos (POLITIS

[...], 1991; POLITIS [...], 1992) uma vez que, antígenos da bactéria fagocitada seriam processados nos macrófagos e expostos na membrana celular associados aos antígenos do complexo de histocompatibilidade principal, classe II (SORDILLO [...], 1997). Assim os macrófagos foram considerados capazes de monitorar a infecção quando estimulados para fagocitar e liberariam substâncias quimiotáticas mobilizadoras das células polimorfonucleares neutrófilos (CRAVEN, 1983; CRAVEN; WILLIAMS, 1985; POLITIS [...], 1996).

Métodos de avaliação *in vitro* da atividade dos macrófagos contribuíram de forma marcante para o estudo da interação entre os microrganismos e o hospedeiro, tratamentos e diversas condições desafiadoras indutoras de enfermidades em várias espécies de animais, como para considerar os macrófagos de diferentes origens (LOUREIRO, 1997; MASSOCO, 1998; MORI, 2000; SOUZA, 1996).

Os polimorfonucleares neutrófilos da secreção láctea dos bubalinos foram funcionalmente avaliados e comparados aos neutrófilos sanguíneos (encontrados no sangue circulante), demonstrando que essas células dos bubalinos apresentam uma atividade funcional significativamente maior do que a observada em bovinos. Comparando a atividade funcional dos polimorfonucleares neutrófilos do leite e sanguíneos dos bubalinos, essas foram semelhantes, enquanto nos bovinos, a atividade funcional dos polimorfonucleares sanguíneos foi mais acentuada que nessas células na secreção láctea (SILVA, 1993; SILVA, 1996; SILVA; KARIYAWASAM, 1996).

A Fagocitose

A fagocitose pode ser avaliada *in vitro*, direta ou indiretamente: mensurando a capacidade dos fagócitos englobarem e lisarem partículas ou microrganismos e quantificando a geração dos diversos radicais de oxigênio (por quimioluminescência) ou por redução do corante *nitrobluetetrazolium* (NBT) (MENDES, 1996) ou, até mesmo, por uma da avaliação que fora considerada como uma tentativa frustrada de fagocitose, manifestada pela aderência e espraiamento de macrófagos (RUSSO [...], 1989).

A partir do momento de reconhecimento da bactéria pelo fagócito, inicia-se a mobilização dos mecanismos bactericidas dependentes e independentes de oxigênio (RAINARD; POUTREL, 2000). Os mecanismos independentes de oxigênio empregam alterações bactericidas de pH nos fagolisossomas e enzimas lisossômicas (PAAPE [...], 1991) como proteases, ácido ribonuclease, β -galactosidase e fosfolipases.

Os mecanismos dependentes de oxigênio envolvem oxidação via mecanismo denominado de “explosão” respiratória.

Explosão respiratória

Após a fagocitose, observou-se maior consumo de oxigênio, de trifosfato de adenosina (ATP) e na geração de metabólitos intermediários de oxigênio, ocasionando o fenômeno denominado por “explosão respiratória” (*respiratory*

burst) Nesse processo, os radicais de oxigênio formados constituíram potentes toxinas para lipídios, proteínas e ácidos nucléicos.

A ativação da Nicotinamida-Adenosina-Difosfato (NADPH) oxidase, localizada na membrana celular do leucócito, converteria o oxigênio (O_2) molecular do tecido circundante em superóxido (O_2^-). A NADPH presente, nos tecidos, doaria elétrons a partir da ativação da via glicolítica das hexoses-monofosfato. Esse rápido consumo de oxigênio seguido da formação do superóxido foi referido como aceleração respiratória ou explosão respiratória. O superóxido converte-se em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela superóxido dismutase (SOD). Em presença da catalase enzima predominante em macrófagos maduros, descreveu-se a geração de radical hidroxila (OH^-), o oxigênio singleto (1O_2), cloraminas e aldeídos. Nos polimorfonucleares neutrófilos a principal via enzimática é da mieloperoxidase - enzima lisossômica liberada no fagolisossoma -, sendo os íons peróxido e cloreto convertidos em ácido hipocloroso com atividade bactericida (CHAMPE; HARVEY, 1996).

A fagocitose realizada pelos macrófagos foi considerada semelhante à dos polimorfonucleares neutrófilos e estes, também seriam atraídos pelos neutrófilos lesados, apesar dos mecanismos de explosão respiratória nessas células serem células menos intensos. Tanto os polimorfonucleares neutrófilos como os macrófagos possuem a capacidade de produzir superóxidos com atividade microbica; mas para os polimorfonucleares neutrófilos demonstrou-se a maior capacidade de metabolismo oxidativo do os macrófagos (OUTTERRIDGE; LEE,

1981). Além disso, os macrófagos maduros não conteriam mieloperoxidase (SANDGREN [...], 1991), mas a catalase apresentaria função semelhante (TIZARD, 2002). Por outro lado, quando os macrófagos não estão ativados, o sistema da oxidase encontra-se latente e dissociado entre o citosol e a membrana celular, não ocorrendo produção de metabólitos intermediários (TIZARD, 2002).

Em 1977, Nathan e Root relataram a liberação de H_2O_2 por macrófagos ativados, ativação essa que poderia ser induzida *in vitro* com a utilização de forbol 12-miristrato 13-acetato (PMA), substância estimuladora da "explosão" respiratória, podendo o metabólito ser quantificado, por exemplo, através de ensaios envolvendo a oxidação de fenol vermelho dependente de peroxidase (PICK; KEISARI, 1980; PICK; MIZEL, 1981; RUSSO [...], 1989).

2. Objetivo

Pelo exposto nessa revisão de literatura, objetivou-se no delineamento experimental dessa pesquisa, avaliar funcionalmente a atividade dos macrófagos do leite de búfalas híidas sem prévia elicitação, por testes de mensuração direta (espraiamento e fagocitose de partículas de Zymosan) e por testes indiretos que quantificam os metabólitos de oxigênio gerados na "explosão respiratória".

3. Material e métodos

3.1 Etapa Padrão

A Etapa Padrão seguiu a metodologia proposta nas diretrizes do material e métodos, tendo sido colhidas para o presente estudo 56 amostras de leite de 15 búfalas cujos quartos mamários atendiam aos pré-requisitos clínicos, incluindo o exame bacteriológico e a contagem de células somáticas do leite (vide página 29).

3.2 Etapa Específica

a. Colheita das amostras e composição dos grupos experimentais

Inicialmente foram colhidas amostras de quartos mamários de 9 búfalas que compuseram o Grupo 1 e, posteriormente, de outras 6 búfalas que constituíram o Grupo 2.

As búfalas do Grupo 1 foram selecionadas após terem sido submetidas à prova do CMT e ao exame microbiológico do leite, e obrigatoriamente os resultados deveriam ser negativos (vide etapa padrão).

Para os animais que constituíram o grupo 2 as características descritas para a seleção das búfalas do Grupo 1 foram acrescidas dos seguintes critérios: o leite das búfalas foi submetido a três exames bacteriológicos e CMT com intervalos, devendo, todos os resultados, serem negativos. Ressalte-se que as búfalas pertenciam a

mesma propriedade e estavam em idêntica fase da lactação (entre 10 e 60 dias da lactação) como detalhado na Figura 3.1.

Grupos	Critérios de inclusão amostral	Critérios de amostragem e provas realizadas
Grupo 1	CMT e exame bacteriológico negativos	Exame clínico CMT Exame bacteriológico CCS automática Contagem diferencial Viabilidade Índice de fagocitose Índice de espraimento
Grupo 2	Idem Grupo 1 + 3 exames bacteriológicos negativos antes da colheita lactação de 10 a 60 dias	Idem Grupo 1 + avaliação da liberação de peróxido de hidrogênio

Fig. 3.1 – Caracterização dos grupos experimentais segundo critérios de inclusão do animal na amostragem e provas realizadas.

As amostras foram colhidas em três alíquotas, duas foram descritas na etapa padrão e destinavam-se ao exame bacteriológico e a contagem automática de células somáticas do leite.

A terceira alíquota continha 500 mL de leite e destinava-se a obtenção de suspensão celular, com 2×10^6 células/mL como descrito no Capítulo 2, sendo colhida em frasco plástico cujo conteúdo era imediatamente filtrado em gaze ou nylon, e transferido para frasco de polipropileno para contar o volume de leite e igual (500 mL) de PBS gelado, resultando em mistura na proporção 1:1 / leite:PBS. As amostras acondicionadas adequadamente eram transportadas em continentes isotérmicos contendo gelo picado e papel toalha para impedir contato direto da amostra com o gelo e para preencher os espaços mortos. O sistema objetivava manter as amostras continuamente à 4°C (conforme descrito no Capítulo 2).

b. Preparo da suspensão celular

A obtenção da suspensão celular seguiu detalhadamente o processamento descrito no Capítulo 2, bem como a avaliação da concentração celular e o teste da viabilidade por exclusão do azul de tripan, foram conduzidos em idênticas condições.

c. Contagem diferencial por citocentrifugação

A contagem diferencial seguiu as diretrizes minuciosamente propostas no Capítulo 1.

d. Indução de hemólise

Para descartar a possibilidade de algumas hemácias contidas nas amostras da secreção láctea das búfalas poderem alterar os resultados, principalmente na prova de avaliação da liberação de peróxido de hidrogênio pela ação da peroxidase, na fase da manipulação das amostras foi adicionada substância indutora de hemólise sendo o sedimento ressuspendido em 1 mL dessa (vide solução de lise em Anexo) e, após 4 minutos, o volume era completado para 10 mL com RPMI, centrifugado por 10 minutos e submetido à avaliação da viabilidade.

e. Isolamento de leucócitos aderentes

Após ter sido ajustada a concentração de células da **suspensão celular** da amostra de leite de búfala, obtida na etapa de isolamento das células do leite e o

número de células acertado para 2×10^6 células/mL, essa suspensão passou a ser designada por **suspensão celular 1**.

As células mononucleares contidas na **suspensão celular 1** foram separadas das demais, explorando suas propriedades de aderência, sendo as células aderidas classificadas como macrófagos (CONCHA; HOLMBERG, 1990).

Conforme descrito por Rabinovitch e De Stefano (1973), nos poços de placas de poliestireno, com 24 poços de 16 mm de diâmetro foram colocadas lamínulas de vidro polidas de 13 mm de diâmetro, previamente lavadas, desengorduradas e enxaguadas. Nessa etapa, foi fundamental que além de limpas, não contivessem resíduos de detergente. As placas montadas com as lamínulas foram mantidas no fluxo laminar. Sobre as lamínulas foram depositados 200 μ L da **suspensão celular 1** (uma coluna, ou quarto poços, por amostra), no centro da lamínula, com extrema delicadeza para que a gota formada permanecesse sobre a lamínula.

f. Teste de espraiamento e teste de fagocitose

Após, o sistema para a aderência de leucócitos ser mantido em temperatura ambiente durante 30 minutos, as lamínulas foram lavadas duas vezes com 1,0 mL de RPMI 1640, enriquecido com 10% de soro fetal bovino.

Nas duas linhas inferiores da placa de poliestireno, onde fez-se a avaliação da fagocitose, adicionou-se 1mg de parede de células mortas de *Saccaromyces*

cerevisiae ou Zymosan¹ por poço. A seguir, as placas foram fechadas e incubadas a 37°C durante 1 hora, repetindo-se a dupla lavagem dos poços com RPMI 1640, com 10% de soro fetal bovino, sempre evitando que a lamínula ficasse seca para não prejudicar as células. A fixação após a dupla lavagem foi feita com glutaraldeído a 0,5%, durante 10 minutos (glutaraldeído era previamente diluído em 1,0 mL de água Milli-Q).

A observação das células espreiadas, a leitura das lamínulas em microscopia de contraste de fase, com magnitude de 600x, sendo os resultados expressos em porcentagem de células espreiadas.

A avaliação da fagocitose foi realizada pela observação das células da lamínula que fagocitaram as partículas de Zymosan, sendo a observação feita em microscopia de contraste de fase com aumento de 600x. Os resultados obtidos também foram expressos em porcentagem de células que fagocitaram as partículas de Zymosan.

g. Avaliação da liberação de peróxido de hidrogênio

Essa avaliação foi realizada exclusivamente com as amostras das búfalas que constituíram o Grupo 2.

A avaliação da liberação de peróxido de hidrogênio baseia-se na oxidação de fenol vermelho dependente de peroxidase, e foi realizada segundo o método colorimétrico descrito por Pick e Keisari (1980), adaptado para micro-ensaio por Pick

e Mizel (1981), e modificado por Russo [...], (1989), considerando-se o processamento a seguir detalhado.

A solução celular 1, era centrifugada durante 10 minutos com 450 g, à 4°C, sendo o sobrenadante desprezado e o botão celular formado, ressuspensionado em 1 mL de solução de fenol vermelho, constituindo a **suspensão celular 2** com 2×10^6 células/mL

Ressalte-se que a solução de fenol vermelho constituiu-se num dos itens detalhados nos Anexos.

A **suspensão celular 2** foi seqüencialmente diluída compondo novas suspensões contendo: $0,125 \times 10^6$ células/mL; $0,25 \times 10^6$ células/mL; $0,5 \times 10^6$ células/mL e 1×10^6 células/mL. Essas novas suspensões foram distribuídas em alíquotas de 100 μ L contendo $0,125 \times 10^5$ células/mL, $0,25 \times 10^5$ células/mL, $0,5 \times 10^5$ células/mL e 1×10^5 células/mL, respectivamente (Fig. 3.2).

Em uma placa para microcultura de poliestireno com 96 poços de fundo chato, existem 8 poços por coluna, os poços da primeira coluna receberam 100 μ L de solução de fenol vermelho constituindo a prova "em branco".

Na segunda e na terceira colunas foram colocadas em quadruplicatas, concentrações molares previamente conhecidas de H_2O_2 (0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 nmoles de H_2O_2 /100 μ L da Solução de Fenol Vermelho-SFV) que atuaram como a curva padrão de H_2O_2 .

Nas demais colunas foram adicionadas as soluções **celulares 2**, nas respectivas diluições, de cada amostra (uma diluição de cada amostra por coluna).

Nos quatro poços inferiores desta coluna também foram adicionados 10µL de forbol 12-miristrato 13-acetato (*Phorbol 12-Myristate 13-Acetate* - PMA) que atuou ativando as células. Este PMA foi, previamente, diluído na concentração de 10mg/mL de dimetil sulfoxido (DMSO), para a seguir 10 µL desta solução ser diluído em 1 mL de PBS, para que a concentração correspondesse a 10µg de PMA por mL de PBS.

A placa foi fechada e incubada por uma hora a 37°C, em câmara úmida. Após este período, a reação foi bloqueada pela adição, em cada poço, de 10µL de solução normal de NaOH, e a absorbância determinada em microleitor automático de ELISA, com filtro de 620 nm e o resultado expresso em nmoles/2×10⁵ células.

Figura 3.2 – Esquema de distribuição no ensaio de determinação da liberação de peróxido de hidrogênio na placa de 96 poços.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	→	◆	●	A 0,125	A 0,25	A 0,5	A 1	B 0,125	B 0,25	B 0,5	B 1	
B	→	◆	●	A 0,125	A 0,25	A 0,5	A 1	B 0,125	B 0,25	B 0,5	B 1	
C	→	◆	●	A 0,125	A 0,25	A 0,5	A 1	B 0,125	B 0,25	B 0,5	B 1	
D	→	◆	●	A 0,125	A 0,25	A 0,5	A 1	B 0,125	B 0,25	B 0,5	B 1	
E	→	●	■	A 0,125 + PMA	A 0,25 + PMA	A 0,5 + PMA	A 1 + PMA	B 0,125 + PMA	B 0,25 + PMA	B 0,5 + PMA	B 1 + PMA	
F	→	●	■	A 0,125 + PMA	A 0,25 + PMA	A 0,5 + PMA	A 1 + PMA	B 0,125 + PMA	B 0,25 + PMA	B 0,5 + PMA	B 1 + PMA	
G	→	●	■	A 0,125 + PMA	A 0,25 + PMA	A 0,5 + PMA	A 1 + PMA	B 0,125 + PMA	B 0,25 + PMA	B 0,5 + PMA	B 1 + PMA	
H	→	●	■	A 0,125 + PMA	A 0,25 + PMA	A 0,5 + PMA	A 1 + PMA	B 0,125 + PMA	B 0,25 + PMA	B 0,5 + PMA	B 1 + PMA	

→ = solução de fenol vermelho (SFV); ◆ = padrão contendo 0,5 nmoles de H₂O₂/100µL de SFV; ● = padrão contendo 1 nmoles de H₂O₂/100µL de SFV; ● = padrão contendo 2 nmoles de H₂O₂/100µL de SFV; ■ = padrão contendo 4 nmoles de H₂O₂/100µL de SFV; as letras maiúsculas correspondem às diferentes amostras (por colunas), que nas quatro últimas linhas foram acrescidas de PMA; a potência corresponde à diluição das amostras.

3.3 Análise estatística

De acordo com a distribuição dos dados analisados pela prova de Kolmogorov-Smirnov, foram considerados como dados paramétricos as seguintes variáveis: índice de viabilidade, porcentagens de macrófagos/monócitos e índice de fagocitose. Assim sendo foram inicialmente analisados pelo Teste F (análise de variância), e quando significativo, as médias foram confrontadas pelo teste de Duncan (SAMPAIO, 1998).

No caso de testes não-paramétricos as variáveis estudadas foram: polimorfonucleares neutrófilos, mononucleares linfócitos, índice de espraiamento, contagem de células somáticas e a liberação de peróxido de hidrogênio sem e com estimulação pelo PMA, e assim sendo os resultados foram avaliados pelo teste de Mann-Whitney (SIEGEL, 1975).

Quando necessário calculou-se o coeficiente de correlação de Pearson entre duas variáveis e a sua significância foi avaliada por meio da análise de variância (SNEDCOR; COCHRAN, 1967), utilizando para tal o *software* SAS (2001) e MINITAB (2000).

4. Resultados

Para avaliarem-se os parâmetros funcionais e citológicos de amostras de leite de búfalas sadias, determinou-se o número de células somáticas (células/mL de leite), a contagem diferencial das células (%), a viabilidade das células da secreção láctea (%), os índices de fagocitose (%) e de espraiamento dos macrófagos (%) e a determinação da liberação de peróxido de hidrogênio (nmoles 2×10^5 células) com estímulo e sem estímulo de PMA.

Quanto aos parâmetros citológicos, a mediana do número de células somáticas bem como as médias e desvios padrão dos valores relativos percentuais de monócitos/macrófagos e as medianas dos valores relativos dos polimorfonucleares neutrófilos e linfócitos das amostras colhidas de Búfalas foram: número de células somáticas, Grupo 1 - 24.000 células/mL; Grupo 2 - 12.000 células/mL; médias e desvios padrão dos valores relativos percentuais monócitos/macrófagos do Grupo 1 - 49,96% \pm 29,53 e do Grupo 2 - 61,43% \pm 15,26; medianas dos polimorfonucleares neutrófilos do Grupo 1 - 20,62% e do Grupo 2 - 36,0% e as medianas dos linfócitos do Grupo 1 - 3,81% e no Grupo 2 - 4,0%. A contagem de células somáticas foi superior no Grupo 1 ($p < 0,001$) em relação ao Grupo 2, ocorrendo o inverso quanto ao percentual de neutrófilos ($p < 0,05$) Esses resultados foram distribuídos na Tabela 3.1.

Dentre os parâmetros funcionais de viabilidade, índice de espraiamento e índice de fagocitose obtivemos: médias e desvios padrão da viabilidade do Grupos 1 - 70,05% \pm 18,08 e do Grupo 2 - 61,85% \pm 9,68; medianas do índice de

espraiamento do Grupo 1 - 22,17% e do Grupo 2 - 40,78% e médias e desvios padrão dos índices de fagocitose do Grupo 1 - 59,08% \pm 15,23 e do Grupo 2 - 57,63% \pm 9,76. Dessa etapa, a única diferença estatística ocorreu na avaliação dos índices de espraiamento que foi mais elevado no Grupo 2 ($p < 0,0003$). Esses resultados foram detalhados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Parâmetros funcionais e citológicos das células de amostras de leite de búfalas, hígdas, negativas ao exame microbiológico e CMT – São Paulo – 2002

	Grupo 1 (n)	Grupo 2 (n)	Significância
Contagem de células somáticas (células/mL)	24.000* (31) ^a	12.000* (21) ^b	P<0,001
Monócito/macrófago (%)	49,96 \pm 29,53 (35) ^a	61,43 \pm 15,26 (21) ^a	P>0,11
Polimorfonucleares Neutrófilos (%)	20,62* (35) ^b	36,00* (21) ^a	P<0,05
Linfócitos (%)	3,81* (35) ^a	4,0* (21) ^a	p>0,05
Viabilidade (%)	70,05 \pm 18,08 (28) ^a	61,85 \pm 9,68 (18) ^a	P>0,09
Fagocitose (%)	59,08 \pm 15,23 (34) ^a	57,63 \pm 9,76 (21) ^a	P> 0,7
Espraiamento (%)	22,17* (28) ^b	40,78* (21) ^a	P<0,0003

*=valores de medianas; letras distintas na mesma linha indicam diferenças estatísticas entre si.

Nas figuras 3.3 e 3.4 foram apresentadas imagens obtidas na microscopia por contraste de fase, nas provas *in vitro* de espraiamento e fagocitose de partículas de Zymosan, isentas de opsonização prévia, dos macrófagos do leite de búfalas hígdas, sem eliciação.



Figura 3.3 – Fotomicrografia de macrófago de leite de búfala, aderido e espreado *in vitro*, com projeções e vacúolos citoplasmáticos. Microscopia óptica de contraste de fase, aumento de 600x.

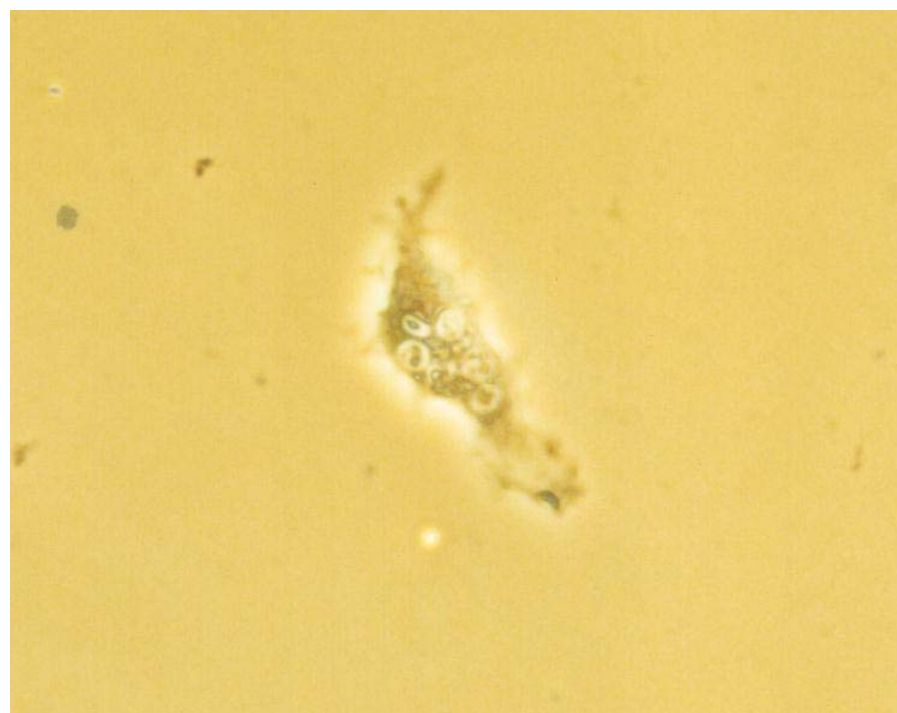


Figura 3.4 – Fotomicrografia de macrófago da secreção láctea de búfala, aderido *in vitro*, com presença de partículas de zymosan no interior do citoplasma, indicando fagocitose. Microscopia óptica de contraste de fase, aumento de 600x.

Das 21 amostras de leite do Grupo 2 em apenas 20 foram determinados os índices de liberação de peróxido de hidrogênio, com e sem estimulação do PMA, das células do leite de búfalas sadias, sem elicitção. Não houve diferença entre a liberação espontânea (sem estímulo do PMA) e induzida (com estímulo do PMA). Os resultados obtidos foram apresentados na tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Índices de fagocitose, de espraçamento e liberação de peróxido de hidrogênio com e sem estimulação *in vitro* de células do leite de búfalas híidas. Os resultados foram expressos em mediana, média, desvio padrão e coeficiente de variação – São Paulo – 2002

	Fagocitose	Espraçamento	Liberação de H ₂ O ₂	
	(%)	(%)	sem PMA (nmoles/2x 10 ⁵ células)	Com PMA (nmoles/2x 10 ⁵ células)
MD	59,5	30,0	6,20 ^a	7,74 ^a
Média	58,5	30,1	9,67 ^a	11,47 ^a
DP	13,3	16,9	8,95	10,75
CV	22,7%	56,1%	92,5 %	93,7 %
Nº	55	49	20	20

Letras iguais na mesma linha indicam resultados semelhantes, $p > 0,5$. MD: mediana; DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação de Pearson
Nº - números de amostras examinadas

As correlações entre as diferentes variáveis, observando-se os seguintes resultados entre os índices de fagocitose e espraçamento ($r = 0,463$; $p < 0,03$); índice de fagocitose e frequência de linfócitos ($r = 0,449$; $p < 0,04$); índice de espraçamento e liberação de peróxido de hidrogênio sem estimulação de PMA e com estimulação de PMA ($r = -0,542$; $p < 0,01$ e $r = -0,521$; $p < 0,02$, respectivamente); frequência de polimorfonucleares neutrófilos e liberação de peróxido de hidrogênio sem estimulação de PMA e com estimulação de PMA ($r = -0,463$; $p < 0,04$ e $r = -0,440$;

$p < 0,05$, respectivamente). Esses resultados foram detalhados na tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Relações entre as diversas variáveis das amostras dos animais que constituíram o grupo 2, analisadas na suspensão celular de leite de búfalas sadias – São Paulo – 2002

	Espraiamento	Fagocitose	H₂O₂ com PMA	H₂O₂ sem PMA
Nº de células somáticas	NS	NS	NS	NS
Monócito/ Macrófago	NS	NS	NS	NS
Polimorfonucleares Neutrófilo	NS	NS	r=-0,440 p<0,04	r=-0,463 p<0,04
Linfócito	NS	r=0,449 p<0,04	NS	NS
Espraiamento	-	r=0,463 p<0,03	r=-0,521 p<0,02	r=-0,543 p<0,01
Fagocitose	r=0,463 p<0,03	-	NS	NS
H₂O₂ com PMA	r=-0,521 p<0,02	NS	-	r=0,995 p<0,0001
H₂O₂ sem PMA	r=-0,543 p<0,01	NS	r=0,995 p<0,0001	-

NS = não significativa

5. Discussão

Assim como qualquer conduta para uma determinada doença passa pela necessidade de um adequado diagnóstico, o domínio das informações sobre os mecanismos imunológicos de um determinado organismo ou sistema, é fundamental para compreender a patogenia, a relação entre o hospedeiro e o parasito, bem como para se estabelecer uma expectativa de resposta do hospedeiro durante a evolução do processo e/ou tratamento.

Em seu trabalho de revisão sobre imunologia da glândula mamária de bovinos, Kehrli e Harp (2001) consideraram escassas as informações sobre o tema e muitas vezes permitiram-se comentar informações obtidas em outras espécies. Nesse experimento em bubalinos a escassez de estudos específicos mostrou-se ainda mais acentuada e, precisamos tomar como ponto de partida informações obtidas em estudos realizados com bovinos por mais que os autores supracitados as considerassem insuficientes. Em contrapartida, a exígua quantidade de trabalhos sobre a função de fagócitos, principalmente de macrófagos, em búfalos, torna os resultados desse experimento úteis para compreensão específica da glândula mamária bubalina, além de fazer com que trilhássemos caminhos muito iniciais, padronizando as técnicas e arriscando em muitas tentativas, que acreditamos ser o custo do ineditismo.

Apesar disso, antes de discutirmos os diferentes aspectos desse ensaio, precisamos contextualizá-lo com a observação de Mendes (1996) que considerou que, apesar das provas de avaliação da competência imunológica apresentarem várias indicações, sempre deverão ser interpretadas a luz do quadro clínico, compreensão essa que requer o domínio prévio do organismo hígado.

A contagem de células somáticas não poderia deixar de acompanhar a avaliação funcional (CONCHA, 2001) e servir de parâmetro de referência, junto com o exame microbiológico.

Nesse estudo, os 2 grupos, ou seja, todas as amostras, apresentaram baixas contagens, inferiores mesmo às consideradas para grupos experimentais de

macrófagos lácteos bovinos oriundos de vacas sadias (POLITIS [...], 1991; POLITIS [...], 1992). As amostras pareadas e com amostragem mais homogênea do Grupo 2 apresentaram uma contagem significativamente mais baixa, mas clinicamente sem diferença pois mamas cujos resultados das contagens de células somáticas do leite expressam 12.000 ou 24.000 células/mL, são consideradas igualmente sadias. Isso não contrapõem os resultados de Costa [...] (1997) nos quais o CMT não variou durante a lactação apesar do maior número de amostras positivas ao exame microbiológico no início da lactação, descritos por esses autores.

Apesar de confrontar os resultados das amostras do Grupo 2 com os de Costa [...] (1997) por esse grupo se restringir a amostras no início da lactação, a quantidade de amostras seria insuficiente para atribuir a diferença à fase da lactação, mas esse critério de amostragem para o Grupo 2 objetivou tornar o mesmo ainda mais homogêneo.

Outro fato que chama atenção seria a interpretação dos resultados da contagem de células somáticas comparando-os a situações semelhantes em bovinos, apresentados na literatura. Tomando o trabalho de Suriyasathapom [...] (2000) como referência, observamos que os autores retratam uma preocupação com a possibilidade da baixa celularidade do leite bovino representar um aumento do risco de mamite e esses resultados segundo os autores, representariam animais mantidos em condições higiênico-sanitárias muito controladas e criatórios muito especializados. As búfalas desse estudo pertenciam a rebanhos comuns, com ordenha manual, sem realização de imersão em anti-séptico no final da ordenha

(*pós-dipping*), tratamento com antimicrobianos no período de secagem (tratamento da vaca seca) e com açudes para que os animais imergissem (potencial fonte de infecção). Não identificamos nenhuma dificuldade em obter amostras sem crescimento bacteriano, além de não existir nenhum animal com alterações físicas de processo inflamatório agudo da glândula mamária durante este estudo. Muito pelo contrário, como descrito no Capítulo 2, nossa maior dificuldade foi atingir a concentração necessária de células viáveis para a execução das provas, após o que, para algumas avaliações como a da liberação de peróxido de hidrogênio, com ou sem estimulação, houve necessidade de diminuir a concentração celular usada na prova por serem muito responsivas.

O macrófago foi o tipo celular predominante em leite de glândulas mamárias bubalinas sadias como descrito no Capítulo 1, seguindo o esperado em glândulas mamárias de bovinos (LEE [...], 1980; JENSEN; EBERHART, 1981; ÖSTENSSON, 1993). Após os macrófagos vieram os neutrófilos e por fim os linfócitos. Os polimorfonucleares eosinófilos foram raros e outros tipos celulares não foram identificados pela técnica aqui empregada. Houve diferença entre os valores relativos de neutrófilos, que foram maiores no Grupo 2, apesar desse grupo apresentar uma contagem de células somáticas menor. Consideramos que essa diferença também possa representar pequena importância clínica mas não imunológica, pois o Grupo 2 apresentou menos células (menor CCS), além de um maior valor relativo de neutrófilos e de espiamento (macrófagos mais ativados), talvez por que os macrófagos mobilizando mais neutrófilos manteriam funções fagocitárias mais

disponíveis que garantiriam até um limiar de baixa celularidade, ou o contrário, macrófagos mais ativados poderiam ser mantidos em menor número, o que aumentaria o valor relativo dos neutrófilos.

O macrófago independentemente da origem é uma célula com múltiplas funções (ELGERT, 1996), e o macrófago lácteo, pode ser avaliado de várias formas como vêm sendo descrito para bovinos (CONCHA; HOLMBERG, 1990; POLITIS [...], 1992). As provas de avaliação funcional dessas células em bubalinos empregadas nesse trabalho priorizaram direta e indiretamente a fagocitose (espraiamento, fagocitose e explosão respiratória).

O espraiamento é uma prova de função macrofágica definida por Russo [...] (1989) como uma tentativa frustrada de fagocitose. Consideramos que esse tipo avaliação, na qual não há substrato disponível para fagocitar e portanto, nada com o que se frustrar, referiria mais propriamente que essa célula está apta a exercer suas funções, está em atividade, responsiva a manifestar uma característica, no caso, aderir à lâmina e emitir microvilos (Fig. 3.3).

Foram necessárias adaptações às técnicas descritas para a determinação dos índices de espraiamento e fagocitose de leucócitos aderidos, pois, até onde temos conhecimento, os únicos autores, que empregaram a avaliação do espraiamento, foram Desiderio e Campbell (1980) cujo objetivo foi obter macrófagos em quantidade adequada de vacas secas, sem elicitacão e estudar suas características para usar esse macrófago para modelo experimental como alternativa aos obtidos de animais de laboratório. Para que esta pesquisa fosse realizada, foi necessário

padronizar a recuperação das células presentes no leite (Capítulo 1 e 2), após o que, utilizaram-se as técnicas adaptadas por Mori (2000) para macrófagos alveolares de eqüinos.

A ativação do macrófago é importante porque a maioria das suas funções não é manifestada em repouso e depende da sua ativação para expressá-las (POLITIS [...], 1992).

Nesse estudo, sem elicitación prévia, avaliaram-se amostras de leite sem indícios de inflamação e de infecção, cujo único estímulo foi aplicado *in vitro*. Obtivemos valores superiores aos descritos para macrófagos alveolares de eqüinos sadios obtidos por Mori (2000) através de lavado broncoalveolar (LBA), em ratos (LOUREIRO, 1997) e hamsters (SOUZA, 1996), também sem elicitación prévia, principalmente no Grupo 2.

As alterações morfológicas observadas nos macrófagos lácteos de bubalinos em lactação, espriados, foram semelhantes às citadas em outras espécies (DESIDERIO; CAMPBELL, 1980; MORI, 2000; MASSOCO, 1998; LOUREIRO, 1997; SOUZA, 1996), pois também encontramos células alongadas ou não, com dois tipos principais de extensões celulares, os pseudópodes longos terminando com microfilamentos de fixação e os pequenos ou microfilamentos (DESIDERIO; CAMPBELL, 1980).

Quanto à avaliação da fagocitose de partículas de Zymosan, por células aderidas – macrófagos lácteos provenientes de glândulas mamárias bubalinas sadias e sem elicitación prévia, obtivemos resultados que mostraram ser altamente

responsivos a resposta imune celular inata dos macrófagos, mesmo sem antecedentes de estímulo, embora os resultados obtidos tenham sido aparentemente inferiores aos descritos por Mori (2000) para macrófagos alveolares eqüinos.

De todas as análises, a determinação dos índices de fagocitose mostrou resultados mais homogêneos (com menor coeficiente de variação), corroborados pela correlação positiva entre os índices de fagocitose e espraimento e entre os valores percentuais de fagocitose e de linfócitos. Isso é muito interessante porque a prova mostrou ser eficiente para avaliar uma função importante não apenas pela fagocitose propriamente dita mas também por que a mesma, precede mecanismos de apresentação de antígeno (POLITIS [...], 1992) e microbicidas (SANDGREN [...], 1991).

Nas técnicas anteriormente descritas (fagocitose e espraimento), os macrófagos tiveram seu predomínio acentuado com a remoção das células não aderentes à lamínula no transcorrer do processo. Na avaliação da liberação de peróxido de hidrogênio, isso não ocorreu e os valores obtidos devem ser atribuídos a todos os fagócitos presentes (SANDGREN [...], 1991).

Seguindo metodologias para a determinação da liberação de H_2O_2 anteriormente descritas para avaliação funcional de macrófagos de diferentes espécies animais e sistemas orgânicos, observou-se que, apesar da predominância dos macrófagos ser equivalente, tanto em glândulas mamárias híidas como em lavado broncoalveolar (LBA) de eqüinos (MORI, 2000), a suspensão anteriormente proposta apresentava uma liberação que superava os valores contidos nos intervalos

da curva padrão e portanto, impediam a conversão dos valores e tornando necessária a diluição da amostra para diminuir a concentração celular.

Esses resultados não deixam dúvidas quanto à atividade dos macrófagos lácteos residentes, na ausência de estímulos elicitadores como, também descrito por Mori (2000) para macrófagos alveolares eqüinos. A correlação negativa com os valores percentuais de neutrófilos talvez tenha ocorrido pela já citada independência entre a quantidade dos neutrófilos e qualidade da atividade dos mesmos.

Os altos valores encontrados em nmoles/ 2×10^5 células lácteas é compreensível pelo alto valor relativo de neutrófilos nas amostras. A predominância de macrófagos no leite de búfalas e no lavado broncoalveolar do grupo controle dos eqüinos examinados por Mori (2000) foi semelhante e nesse último também não foi incluída uma etapa de purificação da suspensão celular quanto ao tipo celular. A interferência dessa heterogeneidade da população celular talvez tenha causado uma menor interferência pelo fato da quantidade relativa de neutrófilos no lavado broncoalveolar ter sido menor que a identificada nesse ensaio experimental.

A falta de diferença na liberação de H_2O_2 com e sem estímulo de PMA pode significar que a liberação espontânea dos fagócitos do leite de búfalas hígidas já seria mantida no limite máximo e portanto indiferente ao estímulo do PMA. Caso a heterogeneidade celular, fosse a única causadora do aumento da liberação, essa, por mais alta que fosse, seria responsiva e identificada em uma das diluições celulares testadas.

Esse achado não acompanha os descritos para bovino sem que se considerou uma

menor atividade dos mecanismos microbicidas dependentes de oxigênio no início da lactação que poderia, inclusive, estar associado a uma maior susceptibilidade à mamite nessa época (SANDGREN [...], 1991).

A contagem de células somáticas não manifestou correlação com nenhuma das variáveis funcionais mostrando ser possível uma variação individual significativa dessas células como já sugerido por Concha (1990) avaliando a função dos macrófagos de bovinos através da determinação do grau de estimulação linfocitária. No trabalho de Concha (1990), o autor também sugere que a diversidade funcional dos macrófagos poderia ser atribuída a diversidade de subpopulações de macrófagos.

Por outro lado, os índices de espraimento considerados correspondentes à ativação macrofágica, apresentaram correlação positiva com a fagocitose (quanto mais ativado, mais fagocitativa) e com os valores percentuais de linfócitos, células essas também envolvidas nos processos de ativação. Houve correlação negativa do espraimento com a liberação de peróxido de hidrogênio. Essa última análise poderia significar que quanto mais ativado, menor a liberação de peróxido de hidrogênio mas, dada a heterogeneidade de células liberando peróxido de hidrogênio, não seria possível comparar exclusivamente com uma função macrofágica, nem mesmo neutrofílica (também houve correlação negativa entre neutrófilos e liberação de peróxido de hidrogênio) mas de uma interação entre todas as populações celulares presentes.

As técnicas para determinação dos índices de espraimento, fagocitose e

liberação de peróxido de hidrogênio se mostraram factíveis em células provenientes do leite de búfalas híidas e sem elicitção prévia, estando as mesmas padronizadas para as diferentes aplicações.

6. Conclusões

As condições estabelecidas pelo delineamento experimental, pelo qual avaliou-se a atividade funcional dos macrófagos da secreção láctea de búfalas (*Bubalus bubalis*) híidas, criadas no Estado de São Paulo permitiram as conclusões detalhadas a seguir.

1. Os macrófagos aderidos de amostras de secreção láctea de búfalas sadias e colhidas no início da lactação, apresentaram evidente espraiamento, além de manterem correlação positiva com a liberação de peróxido de hidrogênio.
2. Mais da metade dos macrófagos do leite de búfalas aderidos fagocitaram partículas de zymosan.
3. Os fagócitos da secreção láctea de búfalas mantiveram a capacidade máxima de liberar peróxido de hidrogênio, espontaneamente ou não, com uma significativa variação dos resultados individuais das amostras.

Referências

BIRGEL, E. H. Avaliação das provas utilizadas no diagnóstico da mamite bovina. In: BIRGEL, E. H.; LARSSON, M. H. M. A.; HAGIWARA, M. K.; VASCONCELLOS, S. A.; LARSSON, C. E.; OGASSAWARA, S.; BENESI, F. J. **Patologia clínica veterinária**, São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982, p. 177-213.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. **Bioquímica ilustrada**, 2 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1996.

CONCHA, C. **Activity of leukocytes in bovine mammary secretion and their responsiveness to mitogens and Ginseng saponin**. Uppsala, Sweden, 2001. 81 p. Tese (Doctor) - University of Agricultural Sciences, Faculty of Veterinary Medicine Swedish University of Agricultural Sciences.

CONCHA, C.; HOLMBERG, O. Ability of bovine mammary macrophages to enhance proliferation of autologous blood and mammary secretion lymphocytes. **Journal of Dairy Research**, v. 57, p. 7-16, 1990.

COSTA, E. O.; GARINO Jr, F.; WATANABE, E. T.; RIBEIRO, A. R.; SILVA, J.; VEZON, P.; GABALDI, S. H.; BENITES, N. R.; BARUSELLI, P. S.; PASKE, A. Evaluation of the CMT positivity and the microbiologic status of the mammary gland over the different lactation phases in buffalo cows (*Bubalus bubalis*) In: World Buffalo Congress, 5., 1997, Caserta, **Anais...** Caserta: 1997a, p. 631-634.

CRAVEN, N. Generation of neutrophil chemoattractants by phagocytosing bovine mammary macrophages. **Research Veterinary Science**, v. 35, p. 310-317, 1983.

CRAVEN, N.; WILLIAMS, M. R. Defenses of the bovine mammary gland against infection and prospects for their enhancement. **Veterinary Immunology and Immunophatology**, v. 10, p. 71-127, 1985.

DESIDERIO, J. V.; CAMPBELL, S. G. Bovine mammary gland macrophage: Isolation, morphologic features, and cytophilic immunoglobulins. **American Journal Veterinary Research**, v. 41, n. 10, p. 1595-1599, 1980.

DHAKAL, J. P.; KAPUR, M. P.; BHARDWAY, J. R. M. Diagnosis of subclinical mastitis in buffaloes using somatic and viable cell counts. **Indian Journal of Dairy Science**, v. 44, n. 9. 1991.

ELGERT, K. D. **Immunology**. Understanding the Immune System. Wiley-Less, 1996.

HARMON, R. J.; EBERHART, D. E.; JASPER, B. E.; LANGLOIS, B. E.; WILSON, R. A. Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infections, ed.3 Arlington, VA, **National Mastitis Council**, 1990.

JENSEN, D. L.; EBERHART, R. J. Total and differential cell counts in secretions of the nonlactating bovine mammary gland. **American Journal Veterinary Research**, v. 42, p. 743-747, 1981.

LEE, C.; WOODING, F. B.; KEMP, P. Identification, properties, and differential counts of cell populations using microscopy of dry cows secretions, colostrum and milk from normal cows. **Journal of Dairy Research**, v. 47, p. 39-50, 1980.

LOUREIRO, M. I. **Estudo das hipovolemias em pequenos animais**. São Paulo, 1997. 77 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

MASSOCO, C. O. **Efeitos da diazepam sobre a atividade de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/C**. São Paulo, 1998. 109 p. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP.

Mc DONALD, J. S.; ANDERSON, A. J. Total and differential somatic cell count in secretions from noninfected bovine mammary glands: the early nonlactating period. **American Journal Veterinary Research**, v. 42, n. 8, p. 1360-1365, 1981.

MENDES. Avaliação Imunológica In: **VERONESI: Tratado de infectologia** / Ed Ricardo Veronesi, Roberto Focaccia – São Paulo: Editora Atheneu, p. 30-32, 1996.

MORI, E. **Avaliação da função dos macrófagos alveolares após infecção experimental em cavalos (*Equus caballus* – Linnaeus, 1758) por Herpesvírus eqüino tipo 1 (HVE-1)**. 2000, 98 p. Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo.

NATHAN, C. F.; ROOT, R. K. Hydrogen peroxide release from mouse peritoneal macrophages: dependence on sequential activation and triggering. **Journal of Experimental Medicine**, v. 146, n. 6, p. 1648-1662, 1977.

NONNECKE, B. J.; KEHRLI JR, M. E. Isolation of mononuclear cells from bovine milk by continuous-flow and density gradient centrifugation: Response cells to mitogens. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, n. 6, p. 1259-1262, 1985.

ÖSTENSSON, K. **Trafficking of leukocytes and immunoglobulin isotypes in the bovine udder**. Studies of milk, lymph and blood from cows with healthy and mastitic mammary glands. Uppsala, Sweden, 1993. 67 p. Tese (Doctor) - University of Agricultural Sciences, Faculty of Veterinary Medicine Swedish University of Agricultural Sciences.

OUTERRIDGE, P. M.; LEE, C. S. The defence mechanisms of the mammary gland of domestic ruminants. **Prog Vet Microbiol Immunology**, v. 4, p. 165-196, 1988.

PAAPE, M. J.; GILDY, A. J.; JAIN, N. V.; MILLER, R. H. Leukocytic defense mechanisms in the udder In: BURVENICH, C.; VANDEPUTTE-VAN MESSON, G.; HILL, A. W. (ed.). **New insights into the pathogenesis of mastitis**. Gent, Rijksuniversiteit, p. 95-105, 1991.

PICCININI, R.; BRONZO, V.; MORONI, P.; LUZZAGO, C.; ZECCONI, A. Study on the relationship between milk immune factors and *Staphylococcus aureus* intramammary infections in dairy cows. **Journal of Dairy Research**, v. 66, p. 501-510, 1999.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **Journal of Immunological Methods**, v. 38, n. 1-2, p. 161-70, 1980.

PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassays for measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **Journ of Immunol. Methods**, v. 46, n. 2, p. 211-26, 1981.

POLITIS, I.; HIDIROGLOU, N.; WHITE, J. H.; GILMORE, J. A.; WILLIAMS, S. N.; SCHERF, H.; FRIGG, M. Effects of vitamin E on mammary and blood leukocyte function, with emphasis on chemotaxis, in periparturient dairy cows. **American Journal Veterinary Research**, v. 57, p. 468-471, 1996.

POLITIS, I.; MCBRIDE, B. W.; BURTON, J. H.; ZHAO, X.; TURNER, J. D. Secretion of interleukin-1 by bovine milk macrophages. **American Journal Veterinary Research**, v. 52, n. 6, 1991.

POLITIS, I.; ZHAO, X.; MCBRIDE, B. W.; BURTON, J. H. Function of bovine mammary macrophages as antigen-presenting cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 30, p. 399-410, 1992.

RABINOVITCH, M.; De STEFANO, M. J. Macrophage spreading in vitro I. Inducers of spreading. **Experimental Cell Research**, v. 77, p. 323-324, 1973.

RAINARD, P.; POUTREL, B. Generation of complement fragment C5a in milk is variable among cows. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 945-951, 2000.

RUSSO, M.; TEIXEIRA, H. C.; MARCONDES, M. C.; BARBUTO, J. A. Superoxide-independent hydrogen peroxide release by activated macrophages. **Brazilian Journal Medical Biological Research**, v. 22, n. 10, p. 1271-1273, 1989.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1998. 221 p.

SANDGREN, C. H.; NORDLING, K.; BJÖRK, I. Isolation and phagocytic properties of neutrophils and other phagocytes from nonmastitic bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 2965-2975, 1991.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide: statistics**. Cary, SAS Institute, 2001. 956 p.

SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. O. Experiments and observations leading to development of the California mastitis test. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 130, n. 5, p. 199, 1957.

SHUKLA, P. C.; SUPEKAR, P. G. Cell count in milk samples of normal and mastitic animals. **Livestock Adviser**, v. 12, n. 12, p. 44-48, 1987.

SIEGEL, S. **Estatística não-paramétrica**. São Paulo: McGraw-Hill, 1975. 350 p.

SILVA, I. D. **Functional efficiency of buffalo neutrophils** In: PERERA, B. M. A. D. (ed.); SIRIWARDENE, J. A. de S. (ed.); HORADAGODA, N. U. (ed.); IBRAHIM, M. N. M. Role of the buffalo development in Asia. Proceedings of a regional symposium, Peradeniya Sri Lanka, 10-15 December 1995. p. 457-71; 31 refs. NARESA Press; Colombo 7; Sri Lanka, 1996.

SILVA, I. Phagocytic efficiency of buffalo (*Bubalus bubalis*) blood neutrophils for common mammary pathogens. **Buffalo Journal**, v. 9, n. 2, p. 181-185, 1993.

SILVA, I; KARIYAWASAM, S. Postphagocytic bactericidal activity of buffalo (*Bubalus bubalis*) neutrophils against mastitis causing bacteria. **Journal of the National Science Council of Sri Lanka**, v. 24, n. 2, p. 71-80, 1996.

SNEDCOR, G. W.; COCHRAN, W. G. **Statistical methods**. 6th ed. Ames: Iowa State University press, 1967. 593 p.

SORDILLO, L. M.; NICKERSON, S. C. Morphologic changes in the bovine mammary gland during involution and lactogenesis. **American Journal Veterinary Research**, v. 49, p. 1112-1120, 1988.

SORDILLO, L. M.; SHAFER-WEAVER, K., DeROSA, D. Immunobiology of the mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 1851-1865, 1997.

SOUZA, N.L. **Aspectos da resposta inflamatória crônica induzida pelo BCG em hamsters e a influência de hormônios sexuais**. São Paulo, 1996. 75 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

SURIYASATHAPOM, W.; SCHUKKEN, Y. H.; NIELEN, M.; BRAND, A. Low somatic cell count: a risk factor for subsequent clinical mastitis in dairy herd. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1248-1255, 2000.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária: Uma introdução**. 6^a ed. São Paulo: Roca, 2002, 532 p.

Referências

- ARAUJO, W. P. **Constituição Físico-química, celular e microbiológica de leites tipo A, B e especial colhidos de vacas criadas no Estado de São Paulo.** Contribuição à semiologia da glândula mamária. São Paulo, 1994. 54 p. Tese (Livre-Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- BADRAN, A. E. Genetic and environmental effects on mastitis disease in egyptian cow and buffalo. **Indian Journal Dairy Science**, v. 38, p. 230-234, 1985.
- BANSAL, B. K.; SINGH, K. B. Incidence of clinical mastitis in dairy animal. **Indian Dairy Science**, n. 43, v. 3, p. 162-165, 1990.
- BEHRA, G. D.; DWIVEDI, J. N. Comparison of mastitis screening test of milk and histopathology of udder of buffalo. **Indian Veterinary Journal**, v. 59, p. 592-596, 1982.
- BIRGEL, E. H. Avaliação das provas utilizadas no diagnóstico da mastite bovina. In: BIRGEL, E. H.; LARSSON, M. H. M. A.; HAGIWARA, M. K.; VASCONCELLOS, S. A.; LARSSON, C. E.; OGASSAWARA, S.; BENESI, F. J. **Patologia clínica veterinária**, São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982, p. 177-213.
- CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. **Bioquímica ilustrada**, 2 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1996.
- CONCHA, C. **Activity of leukocytes in bovine mammary secretion and their responsiveness to mitogens and Ginseng saponin.** Uppsala, Sweden, 2001. 81 p. Tese (Doctor) - University of Agricultural Sciences, Faculty of Veterinary Medicine Swedish University of Agricultural Sciences.
- CONCHA, C.; HOLMBERG, O. Ability of bovine mammary macrophages to enhance proliferation of autologous blood and mammary secretion lymphocytes. **Journal of Dairy Research**, v. 57, p.7-16, 1990.
- COSTA, E. O. Importância econômica da mastite infecciosa bovina. **Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 15, n. 1, p. 21-26, 1991.

COSTA, E. O.; GARINO Jr, F.; WATANABE, E. T.; RIBEIRO, A. R.; SILVA, J.; VEZON, P.; GABALDI, S. H.; BENITES, N. R.; BARUSELLI, P. S.; PASKE, A. Evaluation of the CMT positivity and the microbiologic status of the mammary gland over the different lactation phases in buffalo cows (*Bubalus bubalis*) In: World Buffalo Congress, 5., 1997a, Caserta. **Anais...**, Caserta, 1997. p. 631-634.

COSTA, E. O.; GARINO Jr, F.; WATANABE, E. T.; RIBEIRO, A. R.; VEZON, P.; BARUSELLI, P. S.; PASKE, A. Study of mastitis among ten dairy buffaloes herds (*Bubalus bubalis*) in the Vale do Ribeira (Ribeira River Valley) São Paulo. Brazil. In: World Buffalo Congress, 5., 1997a, Caserta. **Anais...**, Caserta, 1997. p.635-638.

COSTA, E. O.; WATANABE, E. T.; RIBEIRO, A. R.; GARINO Jr; HORIUTI, A. M.; BARUSELLI, P. S. Mastite bubalina: etiologia, índices de mastite clínica e subclínica **NAPGAMA**, n. 1, p. 13-15, 2000.

DHILLON, K. S.; SINGH, T. J.; SONDHAI, S. S. et al. Milk bacteriology: preand post-trisodium citrate mastitis treatment in buffaloes. **Indian Journal Animal Science**, v. 65, p. 9-11, 1995.

ELGERT, K. D. **Immunology**. Understanding the immune system. Wiley-Less, p. 30-32, 1996.

FAGLIARI, J. J.; LUCAS, A.; FERREIRA NETO, J. M. Estudo preliminar das mastites bovinas nos rebanhos leiteiros de Ilha Solteira-SP. **Ciência Veterinária**, v. 3, p. 1-2, 1989.

FAO. Faostat agriculture data (Agricultural production – live animals). Disponível em <<http://apps.fao.org>>. Acesso em: 27 de outubro de 2002.

HARMON, R. J.; EBERHART, D. E.; JASPER, B. E.; LANGLOIS, B. E.; WILSON, R. A. Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infections, ed.3 Arlington, VA, **National Mastitis Council**, 1990.

HONÓRIO, A. C. Atividade bactericida dos fagócitos do colostro humano para a *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC). Dissertação (mestrado) ICB/Imunologia, 1995, 104 p.

HU, S.; CONCHA, C.; COORAY, R.; HOLMBERG, O. Ginseng-enhanced oxidative and phagocytic activities of polymorphonuclear leucocytes from bovine peripheral blood and stripping milk. **Veterinary Research**, v. 26, p. 155-161, 1995.

IBGE. Banco de dados agregados – Sistema IBGE de recuperação automática – SIDRA. Disponível em <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em 27 de outubro de 2002.

JENSEN, D. L.; EBERHART, R. J. Total and differential cell counts in secretions of the nonlactating bovine mammary gland. **American Journal Veterinary Research**, v. 42, p. 743-747, 1981.

KAPUR, M. P.; SINGH, R. P. Studies on clinic cases of mastitis in cows, buffaloes and goats Haryana State. **Indian Veterinary Journal**, v. 55, p. 803-806, 1978.

KEHRLI, M. E.; HARP, J. A. Immunity in the mammary gland. **Veterinary Clinics of North America: Food animal practice**, v. 17, n. 3, p. 495-515, 2001.

LÁU, H. D.; SINGH, N. P.; HESS, S. J. Comparação de testes indiretos no diagnóstico de mastite subclínica em búfalas. **Boletim de Pesquisa - Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Úmido**, n. 77, p. 5-13, 1986.

LÁU, H.D. Important economic diseases in buffaloes. In: World Buffalo Congress, 4., 1994, **Anais...** São Paulo: Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, 1994. p. 209-220.

LEE, C.; WOODING, F. B.; KEMP, P. Identification, properties, and differential counts of cell populations using microscopy of dry cows secretions, colostrum and milk from normal cows. **Journal of Dairy Research**, v. 47, p. 39-50, 1980.

MACEDO, M. P.; WECHSLER, F. S.; RAMOS, A. A.; AMARAL, J. B.; SOUZA, J. C.; RESENDE, F. D.; OLIVEIRA, J. V. Composição físico-química e produção do leite de búfalas da raça mediterrâneo no oeste do Estado de São Paulo. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 30, n. 3, p. 1084-1088, supl. 1, 2001.

MALLARD, B. A.; DEKKERS, J. C.; IRELAND, M. J.; LESLIE, K. E.; SHARIF, S.; VANKAMPEN, C. L.; WAGTER, L.; WILKIE, B. N. Alterations in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 585-595, 1998.

MENDES. Avaliação Imunológica In: **VERONESI: Tratado de infectologia** / Ed Ricardo Veronesi, Roberto Focaccia – São Paulo: Editora Atheneu, p. 30-32, 1996.

NAG, N. C. Staphylococcal mastitis in cows, buffaloes and goats and their antibiotic sensitivity. **Indian Journal Animal Health**, v. 14, p. 169-173, 1995.

NICKERSON, S. C. Bovine mammary gland: structure and function; relationship to milk production and immunity to mastitis. **Agri-Practice**, v. 15, n. 6, p. 8-18, 1994.

NONNECKE, B. J.; KEHRLI JR, M. E. Isolation of mononuclear cells from bovine milk by continuous-flow and density gradient centrifugation: Response cells to nitrogens. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, n. 6, p. 1259-1262, 1985.

NORCROSS, N. L. Specific defense mechanisms of the udder. **Flem. Vet. Journal**, v. 62, Suppl. 1, p. 129-139, 1996.

ÖSTENSSON, K. **Trafficking of leukocytes and immunoglobulin isotypes in the bovine udder**. Studies of milk, lymph and blood from cows with healthy and mastitic mammary glands. Uppsala, Sweden, 1993. 67 p. Tese (Doctor) - University of Agricultural Sciences, Faculty of Veterinary Medicine Swedish University of Agricultural Sciences.

PAAPE, M. J.; GILDY, A. J.; JAIN, N. V.; MILLER, R. H. Leukocytic defense mechanisms in the udder In: BURVENICH, C.; VANDEPUTTE-VAN MESSON, G.; HILL, A. W. (ed.). **New insights into the pathogenesis of mastitis**. Gent, Rijksuniversiteit, p. 95-105, 1991.

POLITIS, I.; McBRIDE, B. W.; BURTON, J. H.; ZHAO, X.; TURNER, J. D. Secretion of interleukin-1 by bovine milk macrophages. **American Journal Veterinary Research**, v. 52, n. 6, p. 858-862, 1991a.

POLITIS, I.; ZHAO, X.; McBRIDE, B. W.; BURTON, J. H. Examination of chemotactic properties of bovine mammary macrophages. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 55, p. 321-324, 1991b.

POLITIS, I.; ZHAO, X.; McBRIDE, B. W.; BURTON, J. H. Function of bovine mammary macrophages as antigen-presenting cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 30, p. 399-410, 1992.

POLITIS, I.; ZHAO, X.; McBRIDE, B. W.; BURTON, J. H.; TURNER, J. D. Plasminogen activator production by milk macrophages and blood monocytes. **American Journal Veterinary Research**, v. 52, n. 8, p. 1208-1213, 1991c.

RAINARD, P.; POUTREL, B. Generation of complement fragment C5a in milk is variable among cows. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 945-951, 2000.

SAINI, S. S.; SHARMA, J. K.; KWATRA, M. S. Prevalence and etiology of subclinical mastitis among crossbred cows and buffaloes in Punjab. **Indian Journal Dairy Science**, v. 47, p. 103-106, 1994.

SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. O. Experiments and observations leading to development of the California mastitis test. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 130, n. 5, p. 199, 1957.

SEARS, P. M.; GONZALES, R. N.; WILSON, D. J.; HAN, H. R. Procedures for Mastitis Diagnosis and Control. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 9, n. 3, p. 445-468, 1993

SHUKLA, P. C.; SUPEKAR, P. G. Cell count in milk samples of normal and mastitis animals. **Livestock Adviser**, v. 12, n. 12, p. 44-48; 1987.

SILVA, I. D.; SILVA, K. F. S. T. Total and differential cell counts in buffalo (*Bubalus bubalis*) milk. **Buffalo Journal**, v. 10, n. 2, p. 133-137, 1994.

SORDILLO, L. M.; SHAFER-WEAVER, K.; DeROSA, D. Immunology of the mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 1851-1865, 1997.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária: Uma introdução**. 6 ed. São Paulo: Roca, 2002, 532 p.

VALE, W. G. Water buffalo – a world uptake. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 22., 2002. Hannover. **Abstracts...** Hannover: World Association for Buiatrics, 2002. p. 203.

VIANNI, M. C. E.; NADER FILHO, A.; ROSSETTI, D. J. G.; LONGHI, J. L.; SICHER, M. Eficiência do *California Mastitis Test* (CMT) na estimativa do número de células somáticas do leite bubalino. **Ciência Veterinária** – Jaboticabal, v. 4, n. 2, p. 3-4, 1990.

AMEXOS

ANEXO

- Preparo das soluções e reagentes

Preparo da Solução de PBS (concentrada 10 vezes)

Na ₂ HPO ₄ .7 H ₂ O	26,79 g
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	4,14 g
NaCl	82,0 g
Água Milli-Q qsp	1000,0 mL

No momento do uso, esta solução de estoque (concentrada 10 vezes) deve ser diluída na proporção de 1:10 em água Milli-Q, mantendo-se o pH da solução final entre 7,2 e 7,4.

Preparo da Solução de Glutaraldeído (fixador)

Glutaraldeído 25% (NUCLEAR [®])	2 mL
RPMI 1640 (GIBCO BRL [®] 31800-04) + 10% SFB – soro fetal bovino (GIBCO BRL [®] 10270-106)	98 mL

Preparo da Solução de Zymosan-A (SIGMA[®] Z4250)

No preparo desta solução utilizou-se 20 mg de Zymosan-A para 1 mL de PBS, fervendo-se a mistura por uma hora sob constante agitação. A suspensão obtida foi lavada (PBS) e centrifugada 5 X a 450 G, sendo sua concentração final ajustada para 50 mg/mL com PBS.

RPMI (1640)

Obs.: trabalhar sob fluxo laminar em adequadas condições de anti-sepsia, vidrarias e complementos previamente esterilizados.

Dissolver o conteúdo do RPMI em 600 mL de água Milli-Q estéril.

Acrescentar 2 g Na H CO₃

Acertar o pH para 6,8 (6,8-7,0) com NaOH 1N ou HCl 1N.

Ajustar o volume para 1l

Filtrar em unidade filtrante descartável com membrana durapore GV 0,022 µm de poro.

Conservar na geladeira.

Preparo da Solução de Fenol Vermelho (SFV)¹

Peroxidase (SIGMA® P8250) concentração 5 mg/mL PBS

Pegar 100 µL desta solução e acrescentar

à 900 µL de PBS (Massoco, 1998)	0,1 mL (100 µL)
Solução A	0,8 mL (800 µL)
Solução B	0,1 mL (100 µL)
Solução C	0,1 mL (100 µL)
"Phenol Red Solution" 0,5 % (SIGMA® P0290)	0,2 mL (200 µL)
Glicose 10 %	0,1 mL (100 µL)
Água Milli-Q	8,6 mL (860 µL)

Solução de Peroxidase

(8250 – Sigma® – 25.000 units)

Pesar 5 mg e diluir em 1 mL de PBS. Desta solução, pegar 100 µL e diluir em 900 µL de PBS. Aliquotar 100 µL em ependorfs embalados em papel alumínio para estar pronta para uso (ser incluída na solução de fenol vermelho com descrito acima).

Preparo da Solução A

NaCl (SYNTH®)	80,0 g
KCl (SYNTH®)	2,0 g
Na ₂ HPO ₄ .7 H ₂ O (SYNTH®)	21,5 g
KH ₂ PO ₄ (SYNTH®)	2,0 g
Água Milli-Q	800,0 mL

Obs.: Conservar em geladeira.

Preparo da Solução B

CaCl ₂ .2H ₂ O (SYNTH®)	1,3 g
Água Milli-Q	100,0 mL

Obs.: Pode ser conservada congelada.

Preparo da Solução C

MgCl ₂ .6H ₂ O (SYNTH®)	2,1 g
Água Milli-Q	100,0 mL

Obs.: Pode ser conservada congelada.

Preparo da Solução de Glicose

Glicose (SYNTH®)	10,0 g
Água Milli-Q	100,0 mL

Solução NaOH 1N

NaOH (Nuclear®)	40,0 g
Água MilliQ q.s.p.	1.000,0 mL

¹ Quantidade suficiente para pouco mais de 7 amostras.

Preparo da solução de PMA

Solução estoque 1

Pesar 10 mg PMA e diluir em 1 mL de DMSO
Estocar à 0° C

Solução estoque 2

Diluir a "solução 1" 10 vezes (pegar 10 µL da "solução 1" em 90 µL de DMSO)
(concentração 1 mg/mL).
Manter a 0° C

Solução de uso

Diluir a "solução 2" 1000 vezes, ou seja, pegar 1 µL da "solução 2" e diluir em 1000 µL (1 mL) de Phenol Red (PR).
Plaquear 10 µL por poço (concentração final por poço de 10 ng).

Obs.: para ficar mais fácil a manipulação, pegar 5 µL da solução 2 e adicionar a 5000 µL de PR.

Solução de lise

0,16 M de Cloreto de amônio (solução 1)

0,17 M de Tris (20,5 g/L) (solução 2)

Misturar nove partes da solução 1 em uma parte da solução 2. Filtrar e guardar na geladeira.

NH₄Cl-PM = 53,50

Centrifugar e ressuspender o pellet em 1 mL de solução de lise.

Esperar 4 minutos.

Completar até 10 mL com PBS ou RPMI.

Centrifugar por mais 10 minutos.

Corante de Rosenfeld

Giemsa em pó (MERCK®) 0,97 g

May Grunwald (MERCK®) 0,53 g

Metanol p.a. qsp (MERCK®) 1.000,0 mL

Azul de Trypan

Azul de Trypan em pó (MERCK®) 100,0 mg

PBS 1 X concentrado 100,0 mL