

# Isolamento de fagócitos viáveis do leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) hígdas, sem elicitação, criadas no estado de São Paulo

## Isolation of viable phagocytes from healthy buffaloes milk (*Bubalus bubalis*), without elicitation, bred in Sao Paulo state

Alice Maria Melville Paiva Della Libera,\* Eduardo Harry Birgel,\*\* Ênio Mori,\*\*\* Sandra Satiko Kitamura,\*\*\*\* Regina Mieko Sakata Mirandola,\*\*\*\*\* Wanderley Pereira de Araujo\*\*\*\*\*

### Resumo

A obtenção de células viáveis do leite em quantidade adequada tem sido considerada limitante para a avaliação das funções celulares, sem elicitação prévia e na ausência de inflamação. O presente estudo teve por objetivo padronizar o volume e descrever o processamento das amostras para a recuperação de  $2 \times 10^6$  células viáveis/ml em suspensão, a partir de leite de búfalas hígdas, sem elicitação, criadas no estado de São Paulo. Para tal, foram colhidas 114 amostras de leite de búfalas, negativas no CMT e ao isolamento bacteriológico, compondo-se três grupos com amostras constituídas de diferentes volumes (100 a 125 ml; 500 ml e com 750 ml) de leite. As amostras foram submetidas à contagem de células somáticas e foram realizados os cálculos dos números e percentuais de células viáveis. Empregando-se esse procedimento para isolamento das células viáveis em quantidade e qualidade adequadas, concluiu-se que, em face da pequena concentração de células do leite de búfalas hígdas, foram necessários maiores volumes da amostra, fato que aumentou o tempo de processamento e manipulação das mesmas, comprometendo a viabilidade celular e conseqüentemente as aplicações experimentais futuras. O volume de 500 ml de leite foi considerado o mais eficiente para a recuperação de células em quantidade e qualidade adequadas para ensaios *in vitro*.

**Palavras-chave:** fagócitos, viabilidade celular, leite, búfalos.

### Abstract

The obtainment of viable cells from milk in adequate quantity has been considered a limiting factor for evaluation of cells functions, without previous elicitation and in absence of inflammation. The aim of the present work was to standardize volume and describe the samples processing for recover of  $2 \times 10^6$  viable cells/ml of healthy buffaloes milk, without elicitation, of animals bred in Sao Paulo state. For this purpose, 114 milk samples from mammary quarts of buffaloes negative for CMT and also for bacteriological isolation were obtained, building three samples groups with different milk volumes (100 - 125 ml; 500 ml and 750 ml). The samples were analyzed for somatic cells count and viability. Using this experimental model for isolation of viable cells in adequate quantity and quality, we concluded that because of low cells concentration of healthy buffaloes milk, more volumes of samples were necessary. Therefore, this fact raised processing time and manipulation of samples. Low cellular viability may cause problems in downstream applications. The 500ml of volume milk was considered more efficient for recover of cells in adequate quantity and quality.

**Keywords:** phagocytes, cellular viability, milk, buffaloes.

### Introdução

Com a evolução da imunologia clínica, protocolos para avaliações das funções celulares *in vitro* muito têm contribuído no estudo das alterações da glândula mamária (Dhakal et al, 1991; Silva e Kariyawasam, 1996). Para tanto, é necessário

que as células sejam obtidas em quantidade (Concha e Holmberg, 1990) e qualidade (Piccinini et al., 1990) adequadas e passíveis de serem preservadas em condições próximas às condições *in vivo* (Schalm et al., 1971, Desiderio e Campbell, 1980; Nonnecke e Kehrl, 1985) e portanto sem elicitação. As limitações técnicas se acentuam em amostras

\* Professor doutor, Dep. de Clínica Médica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ USP). Rua Orlando Marques Paiva, 87, CEP 05588-000, Cidade Universitária, SP. E-mail: dellalibera@fmvz.usp.br.

\*\* Professor Titular, Departamento de Clínica Médica (FMVZ-USP).

\*\*\* Doutorando do Departamento de Clínica Médica, (FMVZ-USP), Clínica Médica da UNIABC.

\*\*\*\* Doutorando do Departamento de Clínica Médica, (FMVZ-USP), Clínica Médica da UNIP.

\*\*\*\*\* Farmacêutica Departamento de Clínica Médica, (FMVZ-USP).

\*\*\*\*\* Professor Associado, Departamento de Clínica Médica, (FMVZ-USP).

de secreções lácteas com pequena concentração de células, provenientes de glândulas mamárias não acometidas por qualquer forma de mamite (Sandgren et al., 1991).

A viabilidade celular significa o percentual das células disponíveis para manifestação de suas atividades ou, em outras palavras, a população celular funcional (Dhakal et al., 1991). Esse índice foi valorizado por Piccinini et al. (1990) que descreveram maior viabilidade em amostras de leite de vacas com mamite e consideraram a viabilidade como um “fator imunológico” que deveria ser considerado junto aos demais fatores de defesa da glândula mamária.

As raras pesquisas específicas sobre a função de células do leite de búfalas, além de avaliarem a contagem total de células, priorizaram estudos envolvendo neutrófilos após indução de aumento da celularidade, e deixaram claro que existem diferenças quantitativas e qualitativas na celularidade desses animais, quando comparados a bovinos (Silva e Silva, 1994; Kehrlí e Harp, 2001).

O presente estudo teve por objetivo padronizar o volume e descrever o processamento das amostras para a recuperação de  $2 \times 10^6$  células viáveis/ml em suspensão, a partir de leite de búfalas hígdas, sem elicitção, criadas no estado de São Paulo.

## Material e métodos

Foram colhidas 114 amostras de leite (constituídas de três alíquotas) de 29 búfalas da raça Murrah, cujos quartos mamários não apresentavam alterações ao exame físico da glândula mamária, além de ausência de grumos no leite, CMT e exame microbiológico negativos. A primeira alíquota destinava-se ao exame microbiológico e foi colhida asépticamente. A segunda alíquota foi colhida em frasco plástico contendo bronopol e encaminhada para a contagem de células somáticas (CCS) automática.<sup>1</sup> A terceira alíquota foi colhida em diferentes volumes, em recipiente plástico com capacidade de 750ml. Uma vez colhido, o leite dessa alíquota da amostra era imediatamente filtrado em gaze estéril e transferido para frasco de polipropileno contendo igual quantidade de PBS livre de cálcio e magnésio (pH 7,2-7,4). Inicialmente foram colhidas 42 amostras compostas de 100 a 125ml de leite e, posteriormente 60 amostras contendo 500 ml de leite e 12 amostras contendo 750ml de leite. As amostras foram transportadas em recipientes isotérmicos contendo gelo picado e isoladas com papel toalha, impedindo o contato direto dos frascos com o gelo, e atenuando choques do transporte. A temperatura foi controlada a 4°C mantendo-se um termômetro digital cujo sensor foi fixado dentro de uma amostra controle, além de outro termômetro de mínima e de máxima dentro do isopor. A temperatura da amostra foi igualmente controlada durante todo o processamento, além de ter sido usado material exclusivamente plástico para impedir o comprometimento principalmente das células da série dos macrófagos (Jensen e Eberhart, 1981; Silva et al., 1996).

Várias forças reais de centrifugação (FRC) foram testadas nessa pesquisa no processamento das amostras da secreção láctea de búfala, fazendo-se sempre a avaliação citológica da fração sobrenadante, sendo selecionada a FRC= 450g

por 20 minutos, a 4°C. Procedeu-se a primeira centrifugação em frascos tipo Falcon<sup>o</sup> com capacidade de 50ml cada. O sobrenadante mais viscoso formado na porção superior dos frascos (tampão de gordura), foi retirado com o auxílio de uma espátula ou simplesmente teve seus bordos descolados da parede do frasco, para depois reverter o conteúdo do frasco uma única vez. Após desprezar totalmente a fração sobrenadante líquida, ainda com o frasco invertido, procedeu-se a limpeza dos lados internos com papel absorvente macio e, só então, revertia-se novamente o frasco. As células sedimentadas foram suavemente ressuspensas com fracos jatos de PBS e todo material ressuspensado de uma mesma amostra centrifugada em vários frascos, foi colocado em outro frasco tipo Falcon<sup>o</sup> estéril e o volume de 50 ml completado com PBS refrigerado. A suspensão com os sedimentos concentrados (*pellet* de células) do leite foi novamente centrifugada nas condições anteriormente descritas, desprezando-se o sobrenadante e ressuspensando-se o sedimento em 1 ml de meio enriquecido (RPMI 1640; GIBCO® 31800-04). Essa suspensão celular foi submetida à prova de exclusão de azul de tripan para quantificação de células viáveis (índice de viabilidade). A concentração de células viáveis correspondeu às células contadas em câmara para contagem de leucócitos, que não adquiriram coloração azul, não se impregnando com o corante. Para converter o número de células contadas no resultado final expresso em células/ml, esse foi multiplicado por  $10^5$  e depois convertido para  $10^6$ , uma vez que para a maioria das avaliações *in vitro* seriam necessárias  $2 \times 10^6$  células/ml.

A viabilidade celular das amostras foi avaliada por análise de variância e as médias, comparadas pelo teste de Duncan. As CCS e a concentração de células viáveis foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney (Sampaio, 1998), usando-se *software* estatístico SAS (2001) e Minitab (2000). Foram calculadas as frequências de amostras adequadas (mínimo de  $2 \times 10^6$  células/ml) e quando necessário, calculou-se o coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis estudadas.

## Resultado e discussão

A viabilidade celular média das 114 amostras de leite de búfalas hígdas foi de  $62,1 \pm 19,3\%$  e da CCS média foi de 14.000 células/ml. A proposta de triagem das amostras de no mínimo  $2 \times 10^6$  células/ml, foi mais rígida do que a adotada por Silva e Silva (1994), pois a confiabilidade na execução de uma avaliação *in vitro* dependeria desta etapa (Sandgren et al., 1991).

A prova negativa do CMT utilizada como critério de seleção nesta investigação fez prever-se pequena magnitude de células presentes nas amostras, sem que se pudesse estimar o número de células viáveis, provavelmente com contagem menor do que 200.000 células viáveis/ml (Schalm et al., 1971), fato confirmado pela menor contagem encontrada neste ensaio.

Com base neste resultado, houve a necessidade de se utilizar volumes maiores de leite para obtenção de  $2 \times 10^6$  células/ml. Nonnecke e Kehrlí (1985) recomendaram aumentar a quantidade de PBS adicionado ao leite para favorecer a recuperação celular. Quanto ao PBS, observou-se que discretas oscilações do pH causaram perdas das amostras de leite

<sup>1</sup> Bentley 2000; Análises realizadas no Programa de Análise de Rebanhos Leiteiros, Curitiba, PR.

<sup>o</sup> Falcon – Corning

colhidas e que esse deveria ser mantido continuamente refrigerado e em continente isotérmico.

Quanto à viabilidade celular neste estudo, encontraram-se valores semelhantes nas amostras dos grupos com 100 a 125 e 500ml e maiores em relação ao grupo de 750ml ( $p < 0,04$ ). Por outro lado, a percentagem de amostras com concentração mínima de  $2 \times 10^6$  células/ml, foi aumentando gradativamente até atingir 100% de aproveitamento, quando se utilizou 750ml de leite, ou seja, a percentagem de amostras com concentração mínima de  $2 \times 10^6$  células/ml aumentou enquanto a viabilidade celular diminuiu significativamente. Em relação à concentração celular, houve uma diferença significativa ( $p < 0,01$ ), onde com os volumes de 100 a 125ml obteve-se  $1,0 \times 10^6$  células/ml, aumentando para  $2,1 \times 10^6$  e  $3,8 \times 10^6$  células/ml com volumes de 500 e 750ml de leite, respectivamente (Tabela 1).

Os valores da viabilidade encontrados foram iguais aos descritos por Nonnecke e Kehrlí (1985), apesar desses autores

Deve-se ressaltar que entre a colheita e a avaliação da viabilidade decorreram cerca de quatro horas, utilizadas para o transporte da propriedade ao laboratório, onde a amostra foi centrifugada durante 20 minutos por duas vezes. A suspensão celular deve ser obtida o mais rápido possível para obtenção de maior concentração de células somáticas viáveis e, considerando-se que o processamento inicial consumiria muito tempo, a viabilidade poderia ser comprometida. Poucos relatos referiram essa tolerância, mas é muito provável que o tempo de processamento da amostra possa interferir no resultado final, fator minimizado se houvesse uma centrifuga que acondicionasse frascos que pudessem conter maiores volumes de leite.

Nonnecke e Kehrlí (1985) utilizaram amostras de maiores volumes, porém as etapas não foram adequadamente descritas pelos autores. Apesar disso, a correlação positiva entre o volume da amostra e a concentração celular foi baixa porém significativa ( $r = 0,24$ ;  $p < 0,009$ ), sugerindo que na dependência da amostra, as células poderiam ser mais susceptíveis as perdas durante o processamento ou então mais frágeis e com menor vitalidade.

As amostras de leite foram colhidas de búfalas que não apresentavam alterações da glândula mamária, principalmente processos inflamatórios. Nestas condições, as células do leite não estariam sendo mobilizadas intensamente da circulação sanguínea para a mama, como nos casos de mamite. Nos casos de inflamação de origem bacteriana, as células mobilizadas com o objetivo de controlar o processo teriam maior atividade, porém menos resistentes

ao processamento de concentração. Os resultados obtidos foram concordantes com Piccinini et al. (1990), Dhakal et al. (1991) que também referiram maior celularidade e viabilidade em grupos acometidos por mamite, independentemente da fase de ordenha em que as amostras foram colhidas.

A necessidade de se utilizar um maior volume de leite para obtenção de células em quantidade e qualidade satisfatórias para a execução de provas de avaliação funcional, poderia limitar a sua realização em búfalas, que na média, produzem menos leite que bovinos com aptidão leiteira. Nonnecke e Kehrlí (1985) ao desenvolverem pesquisas para avaliarem a atividade linfocitária do leite de bovinos, colheram 8 litros justificados pela pequena população em animais sadios. Mesmo assim, concluíram que poderiam recuperar células do leite, sem elicitación prévia, e portanto em condições mais próximas às fisiológicas como proposto por Desiderio e Campbell (1980).

## Conclusão

A concentração celular é pequena no leite de búfalas híidas, verificando-se que o aumento do volume das amostras de leite aumentou o tempo de processamento diminuindo a viabilidade celular apesar da obtenção de maior concentração celular.

O volume de 500ml de leite foi o mais adequado para a recuperação de  $2 \times 10^6$  células viáveis/ml, empregando a metodologia aqui descrita.

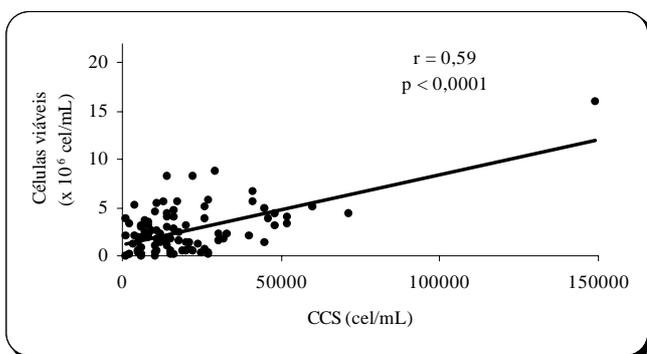
**Tabela 1** – Viabilidade celular, freqüência de obtenção de suspensão com  $2 \times 10^6$  células viáveis e medianas do número de células isoladas por ml de leite.

Volume de leite (ml)	Nº	Viabilidade celular (%)	Amostras adequadas (%)	Células viáveis ( $\times 10^6$ células/ml)
100 – 125	42	65,3 $\pm$ 21,4 <sup>a#</sup>	35,7	1,0 <sup>###</sup>
500	60	61,4 $\pm$ 17,0 <sup>a</sup>	56,7	2,1 <sup>b</sup>
750	12	46,1 $\pm$ 17,2 <sup>b</sup>	100	3,8 <sup>a</sup>

Letras distintas na mesma coluna indica diferença estatística entre si (#  $p < 0,04$ ; ##  $p < 0,01$ ).

terem utilizado leite bovino mantido em temperatura ambiente, porém os valores obtidos no presente estudo foram discordantes de Concha e Holmberg (1990), por terem sido evidentemente menores. Esses últimos pesquisadores obtiveram  $3 \times 10^6$  células/ml com até 90% de viabilidade com amostras de 400ml de leite bovino, sem elicitación, utilizando a primeira centrifugação a 800g por 20 minutos e diluição de 1:2 PBS.

Entre os valores obtidos para a CCS e a concentração de células viáveis, pôde-se observar uma correlação positiva ( $r = 0,59$ ;  $p < 0,0001$ ), indicando que quanto maior o número de células somáticas na amostra de leite, maior a concentração de células viáveis (Figura 1), como Kehrlí e Harp (2001) evidenciaram em amostras de leite bovino.



**Figura 1** – Correlação entre a CCS (células/ml) e a concentração de células viáveis ( $\times 10^6$  células/ml) do leite.

## Referências

- 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.; BHARDWAJ, R. M. Diagnosis of subclinical mastitis in buffaloes using somatic and viable cell counts. *Indian Journal of Animal Health*, v. 44, n. 9, p. 585-586, 1991.
- 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.
- 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.
- NONNECKE, B. J.; KEHRLI, M. E. Isolation of mononuclear cells from bovine milk by continuous-flow and density gradient centrifugation: response of cells to mitogens. *American Journal of Veterinary Research*, v. 46, n. 6, p. 1259-1262, 1985.
- 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.
- SCHALM, O. W.; CARROL, E. J.; JAIN, N. C. *Bovine mastitis*. Philadelphia: Lea e Febiger, 1971.
- 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.; 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.
- MINITAB – *The Student Edition of MINITAB Statistical software adapted for education* – 13.0 Release. User's Manual. New York: Addison – Wesley, 2000.
- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1998.
- SAS INSTITUTE. *SAS user's guide: statistics*. Cary: SAS Institute, 2001.