

# Avaliação funcional dos fagócitos do sangue e da secreção mamária de vacas no período pós-parto imediato

## *Functional assessment of phagocytes from blood and mammary secretion of cows in the immediate postpartum period*

Karina Medici Madureira<sup>1\*</sup>, Viviani Gomes<sup>2</sup>, Vinicius Dayoub Gonçalves<sup>2</sup>,  
Carolina Lara Shecaira<sup>2</sup>, Caroline Harumi Seino<sup>2</sup>, Fernando José Benesi<sup>2</sup>

**RESUMO:** O periparto caracteriza-se por mudanças imunes e fisiológicas na glândula mamária das fêmeas bovinas, tornando-as mais susceptíveis às mastites. Este trabalho teve o objetivo de avaliar a fagocitose da bactéria *Escherichia coli* pelos fagócitos do sangue e do colostro de vacas híbridas da raça Holandesa. Amostras provenientes de 22 fêmeas, entre novilhas e vacas, foram obtidas durante a primeira ordenha pós-parto, para avaliação da fagocitose, em lâmina de vidro, após estímulo com *E. coli*. A proporção de fagócitos espalhados do sangue foi maior quando as células foram estimuladas com bactérias ( $p=0,003$ ), no entanto a taxa de fagocitose foi baixa e semelhante à observada quando as células não foram estimuladas ( $p=0,299$ ). No colostro, foram constatados maiores índices de fagocitose ( $p=0,001$ ) e espalhamento ( $p=0,000$ ) quando os fagócitos foram estimulados com *E. coli*. Comparando-se os resultados obtidos para o sangue e o colostro, verificou-se, no sangue, maior proporção de fagócitos não espalhados e que não apresentavam bactérias no seu interior, estimulados ( $p=0,000$ ) ou não ( $p=0,002$ ) com bactéria. Houve maior taxa de espalhamento nos fagócitos do colostro quando estimulados com *E. coli* ( $p=0,002$ ). Não se viu diferença nos percentuais de fagocitose entre as amostras de sangue e colostro incubadas ( $p=0,478$ ) ou não ( $p=0,071$ ) com bactérias. Os resultados permitiram concluir que *E. coli* influenciou no espalhamento dos fagócitos do sangue e do colostro de fêmeas bovinas da raça Holandesa no período do pós-parto imediato e auxiliarão na compreensão dos mecanismos imunológicos ocorridos nesse período, considerado o de maior susceptibilidade das fêmeas bovinas às infecções.

**PALAVRAS-CHAVE:** periparto, fagocitose, bovinos, colostro.

**ABSTRACT:** The peripartum is characterized by immune and physiological changes in the mammary glands of cows, making them more susceptible to mastitis. This work aimed to evaluate the phagocytosis of *Escherichia coli* by phagocytes from blood and colostrum from healthy Holstein cows. Samples from 22 female, heifers and cows, were obtained during the first postpartum milking for evaluation of phagocytosis in glass cover slip, after stimulation with *E. coli*. The proportion of spreading blood phagocytes was higher when cells were stimulated with bacteria ( $p=0.003$ ). However, the phagocytosis rate was low and similar to that observed when blood cells were unstimulated ( $p=0.299$ ). Colostrum showed higher rates of spreading ( $p=0.000$ ) and phagocytosis ( $p=0.001$ ) when phagocytes were stimulated with *E. coli*. Comparing the results obtained for blood and colostrum, a higher proportion of not spreading phagocytes without bacteria inside, when stimulated ( $p=0.000$ ) or not ( $p=0.002$ ) with bacteria, was observed in blood. There was a higher spreading rate in colostrum when phagocytes were stimulated with *E. coli* ( $p=0.002$ ). There was no difference in the percentage of phagocytosis in blood or colostrum samples incubated ( $p=0.478$ ) or not ( $p=0.071$ ) with bacteria. The results showed that *E. coli* influenced the activity of blood and colostrum phagocytes from Holstein cows in the immediate postpartum period, and will assist in the understanding of the immunological mechanisms that occurs in this period, considered as the most susceptible to infections in cows.

**KEYWORDS:** peripartum, phagocytosis, bovine, colostrum.

<sup>1</sup>Departamento de Anatomia, Patologia e Clínicas Veterinárias, Universidade Federal da Bahia (UFBA) – Salvador (BA), Brasil.

<sup>2</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP) – São Paulo (SP), Brasil.

\*Autor correspondente: karina.madureira@ufba.br

Recebido em: 18/01/2015. Aceito em: 04/10/2016

A eficácia da resposta imune da glândula mamária no parto é determinada pela sua capacidade em garantir defesa em relação aos inúmeros patógenos causadores de infecção, porém, nesse período, acredita-se que essa resposta esteja direcionada à produção de colostro e proteção do bezerro recém-nascido (OPDEBEECK, 1982; GOMES *et al.*, 2014), em virtude das elevadas taxas de infecções mamárias ocorridas durante a colostrogênese (EBERHART, 1986).

O colostro bovino possui fatores imunológicos como imunoglobulinas e citocinas, além das células, representadas predominantemente por macrófagos, na quantidade aproximada de 690.500 macrófagos/mL ( $69,5 \pm 17,4\%$ ) (GOMES *et al.*, 2011).

Macrófagos são células originadas da ativação dos monócitos sanguíneos, que atravessam a parede endotelial dos vasos e se instalam em tecidos inflamados, assumindo as características fenotípicas da região por eles colonizadas (STABEL *et al.*, 1997).

Macrófagos reconhecem os patógenos pela ligação entre estruturas bacterianas denominadas de *pathogen-associated molecular pattern* (PAMPs) e receptores de membrana chamados de *pattern recognition receptors* (PRRs), ou *toll-like receptors* (TLRs). O TLR-4 reconhece lipopolissacarídeos bacterianos (LPS ou endotoxina) presentes na parede das bactérias gram-negativas como a *Escherichia coli* (MURPHY *et al.*, 2010).

A fagocitose ocorre após a ligação dos PAMPs aos PRRs. Em seguida, os patógenos são circundados pela membrana fagocítica e então internalizados em uma vesícula conhecida como fagossoma, que se funde aos lisossomos e origina o fagolisossomo, para destruição enzimática dos patógenos. Nessa etapa também ocorre a emissão de sinais, que ativam diversas enzimas como a *reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase* (NADPH oxidase), que converte o oxigênio molecular em íon superóxido e radicais livres, que são conhecidos como espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo convertidos pela enzima superóxido dismutase (SOD) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (PAAPE *et al.*, 2002; MURPHY *et al.*, 2010).

Apesar de os fagócitos mamários terem origem sanguínea, estudos demonstraram que eles podem ter sua capacidade fagocítica comprometida, em relação àqueles presentes na circulação sanguínea, por conta da fagocitose da gordura e caseína (PAAPE *et al.*, 2003) e da curta meia-vida, levando à redução do *burst* respiratório e morte por apoptose (MEHRZAD *et al.*, 2001), entretanto pouco se sabe ainda sobre a atividade funcional dessas células na secreção colostrada, uma vez que a obtenção celular é prejudicada pela presença abundante de debris, gordura, proteínas e partículas autofluorescentes (GOMES *et al.*, 2014; MEGANCK *et al.*, 2014), além da baixa viabilidade (GODDEN *et al.*, 2012).

Dessa forma, considerando a susceptibilidade da glândula mamária aos coliformes no período periparto, associada à escassez de pesquisas envolvendo a atividade funcional das células do colostro bovino, este trabalho avaliou a fagocitose da bactéria *E. coli* pelos fagócitos do sangue e do colostro de vacas híbridas da raça Holandesa.

Para a pesquisa foram usadas 22 fêmeas bovinas híbridas da raça Holandesa, primíparas e múltiparas (segunda a quarta lactação), acompanhadas na primeira ordenha pós-parto para a colheita das amostras de colostro. Inicialmente, realizaram-se a antissepsia com solução clorada e secagem dos tetos com papel toalha individual. Foram colhidas alíquotas de 400 mL de colostro por quarto mamário diluído em 400 mL de solução salina tamponada refrigerada (PBS). A segunda alíquota da secreção mamária foi obtida em frascos estéreis, após prévia limpeza e desinfecção dos tetos com álcool 70%.

Amostras de sangue foram obtidas imediatamente após a primeira ordenha pós-parto, por punção da veia jugular, utilizando-se sistema de colheita a vácuo e tubos contendo heparina sódica (1.000 UI).

As amostras foram encaminhadas ao laboratório acondicionadas em caixas térmicas e imersas em gelo tritulado.

A segunda alíquota de colostro foi semeada em placas de Petri com meio de ágar sangue de carneiro (5%) mantidas a 37°C por 24 a 72 horas (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1999). As amostras que apresentaram crescimento bacteriano positivo foram excluídas desta pesquisa, levando-se em conta apenas o fator periparto como variável.

O sangue heparinizado foi distribuído em duas alíquotas de 5 mL completando-se o volume para 10 mL, com meio de cultivo celular (RPMI 1640, Sigma®, Darmstadt, Alemanha). Depois, a suspensão sanguínea foi transferida para tubos contendo 5 mL de Ficoll-paque com densidade 1,077 e centrifugada a 700 g, durante 40 minutos a 4°C. Logo, a camada de células mononucleares (MN) foi removida e diluída em 10 mL de meio de cultivo celular (RPMI 1640, Sigma®, Darmstadt, Alemanha), procedendo-se à lavagem das células por meio de centrifugação a 400 g, por 10 minutos a 4°C, repetindo-se esse processo duas vezes. Realizou-se então a lise dos eritrócitos mediante solução hipotônica, lavagem das células conforme protocolo descrito anteriormente e diluição em 1 mL de meio de cultivo celular, sendo a suspensão celular reservada.

As alíquotas de colostro diluídas em PBS (800 mL) foram centrifugadas a 700 g durante 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante contendo gordura e o soro lácteo foram desprezados, mantendo-se apenas o botão celular sedimentado no fundo do tubo. As células foram diluídas em PBS e a centrifugação inicial foi repetida por duas vezes. Após a última centrifugação, o botão celular obtido também foi ressuspendido em 1 mL de meio de cultivo celular.

A viabilidade dos fagócitos sanguíneos e lácteos foi verificada pela técnica da exclusão por azul de tripan, e a concentração de células viáveis foi determinada em número de células  $\times 10^6$ /mL, sendo a concentração final ajustada para  $2 \times 10^6$  células/500  $\mu$ L de meio de cultivo celular.

A cepa de *E. coli* do grupo K99 (F5) utilizada nesta pesquisa foi isolada de um bezerro com diarreia e mantida em ágar semissólido em ausência de luz. A partir dessa cultura estoque, 18 horas antes de cada ensaio, repiques foram feitos

em tubos contendo 5 mL de *brain heart infusion* líquido (BHI, DIFCO®, New Jersey, Estados Unidos) e incubados em estufa a 37°C por 18 horas. Após o crescimento, as bactérias foram lavadas duas vezes em solução salina tamponada e o precipitado bacteriano foi ressuscitado em 1 mL de PBS. *E. coli* foi então inativada a 56°C por 60 minutos. A concentração bacteriana foi ajustada para  $2 \times 10^7$  bactérias conforme a escala de McFarland utilizando espectrofotômetro a 540 nm.

Para o ensaio da fagocitose, foram transferidos 500 µL ( $2 \times 10^6$  células/mL) da suspensão celular para placas de cultivo celular de 24 poços de 16 mm de diâmetro contendo lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro, em duplicatas. Em seguida, as placas foram acondicionadas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C por uma hora para adesão dos fagócitos à lamínula de vidro, segundo as técnicas de STABEL *et al.* (1997) e SANCHES *et al.* (2012), modificadas por MADUREIRA (2011). Após a incubação, o sobrenadante existente em cada um dos poços da placa foi aspirado, e as lamínulas foram então lavadas duas vezes pela adição de 1,0 mL de meio de cultivo celular enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB), adicionando-se 500 µL da suspensão bacteriana contendo  $2 \times 10^7$  bactérias/mL. Foram realizados ensaios controle com apenas células, adicionando-se, portanto, 500 µL de meio de cultivo celular suplementado com SFB. As placas foram incubadas novamente a 37°C durante duas horas em 5% de CO<sub>2</sub>, repetindo-se a dupla lavagem pós-incubação. A fixação das células nas lamínulas foi feita com 200 µL de glutaraldeído a 0,5% por 10 minutos.

As lamínulas de vidro foram coradas pelo método de ROSENFELD (1947). Foram avaliados 100 campos microscópicos (1.000x), em duplicata, verificando-se a porcentagem de fagocitose e espraçamento, observando-se bactérias no interior das células.

A análise estatística foi realizada por meio do programa estatístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, Estados Unidos). Os dados obtidos foram considerados não paramétricos pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, calculando-se as medianas dos parâmetros comparadas pelo teste U de Mann-Whitney. Todos os testes foram vistos como significativos quando  $p < 0,05$ .

Este trabalho foi realizado conforme os princípios éticos na experimentação animal estabelecidos pela Comissão de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, recebendo o número de protocolo 2194/2011.

A porcentagem de espraçamento e fagocitose das células do sangue e colostro de vacas Holandesas no pós-parto imediato, estimuladas ou não com *E. coli*, está apresentada na Tabela 1.

A proporção de fagócitos espraçados do sangue foi maior quando as células foram estimuladas com bactérias ( $p=0,003$ ), no entanto a taxa de fagocitose foi baixa e semelhante à observada quando as células sanguíneas não foram estimuladas ( $p=0,299$ ). As análises aconteceram sob condições de assepsia,

**Tabela 1.** Proporção de fagócitos espraçados e fagocitose na presença e ausência de *Escherichia coli* provenientes do sangue e do colostro de vacas Holandesas no pós-parto imediato.

Parâmetros	Sangue	Colostro	Significâncias	
Fagócitos aderidos*	Ausência de <i>E. coli</i>	60,5 <sup>Aa</sup>	21,7 <sup>Ab</sup>	0,002
	Presença de <i>E. coli</i>	52,0 <sup>Aa</sup>	18,0 <sup>Ab</sup>	0,000
Significâncias	0,470	0,773		
Fagócitos espraçados	Ausência de <i>E. coli</i>	23,0 <sup>Ba</sup>	7,0 <sup>Ba</sup>	0,877
	Presença de <i>E. coli</i>	29,0 <sup>Ab</sup>	35,0 <sup>Aa</sup>	0,002
Significâncias	0,003	0,000		
Fagocitose	Ausência de <i>E. coli</i>	10,0 <sup>Aa</sup>	11,5 <sup>Ba</sup>	0,071
	Presença de <i>E. coli</i>	21,0 <sup>Aa</sup>	25,0 <sup>Aa</sup>	0,478
Significâncias	0,299	0,001		

Letras maiúsculas distintas na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre si; letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças estatísticas entre si; \*células não espraçadas e sem bactérias no seu interior.

porém 10% dos fagócitos mononucleares do sangue (não estimulados) fagocitando bactérias indicam a possibilidade de contaminação durante o processo de execução do experimento. Essa observação exige a interpretação dos dados da fagocitose e do espraçamento em conjunto.

A análise das células provenientes do colostro permitiu a observação de maiores índices de fagocitose ( $p=0,001$ ) e espraçamento ( $p=0,000$ ) quando os fagócitos foram estimulados com *E. coli*.

A diferenciação do monócito em macrófago é estimulada pela presença de micro-organismos ou foco inflamatório. Inicialmente ocorrem o reconhecimento e a adesão das bactérias gram-negativas aos fagócitos por meio da junção do TLR4 com os PAMPs (DOAN *et al.*, 2008; TIZARD, 2008). Em seguida, esse micro-organismo é engolfado pela emissão de pseudópodes e direcionado para o interior da célula por endocitose, observando-se a formação do fagossoma e fagolisossoma. A destruição da bactéria dá-se por mecanismos enzimáticos e dependentes de oxigênio. A aderência e digestão do micro-organismo desencadeiam mudanças no interior do fagócito, como aumento de tamanho, alteração da forma e redistribuição das organelas citoplasmáticas, ampliando a área de contato e tornando-o mais agressivo na destruição do patógeno, processo esse caracterizado como espraçamento (STABEL *et al.*, 1997; RAINARD; RIOLLET, 2006). Dessa forma, podemos verificar no nosso estudo *in vitro* que os fagócitos do sangue e do colostro responderam ao estímulo promovido por *E. coli*, pelo aumento na

porcentagem de células espalhadas e, no caso do colostro, também na taxa de fagocitose.

BASTOS *et al.* (2012) avaliaram amostras de leite sem crescimento bacteriano e baixa celularidade, leite sem crescimento bacteriano e alta celularidade, e leite contaminado por *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. ou *Corynebacterium* spp. Esses autores observaram aumento dos índices de fagocitose e espalhamento, de acordo com o aumento da celularidade e a presença de isolamento bacteriano. Esses dados são concordantes com os encontrados na presente pesquisa em resposta ao estímulo infeccioso.

A comparação entre os resultados obtidos para as células provenientes do sangue e colostro permite afirmar que as células da glândula mamária se encontravam mais ativadas, considerando que foi obtida maior proporção de fagócitos não espalhados e que não apresentavam bactérias no seu interior quando oriundas do sangue, quando estimuladas ( $p=0,000$ ) ou não ( $p=0,002$ ) com bactéria. Esse fato também pode ser associado à maior taxa de espalhamento nos fagócitos do colostro quando estimulados com *E. coli* ( $p=0,002$ ). Em contrapartida, não houve diferença nos percentuais de fagocitose entre as amostras de sangue nem entre as de colostro incubadas ( $p=0,478$ ) ou não ( $p=0,071$ ) com bactérias.

A maior atividade das células do colostro pode ser justificada pela fagocitose inespecífica dos glóbulos de gordura, caseína ou debrís celulares pelos macrófagos oriundos desse tecido, alterando a sua conformação celular, representada pelo maior índice de espalhamento (PAAPE *et al.*, 2003).

Estudos *in vitro* mostraram ainda que os metabólitos gerados pela degradação dos triglicerídeos simples e fosfolípidos, como fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina e esfingomielina, presentes na gordura do leite e do colostro, poderiam possuir atividade antimicrobiana e antiviral (VAN HOOIJDONK *et al.*, 2000).

No trabalho de KORNALIJSNLIJPER *et al.* (2003) foi comparado o crescimento de cepa de *E. coli in vitro* em amostras de leite com fração reduzida de células; fração livre de

células e de gordura (*skim*); e fração livre de células e de gordura e reduzida em proteína (*whey*). Tais autores verificaram que o crescimento bacteriano foi maior no *whey*, revelando que a gordura e as células do leite poderiam contribuir para a inibição do crescimento bacteriano.

No presente trabalho não foram observadas diferenças entre os índices de fagocitose quando se compararam as amostras de sangue e de colostro. Apesar de a gordura e de a caseína poderem influenciar negativamente no mecanismo de fagocitose bacteriana pelas células do colostro, esse prejuízo poderia ser compensado pela ação antimicrobiana promovida pelos lipídeos, além de os macrófagos serem as células predominantes no colostro (GOMES *et al.*, 2011), equilibrando o índice de fagocitose e tornando-o semelhante ao sangue, mesmo na presença de *E. coli*, como pôde ser evidenciado neste estudo.

Esse mecanismo compensatório foi também apresentado em outras investigações, como a identificação de maior capacidade proliferativa dos fagócitos mononucleares do colostro quando comparado ao sangue, provavelmente em virtude dos efeitos ativadores do colostro no fenótipo dos leucócitos (CONCHA *et al.*, 1986; REBER *et al.*, 2006), e que a maior quantidade de macrófagos no colostro poderia, em parte, balancear a menor resposta aos mitógenos e antígenos, quando comparados aos fagócitos sanguíneos (MEGANCK *et al.*, 2014).

Levando em conta os resultados obtidos neste trabalho, foi possível concluir que *E. coli* influenciou na atividade dos fagócitos do sangue e do colostro de fêmeas bovinas da raça Holandesa, verificada pela capacidade de aderência, espalhamento e fagocitose, em lâmina de vidro. Tais resultados podem ser considerados como importante ferramenta quando buscamos compreender os mecanismos fagocitários e microbicidas que podem ser realizados por essas células, particularmente no período periparto, tido como o de maior ocorrência de doenças da produção, em virtude da maior susceptibilidade apresentada pelas fêmeas bovinas nessa fase.

## REFERÊNCIAS

BASTOS, C.R.; BLAGITZ, M.G.; SOUZA, F.N.; BATISTA, C.F.; STRICAGNOLO, C.R.; AZEDO, M.R.; DELLA LIBERA, A.M.M.P. Viabilidade celular, fagocitose e espalhamento de fagócitos mononucleares, e liberação de peróxido de hidrogênio por leucócitos de glândulas mamárias bovinas sadias e infectadas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.32, n.9, p.850-854, 2012.

CONCHA, C. Cell types and their immunological functions in bovine mammary tissues and secretions – a review of the literature. *Nordisk Veterinær Medicin*, v.38, p.257-272, 1986.

DOAN, T.; MELVOLD, R.; VISELLI, S.; WALTENBAUGH, C. *Imunologia ilustrada*. Porto Alegre: Artmed, 2008. 334 p.

EBERHART, R.J. Management of dry cows to reduce mastitis. *Journal of Dairy Science*, v.69, p.1721-1732, 1986.

GODDEN, S.M.; SMOLENSKI, D.J.; DONAHUE, M.; OAKES, J.M.; BEY, R.; WELLS, S.; SREEVATSAN, S.; STABEL, J.; FETROW, J. Heat-treated colostrum and reduced morbidity in preweaned dairy calves: Results of a randomized trial and examination of mechanisms of effectiveness. *Journal of Dairy Science*, v.95, p.4029-4040, 2012.

GOMES, V.; MADUREIRA, K.M.; DELLA LIBERA, A.M.M.P.; BLAGITZ, M.G.; ALVES, M.; BAPTISTELLA, F.; BENESI, F.J. Dinâmica da celularidade do colostro de vacas da raça Holandesa nos pós-parto imediato. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.63, n.5, p.1047-1053, 2011.

- GOMES, V.; MADUREIRA, K.M.; SORIANO, S.; PONTES, G.N.; SILVA, B.T.; DELLA LIBERA, A.M.M.P.; BENESI, F.J. Release of hydrogen peroxide by phagocytes from bovine colostrum in the *peripartum* period. *Acta Veterinaria Brno*, v.83, p. 181-185, 2014.
- KORNALIJNSLIJPER, J.E.; VAN WERVEN, T.; DAEMEN, A.J.J.M.; VAN DEN BROEK, J.; NIEWOLD, T.A.; RUTTEN, V.P.M.G.; NOORDHUIZEN-STASSEN, E.N. *In vitro* growth of mastitis-inducing *Escherichia coli* in milk and milk fractions of dairy cows. *Veterinary Microbiology*, v.91, p.125-134, 2003.
- MEGANCK, V.; GODDEERIS, B.M.; STUYVEN, E.; PIEPERS, S.; COX, E.; OPSOMER, G. Development of a method for isolating bovine colostrum mononuclear leukocytes for phenotyping and functional studies. *The Veterinary Journal*, v.200, p.294-298, 2014.
- MEHRZAD, J.; DOSOGNE, H.; MEYER, E.; HEYNEMAN, R.; BURVENICH, C. Respiratory burst activity of blood and milk neutrophils in dairy cows during different stages of lactation. *The Journal of Dairy Research*, v.68, n.3, p.399-415, 2001.
- MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. *Imunobiologia de Janeway*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 908 p.
- NATIONAL MASTITIS COUNCIL. Laboratory and field handbook on bovine mastitis, p. 11-19. National Mastitis Council, Inc., Arlington, VA., 1999.
- OPDEBEECK, J.P. Mammary gland immunity. *The American Veterinary Medical Association*, v.181, n.10, p.1061-1065, 1982.
- PAAPE, M.J.; BANNERMAN, D.D.; ZHAO, X.; LEE, J.W. The bovine neutrophil: structure and function in blood and milk. *Veterinary Research*, v.34, p.597-627, 2003.
- PAAPE, M.; MEHRZAD, J.; ZHAO, X.; DETILLEUX, J.; BURVENICH, C. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, v.7, n.2, p.109-121, 2002.
- RAINARD, P.; RIOLLET, C. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Veterinary Research*, v.37, p.369-400, 2006.
- REBER, A.J.; LOCKWOOD, A.; HIPPEN, A.R.; HURLEY, D.J. Colostrum induced phenotypic and trafficking changes in maternal mononuclear cells in a peripheral blood leukocyte model for study of leukocyte transfer to the neonatal calf. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.109, p.139-150, 2006.
- 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. *Memórias do Instituto Butantan*, v.20, p.329-335, 1947.
- SANCHES, B.G.S.; SOUZA, F.N.; AZEDO, M.R.; BATISTA, C.F.; BERTAGNON, H.G.; BLAGITZ, M.G.; DELLA LIBERA, A.M.M.P. Fagocitose intensificada de *Corynebacterium pseudotuberculosis* por células da série monócito-macrófago de caprinos naturalmente infectados pelo vírus da artrite encefalite. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.32, n.12, p.1225-1229, 2012.
- STABEL, J.R.; KEHRLI JR., M.E.; REINHARDT, T.A.; NONNECKE, B.J. Functional assessment of bovine monocytes isolated from peripheral blood. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.58, p.147-153, 1997.
- TIZARD, I.R. *Imunologia veterinária: uma introdução*. 8. ed. São Paulo: Roca, 2008. 587 p.
- VAN HOOIJDONK, A.C.M.; KUSSENDRAGER, K.D.; STEIJNS, J.M. In vivo antimicrobial and antiviral activity of components in bovine milk and colostrum involved in non-specific defence. *British Journal of Nutrition*, v.84, suppl. 1, S.127-S134, 2000.