

Macrófagos lácteos de búfalas hígdas: avaliações da fagocitose, espraiamento e liberação de H₂O₂

Alice Maria Melville Paiva DELLA LIBERA¹
 Eduardo Harry BIRGEL¹
 Sandra Satiko KITAMURA^{2,3}
 Andrea Mello Franco ROSENFELD⁴
 Ênio MORI¹
 Cristina de Oliveira Massoco-Salles GOMES³
 Wanderley Pereira de ARAÚJO¹

Correspondência para:

ALICE MARIA MELVILLE PAIVA DELLA LIBERA
 Departamento de Clínica Médica
 Faculdade de Medicina Veterinária
 Universidade de São Paulo
 Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87
 05508-000 - São Paulo - SP
 dellalibera@fmvz.usp.br

Recebido para publicação: 02/08/2004
 Aprovado para publicação: 23/08/2005

1 - Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo - SP

2 - Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Paulista, São Paulo - SP

3 - Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Anhembi Morumbi, São Paulo - SP

4 - Laticínio Morro da Pedra

Resumo

O presente estudo teve por objetivo avaliar funcionalmente os macrófagos lácteos “nonelicited” presentes por meio de testes de fagocitose, espraiamento e liberação de peróxido de hidrogênio. Foram colhidas 56 amostras de leite de 15 búfalas hígdas e mensuradas a contagem de células somáticas total e diferencial, a viabilidade celular, os testes de fagocitose, de espraiamento e a liberação de peróxido de hidrogênio. Dessas variáveis obteve-se respectivamente média de 14.500 cél/mL de leite; com mediana de 4,33% de linfócitos e médias e desvios padrão de 50,77% ± 18,28 de células da série monócito/macrófago e 32,13% ± 19,27 de polimorfonucleares. A viabilidade das células na suspensão foi 66,8% ± 15,8 e os índices de fagocitose e espraiamento foram 30,1% ± 16,9 e 58,5% ± 13,3. Não houve diferença entre a liberação de H₂O₂ espontânea e induzida por PMA. Concluiu-se que os macrófagos presentes no leite de búfalas hígdas e espraiaram significativamente, além de apresentarem 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; os fagócitos mantêm sua capacidade de liberar peróxido de hidrogênio, espontaneamente ou não, em grau máximo, com uma significativa variação entre amostras.

Palavras-chave:

Búfalo.
 Leite.
 Leucócitos.
 Fagocitose.
 Imunologia.

Introdução

Os mecanismos celulares são fundamentais para a defesa da glândula mamária. Apesar de atribuir-se aos polimorfonucleares neutrófilos a maior responsabilidade na proteção da glândula mamária frente à ação dos microrganismos, esses necessitam da ação prévia dos mononucleares monócitos/macrófagos, mantendo-se a delicada inter-relação que regeira os mecanismos imunes^{1,2}.

Aos macrófagos das secreções lácteas foram atribuídas funções consideradas como acessórias, secretórias, efetoras e reguladoras³, algumas das quais já demonstradas mesmo que escassamente, em macrófagos de bovinos^{1,2,4,5,6,7} não tendo

sido descritas em bubalinos.

As células da série monócitos/macrófagos representam a principal população de células ativas na glândula mamária não infectada de bovinos^{8,9,10} e, pela dificuldade em diferenciá-las morfo-tintorialmente em amostras de leite⁷, por muito tempo foram classificadas como células epiteliais^{8,9}, sendo algumas vezes atribuídas a uma nova categoria celular: a dos “macrófagos-células epiteliais” (MCE)⁷.

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 ou, até mesmo, por avaliação que fora considerado como tentativa

frustrada de fagocitose, manifestada pela aderência e espraiamento de macrófagos em lamínula de vidro¹¹.

Em 1977, Nathan e Root relataram a liberação de H₂O₂ por macrófagos ativados. Essa ativação poderia ser induzida *in vitro* com a utilização de forbol 12-miristrato 13-acetato (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate - PMA), substância estimuladora da “explosão respiratória”, podendo o metabólito ser quantificado, por exemplo, por meio de ensaios envolvendo a oxidação de fenol vermelho dependente de peroxidase^{11,12,13}. Esses métodos de avaliação *in vitro* da atividade dos macrófagos contribuíram de forma marcante para o estudo da interação entre os microrganismos e o hospedeiro, avaliação de tratamentos e diversas condições indutoras de enfermidades em várias espécies de animais¹⁴. A avaliação da atividade fagocítica de macrófagos lácteos de búfalas possibilitaria verificar a capacidade de resposta imune inata da glândula mamária, níveis de susceptibilidade à mastite, bem como, elucidar a importância que esses mecanismos apresentam em bubalinos.

O presente estudo teve como objetivo avaliar funcionalmente os macrófagos lácteos de búfalas hígdas por meio de testes de fagocitose, espraiamento e liberação de peróxido de hidrogênio.

Materiais e Métodos

Foram colhidas 56 amostras de leite de 15 búfalas Murrah cujos quartos mamários não apresentavam alterações ao exame físico e o leite era negativo ao CMT e ao exame bacteriológico. Cada amostra foi composta de três alíquotas, a saber: a primeira colhida assepticamente em tubo estéril, refrigerada imediatamente, para exame bacteriológico; a segunda colhida em frasco contendo conservante para contagem automática de células somáticas; a terceira alíquota continha 500 mL de leite para a recuperação de células e realização de provas funcionais *in vitro*. Desta terceira alíquota

foram recuperadas no mínimo 2x10⁶ células viáveis/mL e para tal a amostra foi acondicionada em frasco plástico, subseqüentemente filtrada em gaze e transferida para frasco de polipropileno com igual quantidade de PBS (1:1 de leite e PBS). O transporte ao laboratório deu-se em contêiner isotérmico mantido em gelo picado para que as amostras se mantivessem refrigeradas.

As amostras contendo PBS foram centrifugadas duas vezes (FRC = 450g, por 20 minutos, à 4° C), desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento celular¹⁵. Na primeira ressuspensão adicionou-se PBS até o volume inicial da amostra e na segunda ressuspensão empregou-se 1,0 mL de meio enriquecido e pH 6,8 (RPMI 1640^a), após o que, procedeu-se a avaliação da viabilidade celular com azul de tripan buscando-se uma concentração mínima de 2x10⁶ células viáveis/mL. Essa suspensão celular também foi utilizada para o exame diferencial após citocentrifugação.

Para o isolamento de leucócitos aderentes objetivando-se obter os índices de fagocitose e espraiamento, utilizou-se placa de poliestireno com 24 poços de 16 mm de diâmetro, e as lamínulas previamente lavadas e desengorduradas, foram alocadas nos poços e mantidas em fluxo laminar^{14,16}. Para cada amostra utilizou-se quatro poços da placa, dois para avaliar a fagocitose e dois para avaliar o espraiamento. Sobre as lamínulas foram depositados 200 μ L da suspensão celular contendo 2x10⁶ células viáveis/mL, no centro da lamínula. Este sistema foi mantido em temperatura ambiente por 30 minutos e as lamínulas lavadas duas vezes com 1,0 mL de RPMI 1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino.

Nas duas linhas inferiores da placa realizou-se o teste de fagocitose adicionando-se suspensão de células mortas de *Saccharomyces cerevisiae* ou zymosan^b por poço. As placas foram incubadas a 37° C por uma hora, repetindo-se a dupla lavagem dos poços

a RPMI 1640 - GIBCO®31800-04
b Zymosan SIGMA®

com RPMI 1640, com 10% soro fetal bovino, evitando-se que a lamínula secasse e danificasse as células. A fixação, após a dupla lavagem, foi feita com glutaraldeído a 0,5% durante 10 minutos, após o que se adicionou 1,0 mL de água ultrapura^c. A leitura das lamínulas deu-se por microscopia de contraste de fase, com magnitude de 600x, onde foram contadas 400 células e calculados os valores percentuais de células que espraíram e que fagocitaram.

A avaliação da liberação de peróxido de hidrogênio baseou-se na oxidação de fenol vermelho dependente de peroxidase, e foi realizada segundo o método colorimétrico¹², adaptado para microensaio¹³, e posteriormente modificado^{11,14}. Para tal, a solução celular contendo 2×10^6 cél/mL, foi ressuspensa em RPMI, centrifugada durante 10 minutos a 450g, à 4° C, sendo o sobrenadante desprezado. O sedimento celular formado foi ressuspensa em 1,0 mL de solução de fenol vermelho, seqüencialmente diluído compondo novas suspensões que possuíam respectivamente: $0,125 \times 10^6$ células/mL; $0,25 \times 10^6$ células/mL; $0,5 \times 10^6$ células/mL e $1,0 \times 10^6$ células/mL.

Em placa para microcultura de poliestireno com 96 poços de fundo chato, existem oito 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 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) para determinar a curva padrão. Nas demais colunas foram adicionadas as respectivas diluições de cada amostra (uma diluição de cada amostra por coluna). Nos quatro poços inferiores desta coluna foram adicionados 10 μ L de PMA para ativar as células. Este PMA foi previamente diluído na concentração de 10mg/mL de dimetil sulfoxido (DMSO), para a seguir 10 μ L desta solução ser diluído em 1,0 mL de PBS, para que a concentração

correspondesse a 10 μ g 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 10 μ L 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/ 2×10^5 células.

Pelo teste estatístico de normalidade de Kolmogorov-Smirnov considerou-se como paramétricas as seguintes variáveis: viabilidade celular, índices de espraimento e fagocitose, porcentagens de macrófagos/monócitos, polimorfonucleares neutrófilos, sendo inicialmente analisados pelo teste F (análise de variância), e quando significativo, as médias confrontadas pelo teste de Duncan, com nível de significância de 5%. No caso de testes não-paramétricos as variáveis estudadas foram a contagem de células somáticas, a porcentagem de linfócitos e a liberação de peróxido de hidrogênio, e os resultados analisados pelo teste de Mann-Whitney. Calculou-se o coeficiente de correlação de Pearson entre duas variáveis e a sua significância avaliada por meio da análise de variância¹⁷, utilizando-se software MINITAB¹⁸.

Resultados e Discussão

O presente estudo foi motivado pela necessidade de compreender a resposta imune inata da glândula mamária de bubalinos, nesse caso, avaliando funcionalmente os macrófagos lácteos oriundos de mamas sadias. A exemplo do que já havia sido descrito em bovinos^{5,6,7,10} e em bubalinos² em trabalho precursor a esse, o macrófago é a célula predominante em leite de mamas hígdas. Em outras palavras, essas células são importantes desde o primeiro contato entre o patógeno e o hospedeiro e suas peculiaridades funcionais manifestas especificamente nesse microambiente poderiam colaborar no entendimento de mecanismos de susceptibilidade à doença.

As provas empregadas para essa avaliação funcional foram os testes de fagocitose, espraçamento e liberação de peróxido de hidrogênio.

As mamas foram consideradas sadias por não apresentarem alterações ao exame físico e, ao exame do leite, esse material era triado conforme fosse negativo no CMT e no exame microbiológico, provas essas que se repetiram no dia da colheita para assegurar a homogeneidade do grupo e garantir o critério de inclusão amostral.

Quanto à celularidade do leite, a mediana do número de células somáticas foi de 14.500 células/mL. No exame diferencial, os linfócitos apresentaram uma mediana de 4,33% e as médias e desvios padrão dos valores relativos percentuais de monócitos/macrófagos e dos polimorfonucleares neutrófilos foram respectivamente 50,77% \pm 18,28 e 32,13% \pm 19,27, confirmando o predomínio de macrófagos (Figura 1) nesse material¹⁵. Os polimorfonucleares eosinófilos e demais células, não foram identificados nas amostras analisadas pela técnica empregada.

As amostras apresentaram baixas contagens, menores que as encontradas em estudos abordando macrófagos lácteos de vacas sadias^{2,6}. Outra particularidade foi a de que no que concerne a células de bovinos, há a preocupação com a possibilidade da baixa celularidade representar aumento do risco de mastite, principalmente quando os animais são mantidos em condições higiênico-sanitárias controladas. 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 e com açúcares para que os animais imergissem representando potencial fonte de infecção. Apesar de todos esses fatores que predisporiam os bovinos à mastite, nos bubalinos não se identificou dificuldade em obter amostras sem crescimento bacteriano, além de não se observar qualquer animal com alterações físicas de processo inflamatório agudo da glândula mamária

durante o experimento. Muito pelo contrário, a maior dificuldade foi atingir a concentração necessária de células viáveis para a execução das provas funcionais não aparentando ser a baixa contagem um fator de aumento de susceptibilidade dessas mamas.

Para que esta pesquisa fosse realizada, foram necessárias adaptações a recuperação das células presentes no leite, após o que, utilizaram-se as técnicas adaptadas para macrófagos alveolares de eqüinos¹⁴. A viabilidade média das células das amostras foi de 66,8% \pm 15,8. Dentre os parâmetros funcionais, o índice de espraçamento e de índice de fagocitose foram 30,1% \pm 16,9 e 58,5% \pm 13,3, respectivamente. Não houve diferença entre a liberação espontânea (sem estímulo do PMA) e induzida (com estímulo do PMA) (Tabela 1).

O espraçamento é prova de função definida por Russo et al.¹¹ como tentativa frustrada de fagocitose. Todavia, nesse tipo de avaliação na qual não há substrato disponível para fagocitar, nada há com que se frustrar. Seria mais apropriado sugerir que essa célula está apta a exercer suas funções e em atividade responsiva manifestando a característica, de se aderir à lâmina e emitir microvilos (Figura 2).

Poucos trabalhos estudaram especificamente os macrófagos do leite, e quando o fizeram, empregaram leite de bovinos^{2,4,5,6}. Os únicos autores, que empregaram a avaliação do espraçamento, foram Desiderio e Campbell⁵ cujo objetivo era identificá-los no leite para empregá-los experimentalmente, substituindo alternativas mais invasivas como as empregadas em animais de laboratório. Esses autores relataram a capacidade de espraçamento dessas células “nonelicited” como verificado nesse estudo e consideraram como positiva a possibilidade de trabalhar com uma célula “nonelicited” por esta condição estar mais próxima da condição natural.

Nesse estudo, empregando amostras “nonelicited”, avaliaram-se amostras de leite sem indícios de inflamação e de infecção, cujo único estímulo foi aplicado *in vitro*.

Tabela 1 – Índices de fagocitose, de espreadimento e liberação de peróxido de hidrogênio com e sem estimulação *in vitro* de células do leite de búfalas híbridas. São Paulo, 2002

	Fagocitose	Espreadimento	Liberação de H₂O₂	
	(%)	(%)	Sem PMA (nmoles/2x 10⁵ células)	Com PMA (nmoles/2x 10⁵ células)
Mediana	59,5	30,0	6,20^a	7,74^a
Média	58,5	30,1	9,67^a	11,47^a
Desvio padrão	13,3	16,9	8,95	10,75
CV (%)	22,7	56,1	92,5	93,7
Nº	56	56	20	20

Letras iguais na mesma linha indicam resultados semelhantes, $p > 0,5$. CV: coeficiente de variação

Tabela 2 – Relações entre as diversas provas funcionais e populações leucocitárias analisadas na suspensão celular de leite de búfalas sadias – São Paulo – 2002

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

NS = não significativa

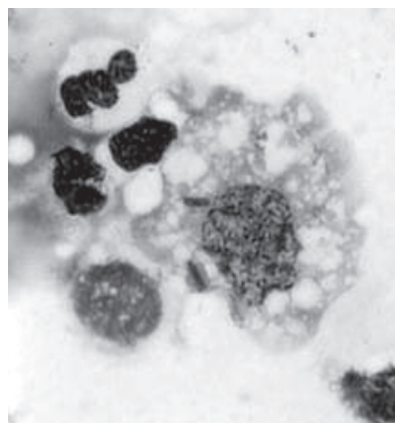


Figura 1 – Macrófago vacuolizado (A), neutrófilo (B), em coloração de Rosenfeld e aumento de 600x

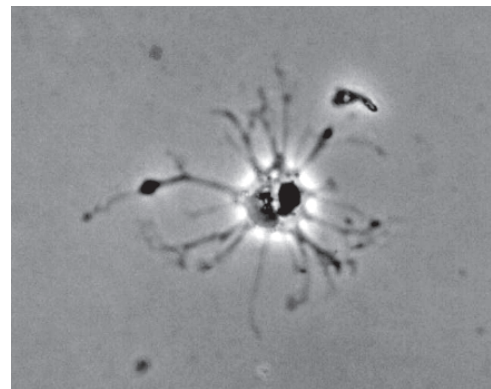


Figura 2 – Fotomicrografia de macrófago de leite de búfala, aderido e espreado *in vitro*, com projeções (A) e vacúolos citoplasmáticos (B). Microscopia de contraste de fase, aumento de 600x

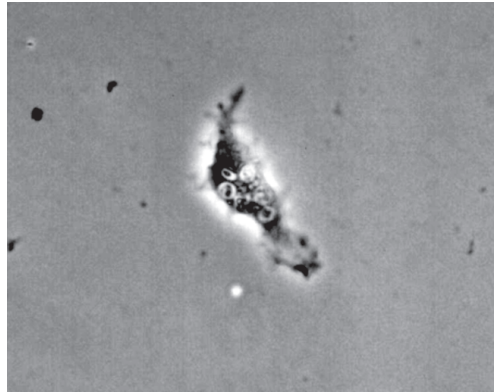


Figura 3 - Fotomicrografia de macrófago de leite de búfala, aderido *in vitro*, com partículas de zymosan no interior do citoplasma indicando fagocitose (A). Microscopia de contraste de fase, aumento de 600x

Apesar disso, obteve-se valores superiores aos anteriormente descritos^{5,16}, e as alterações morfológicas (Figura 2) observadas foram semelhantes^{5,14} às citadas em outras espécies, com dois tipos principais de extensões celulares, os pseudópodos pequenos ou microfilamentos e longos microfilamentos terminais de fixação⁵.

Os macrófagos lácteos “nonelicited” fagocitaram partículas de zymosan, independentemente de opsoninas (Figura 3). De todas as análises, a determinação dos índices de fagocitose demonstrou menor coeficiente de variação, corroborados pela correlação positiva entre os índices de fagocitose e espraiamento. Quando correlacionado às diferentes populações de leucócitos quantificadas na citologia, o índice de fagocitose só manifestou correlação com os valores percentuais de linfócitos, sugerindo uma relação entre as funções celulares, já descrita em bovinos, de apresentação de antígeno² e microbicidas⁷.

Nos ensaios para mensuração da liberação de H_2O_2 ¹⁴, observou-se que os macrófagos lácteos “nonelicited” mostraram atividade, independentemente da adição de PMA (Tabela 1). Nessa análise três aspectos são passíveis de discussão.

O primeiro aspecto seria a alta liberação de H_2O_2 que, inclusive tornou necessário trabalhar com a amostra dividida em diferentes concentrações celulares,

adaptando a técnica^{12,13,14}. Em outras palavras, uma amostra permitia a leitura com uma concentração celular de 1×10^6 céls/mL enquanto outra, mesmo tendo origens semelhantes (mama hígida), só apresentou uma liberação dentro do intervalo da curva (intervalo entre 0,5 e 4,0 nmoles de H_2O_2 /100ml de SFV), com uma concentração de $0,25 \times 10^6$ céls/mL, confirmando a acentuada variação individual.

O segundo aspecto seria a ausência de diferença de atividade em presença do PMA, que apesar de diferir da proposta inicial do ensaio^{12,13}, já havia sido descrita antes em outros modelos “nonelicited” que não envolviam macrófagos lácteos¹⁴. 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 híginas seria mantida no limite máximo e, portanto indiferente ao estímulo do PMA.

O terceiro aspecto seria o fato de terem sido utilizadas amostras contendo várias populações de células, diferentemente do ocorrido nas demais provas funcionais empregadas⁷ e, mesmo assim não ter sido descrita correlação entre população celular e liberação de H_2O_2 (Tabela 2). Os altos valores de liberação de peróxido de hidrogênio deverão ser atribuídos tanto aos macrófagos como aos neutrófilos presentes na suspensão celular.

Não houve correlação entre contagem de células somáticas e as demais variáveis funcionais. Já as correlações com os diferentes tipos celulares apresentaram variações. A correlação negativa com os valores percentuais de neutrófilos talvez tenha ocorrido pela já citada independência entre a quantidade dos neutrófilos e a qualidade da atividade dos mesmos tornando possível a hipótese de, em mamas sadias com menos PMN talvez pela ausência de estímulo para que essas células fossem para o leite, as poucas células presentes garantiriam uma resposta basal mais acentuada. A ausência de correlação entre a população de macrófagos e as provas

funcionais é explicada pela diversidade funcional dos macrófagos que são encontrados no leite em toda a série monócito-macrófago⁴.

Por outro lado, os índices de espraiamento considerados correspondentes à ativação macrofágica, apresentaram correlação positiva com a fagocitose e com os valores percentuais de linfócitos, células essas também envolvidas nos processos de ativação^{9,10}. Houve correlação negativa do espraiamento com a liberação de peróxido de hidrogênio. Esse último resultado pode significar que quanto mais ativado menor a liberação de peróxido de hidrogênio. Ao contrário das provas de fagocitose e de espraiamento que trabalham exclusivamente com as células com propriedade de aderência ao vidro, predominantemente macrófagos, na avaliação da liberação de peróxido de

hidrogênio a população da suspensão celular era heterogênea e a liberação não poderia ser atribuída apenas aos macrófagos apesar de predominantes.

As técnicas para a determinação dos índices de espraiamento, fagocitose e liberação de peróxido de hidrogênio se mostraram factíveis em células provenientes do leite de búfalas híidas, “nonelicited” e padronizadas para diferentes aplicações.

Conclusões

Os macrófagos expressaram as funções testadas a saber, espraiamento, fagocitose e liberação de peróxido de hidrogênio. Esse último mecanismo demonstrou ser o metabolismo oxidativo extremamente ativo em búfalas e com significativa variação individual.

Milk macrophages from healthy female buffaloes: evaluation of phagocytosis test, spreading and hydrogen peroxide release assays

Abstract

The objective of the present study was to evaluate the functioning of nonelicited dairy macrophages present in phagocytosis, spreading and hydrogen peroxide release tests. Fifty-six samples of milk were collected from 15 healthy buffaloes. Total and differential somatic cell counts, cell viability, and indexes of phagocytosis, spreading and hydrogen peroxide release were assessed. The following values were obtained: mean of 14,500 cells/mL of milk, with median equal to 4.33% of lymphocytes; mean and standard deviation equal to 50.77% + 18.28 of monocytes / macrophages and 32.13% + 19.27 polymorphonuclear cells. Mean viability of cells in suspension was 66.8% +15.8; phagocytosis and spreading indexes were equal to 30.1% + 16.9 and 58.5% +13.3, respectively. There was no difference between the spontaneous release of H₂O₂ and the one induced by PMA. It was concluded that nonelicited macrophages present in the milk of healthy buffaloes were significantly capable to spread and phagocyte. Phagocytes presented the ability to release hydrogen peroxide either spontaneously or not, in a maximum level and with a significant variation between samples.

Key-words:

Buffalo.
Milk.
Leukocytes.
Phagocytosis.
Immunology.

Referências

- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Ruminant mammary gland immunity**. Brussels: International Dairy Federation, 2003. p. 10-13.
- 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.
- ELGERT, K. D. **Immunology**. Understanding the immune system. Wiley-Less, 1996.
- 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.
- 5 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.
- 6 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, 1991.
- 7 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.
- 8 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.
- 9 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.
- 10 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.** 1993. 67 p. Tese (Doctor) - Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, 1993.
- 11 RUSSO, M. et al. Superoxide-independent hydrogen peroxide release by activated macrophages. **Brazilian Journal Medical Biological Research**, v. 22, n. 10, p. 1271-1273, 1989.
- 12 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.
- 13 PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassays for measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **Journal of Immunology Methods**, v. 46, n. 2, p. 211-226, 1981.
- 14 MORI, E.; MORI, C. M. C.; DELLA LIBERA, A. M. M. P.; LARA, M. C. C. S. H.; FERNANDES, W. R. Evaluation of alveolar macrophage function after experimental infection with equine herpesvirus-1 in horses. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 3, p. 271-278, 2003.
- 15 DELLA LIBERA, A. M. M. P.; ARAUJO, W. P.; KITAMURA, S. S.; ROSENFELD, A. M. F.; BIRGEL, E. H. Citologia do leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) hígdas criadas no Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1087-1092, 2004.
- 16 RABINOVITCH, M.; De STEFANO, M. J. Macrophage spreading in vitro I. Inducers of spreading. **Experimental Cell Research**, v. 77, p. 323-324, 1973.
- 17 SNEDCOR, G. W.; COCHRAN, W. G. **Statistical methods.** 6 ed. Ames: Iowa State University press, 1967. 593 p.
- 18 MINITAB – **The Student Edition of MINITAB Statistical software adapted for education – 13.0** Release. User's Manual. New York: Addison – Wesley, 2000.