

**NIVALDO DE AZEVÊDO COSTA**

**ESTUDO DO PROTEINOGRAMA E DOS MINERAIS COBRE, FERRO E  
ZINCO NO SORO DE OVELHAS DA RAÇA SANTA INÊS COM MASTITE  
INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE COM *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

**RECIFE**

**2009**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**NIVALDO DE AZEVÊDO COSTA**

**ESTUDO DO PROTEINOGRAMA E DOS MINERAIS COBRE, FERRO E ZINCO NO  
SORO DE OVELHAS DA RAÇA SANTA INÊS COM MASTITE INDUZIDA  
EXPERIMENTALMENTE COM *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Veterinária.

Orientadora:  
Dr<sup>a</sup> Carla Lopes de Mendonça

**Recife**

**2009**

Ficha Catalográfica  
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca da Unidade Acadêmica de Garanhuns- UFRPE

C837e Costa, Nivaldo de Azevedo  
Estudo do proteinograma e dosagens séricas dos minerais, cobre, ferro e zinco em ovelhas Santa Inês com Mastite induzida experimentalmente por Staphylococcus Aureus/Costa, Nivaldo de Azevedo. Recife, 2009.  
91 f.: il.

Orientador: Carla Lopes de Mendonça  
Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) –  
Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Medicina Veterinária.  
Inclui bibliografia

CDD 636.089

1. Infecção intramamária
2. Ovinos
3. Staphylococcus
4. Proteínas – Fase aguda
5. SDS-PAGE
6. Minerais

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**ESTUDO DO PROTEINOGRAMA E DOS MINERAIS COBRE FERRO E ZINCO NO**  
**SORO DE OVELHAS DA RAÇA SANTA INÊS COM MASTITE INDUZIDA**  
**EXPERIMENTALMENTE COM *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Tese de Doutorado elaborada por  
**NIVALDO DE AZEVÊDO COSTA**

Aprovada em 20 / 02 / 2009

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra CARLA LOPES DE MENDONÇA  
Orientadora - Clínica de Bovinos, Campus Garanhuns - UFRPE

---

Dr. JOSÉ AUGUSTO BASTOS AFONSO  
Clínica de Bovinos, Campus Garanhuns - UFRPE

---

Prof<sup>a</sup> Dra MARIA JOSÉ DE SENA  
Depto de Medicina Veterinária - UFRPE

---

Prof. Dr. PIERRE SOARES CASTRO  
Depto de Medicina Veterinária - UFRPE

---

Prof. Dr. JOSÉ DIOMEDES BARBOSA  
Universidade Federal do Pará – Campus Castanhal

---

Prof. Dr. JOSÉ CLÁUDIO DE ALMEIDA SOUZA  
Universidade Federal Rural de Pernambuco – Campus Garanhuns

Ao Professor Jurandir Manso da Rocha (*in memorian*), pelo exemplo de dedicação à Clínica de Bovinos e também por ter acreditado em mim, ainda estagiário, acolhendo-me em sua própria residência. Ainda: por seus ensinamentos, seus conselhos e suas orientações, sou eternamente grato.

À Dra. Carla Lopes de Mendonça, exemplo de competência, profissionalismo e dedicação. A ela, que acreditou e investiu em meu trabalho, aceitou o desafio de me orientar e não desistiu da empreitada assumida, mesmo quando inúmeras dificuldades me foram impostas pela vida, dedico esta tese.

## AGRADECIMENTOS

Ao finalizar esta parte dos trabalhos relativos ao doutoramento, desejo sinceramente agradecer a todos que contribuíram com a sua concretização em suas mais diferentes etapas. Por não querer incorrer na injustiça do não-reconhecimento, destaco alguns nomes que me foram muito caros durante o percurso desta Pós-Graduação:

Ao Deus de Jacó, ao Deus de Davi, ao Deus de Abraão, ao meu Deus por ter me dado a vida e por sua imensa generosidade ao permitir-me sonhar e a transformar meus sonhos em realidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela aprovação do projeto e liberação de recursos que viabilizaram a execução desta pesquisa.

À Professora Dra. Elizabeth da Cruz Cardoso, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, pela valiosa contribuição nas análises dos minerais.

Ao Professor Dr. Jurandir Fagliari, do Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCA: UNESP/Jaboticabal, pela seriedade com a qual realizou as análises das proteínas.

À Dra. Nilma Cintra Leal, do Departamento de Microbiologia: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães: Fundação Oswaldo Cruz/PE, pela presteza e atenção durante a caracterização molecular da amostra de *Staphyococcus aureus*.

Ao Laboratório Marcelo Magalhães/Recife, pelos trabalhos concernentes à caracterização bioquímica e pela realização do antibiograma da amostra de *Staphyococcus aureus*.

Ao Professor Pierre Castro Soares, pelas inúmeras orientações no decorrer deste trabalho e principalmente ao que tange as análises estatísticas.

As bibliotecárias da Unidade Acadêmica de Garanhuns/UFRPE Wellita e Gracineide pelas correções das referências bibliográficas.

A minha querida Branca, pelo apoio e pela compreensão da minha ausência em cada uma das etapas que compuseram esta longa jornada. A ela, ainda, desculpo-me pelas necessárias omissões, principalmente durante o período que mais precisou de mim.

Aos meus filhos: Igor, Paloma e Raiana. Que este trabalho possa servir de estímulo nas suas caminhadas presentes e futuras!

Aos meus pais José de Araújo Costa e Judite Leonilia de Azevêdo que, apesar das dificuldades, lutaram incansavelmente para a nossa formação.

Aos meus irmãos, Pedro, Aparecida, Sueli, Maria Luiza, Washington e Michele pela amizade e admiração.

Aos colegas de Pós-Graduação: Rogério, Simão (*in memorian*) e principalmente Mayra Zilta, pelas significativas presenças durante as discussões.

Aos companheiros de trabalho: José Augusto Bastos Afonso da Silva, também Coordenador da Clínica de Bovinos, e Maria Izabel de Sousa, pelos incentivos, coberturas e apoio durante todas as etapas quem compuseram esta longa jornada de estudos e pesquisas.

Aos funcionários da Clínica de Bovinos: Mano, Rose (*in memorian*), Selma, Jeane, Sávio, Everaldo, Maria Luiza, Jacó, Reginaldo e Sebastião, pelo convívio e amizade.

Aos residentes da Clínica de Bovinos: Alexandre, Janaina, Antônio Carlos, Henrique, Eduardo, Pedro, Marisa, Saulo e Rodrigo, pela convivência harmônica, pautada no respeito mútuo, e especialmente à Kalina, pela ajuda na preparação dos originais e nas traduções feitas.

À Edna, Secretária da Coordenação de Pós-Graduação da Medicina Veterinária, pela amizade e presteza constantes.

Aos Companheiros do *Rotary Club Sete Colinas*, pela amizade e compreensão relativa às minhas presenças parciais nas atividades do grupo.

À Clínica de Bovinos de Garanhuns, espaço de aprendizagem e ensinamento diários, que se tornou, para mim, um Projeto de Vida.

Aos ex-residentes e atualmente colegas de trabalho na Clínica de Bovinos: Luís Teles, Nivan Antônio, Alexandre e Janaina, pela amizade e companheirismo.

*Salve Garanhuns!  
Os jardins, as palmeiras e alguns  
Pedacos do céu... mãos divinas!  
Salve as Sete Colinas!*

*João Marques*



## RESUMO

### **“Estudo do proteinograma e dos minerais cobre, ferro e zinco no soro de ovelhas da raça Santa Inês com mastite induzida experimentalmente com *Staphylococcus aureus*”**

Este estudo teve por objetivo avaliar as alterações no proteinograma e nos níveis de cobre, ferro e zinco no soro de ovelhas primíparas, da raça Santa Inês, com mastite induzida experimentalmente com *Staphylococcus aureus*. A glândula mamária direita de dez ovelhas sadias foi inoculada com  $1,0 \times 10^4$  ufc/ml. O exame clínico e da glândula mamária, o perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), a determinação sérica do Cu, Fe e Zn e a concentração do fibrinogênio plasmático foram realizados antes da inoculação, estabelecendo-se o momento controle (*baseline*) e os seguintes a inoculação (12h, 24h, 36h, 48h, 60h, 72h, 84h, 96h, 108h, 120h, 132h, 168h, 180h, 288h e 336h). Todas as ovelhas infectadas experimentalmente apresentaram quadro clínico de mastite, havendo perda da funcionalidade da glandula mamária. O proteinograma revelou o fracionamento de 23 proteínas, cujos pesos moleculares (PM) variaram de 26.000 a 185.000 dáltons (Da), permitindo a identificação de proteínas de fase aguda positiva e negativa, imunoglobulinas da classe G e A e algumas proteínas não identificadas. Foi observado aumento significativo ( $P < 0,05$ ) na concentração da haptoglobina e ceruloplasmina, assim como de IgG e IgA. Não houve alteração nos níveis de antitripisina e glicoproteína ácida ( $P > 0,05$ ). Verificou-se diminuição nos valores médios dos níveis de ferro e zinco ( $P < 0,05$ ) e elevação nos níveis do cobre ( $P < 0,05$ ). Foi demonstrado correlação positiva entre o fibrinogênio plasmático e a ceruloplasmina ( $r=0,74$ ), a haptoglobina ( $r=0,62$ ) e a IgA ( $r=0,62$ ). Os resultados obtidos demonstraram a importancia da ceruloplasmina e da haptoglobina como proteínas de fase aguda nas infecções intramamárias de ovelhas, assim como ratifica o fibrinogênio como marcador inflamatório pela alta correlação observada com as proteínas específicas. As alterações séricas do Cu, Fe e Zn demonstraram a ação de mediadores inflamatórios, desencadeados pelo *S.aureus*.

Palavras chave: Infecção intramamária, ovinos, *Staphylococcus*, proteínas de fase aguda, SDS-PAGE, minerais.

## ABSTRACT

### **Study of the protein screen and of some minerals (copper, iron and zinc) in Santa Inês ewes with mastitis experimentally induced with *Staphylococcus aureus***

The aim of the present study was to evaluate the alterations on the protein screen and serum copper, iron and zinc levels of Santa Inês primiparous ewes with mastitis experimentally induced with *Staphylococcus aureus*. The right mammary gland of ten healthy ewes was inoculated with  $1,0 \times 10^4$  ufc/mL. The clinical exam; eletrophoresis profile in poliacrilamide gel (SDS-PAGE), concentration of serum copper, iron and zinc and plasma fibrinogen were measured before the inoculation (baseline moment) and in the following moments: 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 168, 180, 288 and 336 hours after the inoculation of the agent. All animals experimentally infected presented clinical mastitis and subsequent loss of functionality of the gland. The protein screen showed 23 proteins fractions with molecular weights (MW) varying from 26.000 to 185.000 daltons (Da) allowing the recognition of positive and negative acute-phase proteins, class A and G immunoglobulin's and some non-identified proteins. A significant increase ( $P < 0,05$ ) in haptoglobin and ceruloplasmin concentration, IgG and IgA was observed. Antitrypsin and acid glicoprotein concentrations ( $P < 0,05$ ) did not alter. The average levels of iron and zinc decreased ( $P < 0,05$ ) and the copper values increased ( $P < 0,05$ ). A positive correlation between plasma fibrinogen and ceruloplasmin ( $r=0,74$ ), haptoglobin ( $r=0,62$ ) and IgA ( $r=0,62$ ) was also identified. Results showed the importance of ceruloplasmin and haptoglobin as acute-phase proteins in intramammary infections of ewes and reiterate fibrinogen as an inflammatory marker because of its high correlation with specific proteins. The serum alterations of Cu, Fe and Zn revealed the action of inflammatory mediators triggered by *S. aureus*.

**KEY-WORDS:** intramammary infection, ewes, *Staphylococcus aureus*, acute-phase proteins, SDS-PAGE, minerals.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	15
<b>2 OBJETIVOS</b>	18
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b>	19
3.1- Mastite Ovina	19
3.2- Proteinograma / Proteínas de Fase Aguda	22
3.3- Minerais e Infecção	35
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	39
4.1- Local de Realização do trabalho	39
4.2- Animais	39
4.3- Inóculo	39
4.4- Momentos Experimentais	40
4.5- Tratamento	40
4.6- Avaliação Clínica	41
4.7- Colheita das amostras	41
4.8 - Exames Laboratoriais	41
4.9 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	42
4.10 - Análise Estatística dos Dados	43
<b>5 RESULTADOS</b>	44
5.1- Proteinograma	44
5.2-Minerais	56
5.3 - Análise de Relação entre Variáveis	60
<b>6 DISCUSSÃO</b>	68
6.1- Proteinograma	68
6.2 - Minerais	75
<b>7 CONCLUSÕES</b>	78
<b>8 REFERÊNCIAS</b>	79

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Valores médios da concentração da haptoglobina (mg/dL) em ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção. 45
- Figura 2** - Valores médios da concentração da ceruloplasmina (mg/dL) em ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção. 46
- Figura 3** - Valores médios da concentração da transferrina (mg/dL) em ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção. 47
- Figura 4** - Valores médios da concentração da hemopexina (mg/dL) em ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção. 47
- Figura 5** - Valores médios da concentração da albumina (mg/dL) em ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção. 48
- Figura 6** - Valores médios da concentração da antitripsina  $\alpha$ -1 (mg/dL) em ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção. 49
- Figura 7** - Valores médios da concentração da  $\alpha$ -1 glicoproteína ácida (mg/dL) em ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção. 49
- Figura 8** - Valores médios da concentração do fibrinogênio plasmático (mg/dL) em ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção. 50
- Figura 9** - Valores médios da concentração da IgG (mg/dL) em ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção. 51
- Figura 10** – Valores médios da concentração da IgA (mg/dL) em ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas p.i. 51
- Figura 11** – Valores médios dos teores de cobre sérico (mg/L) de ovelhas com mastite induzida com cepa de *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção 56

- Figura 12** - Valores médios dos teores de ferro sérico (mg/L) de ovelhas com mastite induzida com cepa de *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção 57
- Figura 13** - Valores médios dos teores de zinco sérico (mg/L) de ovelhas com mastite induzida com cepa de *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção 58
- Figura 14** - Relação entre teor sérico de cobre e IgA sérica em ovelhas com mastite induzida com cepa de *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção. 60
- Figura 15** - Relação entre teor sérico de ceruloplasmina e albumina sérica em ovelhas com mastite induzida com cepa de *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção. 61
- Figura 16** – Relação entre teor sérico de ceruloplasmina e IgA sérica em ovelhas com mastite induzida com cepa de *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção. 62
- Figura 17** – Relação entre teor sérico de antitripsina  $\alpha$ -1 e IgG em ovelhas com mastite induzida com cepa de *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção. 62
- Figura 18** – Relação entre a haptoglobina sérica e fibrinogênio plasmático em ovelhas com mastite induzida com cepa de *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção. 63
- Figura 19** – Relação entre a ceruloplasmina e fibrinogênio plasmático em ovelhas com mastite induzida com cepa de *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção. 64
- Figura 20** – Relação entre a albumina e fibrinogênio plasmático em ovelhas com mastite induzida com cepa de *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção. 64
- Figura 21** – Relação entre a IgA e fibrinogênio plasmático em ovelhas com mastite induzida com cepa de *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção. 65

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Valores médios e desvios padrão da concentração da haptoglobina (mg/dL) das ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção. 52
- Tabela 2** – Valores médios e desvios padrão da concentração da ceruloplasmina (mg/dL) das ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção. 52
- Tabela 3** - Valores médios e desvios padrão da concentração da transferrina sérica (mg/dL) das ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção. 52
- Tabela 4** - Valores médios e desvios padrão da concentração da hemopexina sérica (mg/dL) das ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção. 53
- Tabela 5** - Valores médios e desvios padrão da concentração da albumina sérica (mg/dL) das ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção. 53
- Tabela 6** - Valores médios e desvios padrão da concentração da antitripsina  $\alpha$ -1 sérica (mg/dL) das ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção. 53
- Tabela 7** - Valores médios e desvios padrão da concentração da glicoproteína ácida  $\alpha$ -1 sérica (mg/dL) das ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção. 54
- Tabela 8** – Valores médios e desvios padrão da concentração do fibrinogênio plasmático (mg/dL) das ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção. 54
- Tabela 9** - Valores médios e desvios padrão da concentração da IgG (mg/dL) das ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção. 54
- Tabela 10** - Valores médios e desvios padrão da concentração da IgA (mg/dL) das ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção. 55

- Tabela 11** - Valores médios e desvios padrão dos níveis séricos de cobre (mg/L) das ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção. 59
- Tabela 12** - Valores médios e desvios padrão dos níveis séricos de ferro (mg/L) das ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção. 59
- Tabela 13** - Valores médios e desvios padrão dos níveis séricos de zinco (mg/L) das ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção. 59
- Tabela 14** - Tipos de efeitos e respectivos coeficientes de relação da regressão ajustadas dos minerais séricos, em função dos momentos experimentais, de ovelhas com mastite induzida com cepa de *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção. 60
- Tabela 15** - Matriz de correlação dos teores de microelementos com proteínas de fase aguda do soro de ovelhas com mastite induzida com cepa de *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção. 66
- Tabela 16** - Tipos de efeitos e respectivos coeficientes de relação da regressão ajustadas dos minerais e proteínas de fase aguda séricos, em função dos momentos experimentais, de ovelhas com mastite induzida com cepa de *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção. 67

## 1- INTRODUÇÃO

Os ovinos são considerados animais completos, não só pela quantidade, mas pela qualidade de seus produtos. O bom lucro e o rápido retorno do capital investido são dois motivos, que despertam, cada vez mais, o interesse na criação de ovinos. O mercado para carne de cordeiro é bastante promissor e a criação de ovino precoce está em franca expansão e se tornando ótima alternativa no agronegócio. Aliado a estas qualidades, os ovinos fornecem pele de excelente qualidade para a indústria do calçado e em algumas regiões o leite. O leite de ovelha é comum na Europa para fabricação de queijos finos. Em nosso país já existem alguns trabalhos, que estudaram a viabilidade da produção de leite em ovinos, visando entre outros propósitos à seleção de ovelhas, que possuam destaque na produção leiteira (NETO, 2000; TERRA, 2000).

O rebanho mundial de ovinos é composto por aproximadamente 1,1 bilhão de cabeças, das quais o Brasil detém cerca de 16 milhões (ONU/FAO – FAOSTAT AGRICULTURA – 2002). A região Nordeste possui 9.379.380, correspondendo mais de 50% da população nacional, sendo o efetivo de Pernambuco da ordem de 1.180.943 (IBGE, 2006). As características geográficas do Nordeste brasileiro lhe caracterizam como região vocacionada para a produção de caprinos e ovinos, não só por deter grande parte do rebanho nacional, mas principalmente pela importância sócio-econômica que esta atividade representa (MEDEIROS, 1998).

A raça Santa Inês vem se destacando sobre as demais, por ser considerada rústica, resistente às condições áridas, aos parasitas, ter um bom desenvolvimento ponderal e por se reproduzir o ano todo na região, representando também uma excelente opção para cruzamento industrial. Por ser originária das raças Bergamácia e Morada Nova apresenta características, que beneficiam a produção de leite, favorecendo o aleitamento e o peso dos cordeiros, no entanto em situações de manejo semi-intensivo e intensivo, em decorrência de uma alimentação mais rica, observa-se maior pré-disposição para a infecção da glândula mamária, pois o leite excedente não é consumido pelo borrego (SOUZA et al., 2005; OLIVEIRA, 2006).

Pouco se conhece sobre as particularidades da glândula mamária da ovelha, principalmente das raças nativas. A mastite nas ovelhas tem um grande impacto econômico para o criador se comparado aos efeitos na vaca e na cabra, podendo acarretar a perda total da



glândula mamária e até a morte da ovelha e/ou do borrego (MENZIES & RAMANOON, 2001; SIMÃO, 2004; OLIVEIRA et al., 2007; RADOSTITIS et al., 2007).

O interesse pela mastite na espécie ovina tem aumentado nos últimos anos, pois a doença pode levar à redução no ganho de peso dos cordeiros e causar aumento na mortalidade. O acometimento da glândula mamária frequentemente leva a perda do úbere ou da metade afetada. Algumas formas de mastite têm um impacto significativo sobre as ovelhas, outras alteram a produção e os componentes do leite e, algumas influenciam no desenvolvimento dos animais lactentes, acarretando sérias perdas ao criador. Os prejuízos decorrentes dessa enfermidade estão diretamente relacionados, nos casos agudos, à morte de ovelhas no pico da lactação, tendo um efeito deletério no desenvolvimento do lactente, podendo levar a morte do borrego, aliado aos custos adicionais com a utilização de sucedâneos, como também nos casos crônicos o descarte prematuro de animais (WATSON & BUSWELL, 1984; VAZ, 1996; WINTER, 2001).

A mastite em ovelhas é uma realidade no Agreste de Pernambuco, caracterizada pelo aumento de volume, fibrose e/ou alteração da secreção láctea, ressaltando a importância do exame clínico da glândula mamária ao término de cada lactação, no período pós-parto e antes de iniciar o programa reprodutivo (COSTA et al., 2001; OLIVEIRA, 2007). É caracterizada por sinais clínicos sistêmicos (febre, anorexia, fraqueza, toxemia, alteração das frequências cardíaca e respiratória) ou apenas sinais locais (inflamação do úbere e edema, gangrena, alteração da consistência, assimetria, abscessos) e sinais funcionais na glândula mamária, como modificações macroscópicas e quantitativas da produção de leite (RADOSTITIS et al., 2007; BERGONIER & BERTHELOT, 2003; SEARS & MCCARTHY, 2003; MENDONÇA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2007). Nas ovelhas de corte, alguns casos agudos tornam-se crônicos e persistem por vários meses ou por toda a lactação (BERGONIER & BERTHELOT, 2003; OLIVEIRA et al., 2007).

Dentre os agentes etiológicos envolvidos, o *Staphylococcus aureus* é relatado como uma das principais causas da enfermidade em rebanhos ovinos, sendo responsável separadamente ou em associação com outros agentes por 80% dos casos de mastite aguda (EL-MASSANAT et al., 1991; WINTER, 2001).

A presença de enfermidades infecciosas nos rebanhos, dentre as quais a mastite, representa elevação de custos para o produtor, bem como a ocorrência de transtornos inerentes ao bem-estar animal. A existência de ferramentas para a vigilância da condição de higiene dos rebanhos poderá ser um componente útil em um programa de sanidade, o que leva

a necessidade de se identificar novos indicadores potenciais de infecção (GANHEIM et al., 2007).

Estudos em animais domésticos têm levado à identificação de várias proteínas denominadas Proteínas de Fase Aguda (PFA), descritas originalmente apenas em humanos e em animais de laboratório. Ressalta-se a significativa variação entre as espécies animais com relação à resposta de diferentes proteínas (ECKERSALL & CONNER, 1988; ECKERSALL, 2004), visto que a síntese protéica é estabelecida geneticamente, o que explica esta variabilidade entre espécies, que são refletidas no padrão fisiológico do perfil eletroforético das proteínas séricas (KANEKO et al., 1997).

Este grupo de proteínas é assim chamado por aumentar seus níveis séricos em resposta a processos inflamatórios, traumas cirúrgicos e estresse (JAIN, 1993; MURATA et al., 2004; MURATA, 2007). Da mesma forma, alterações nos níveis séricos de alguns minerais, como o cobre (Cu), o ferro (Fe) e o zinco (Zn) vêm sendo relatadas por alguns autores como consequência de algumas enfermidades infecciosas, que acometem os ruminantes, dentre as quais a mastite (CORRIGAL et al., 1976; SANDHOLM, 1995; MENDONÇA et al., 2005).

Resultados de pesquisas sugerem que no futuro, ensaios para mensuração de PFA serão usados rotineiramente para avaliar a saúde animal; otimizar o desempenho produtivo dos indivíduos; monitorar a eficácia de terapias antibióticas e identificar a ocorrência de doenças, aliado ao benefício considerável à segurança alimentar, por meio da avaliação dos animais no pré-abate (SKINNER, 2001).

Em nosso país, as informações referentes à resposta inflamatória da glândula mamária de ovelhas frente ao *S. aureus* e sua repercussão sistêmica são escassas. Desta forma, torna-se necessário a realização de um estudo, que nos permita melhor elucidar a patogenicidade do *S. aureus* sobre a glândula mamária de ovelhas e suas consequências sistêmicas por meio da avaliação do proteinograma e das dosagens séricas dos minerais cobre, ferro e zinco.

## **2- OBJETIVOS**

### **2.1- OBJETIVO GERAL**

Avaliar o proteinograma e os níveis séricos dos minerais cobre, ferro e zinco após infecção experimental da glândula mamária de ovelhas da raça Santa Inês com *Staphylococcus aureus*.

### **2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a cinética das proteínas de fase aguda da resposta inflamatória.
- Identificar e quantificar as proteínas detectadas no traçado eletroforético.
- Avaliar o perfil sérico dos minerais cobre, ferro e zinco.
- Realizar a análise de relação entre o fibrinogênio plasmático, proteínas de fase aguda e minerais séricos.

## 4- MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 - Local de realização do trabalho

O delineamento experimental foi realizado no aprisco de experimentação para pequenos ruminantes da Clínica de Bovinos, Campus Garanhuns da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

### 4.2 - Animais

Foram utilizadas 10 ovelhas primíparas, clinicamente sadias, recém-paridas de aproximadamente dois anos de idade, da raça Santa Inês. A dieta foi constituída de feno de tifton (*Cynodom spp.*), capim elefante (*Pennisetum purpureum*), 200g de concentrado/animal/dia, sal mineral e água *ad libitum*.

Os borregos foram removidos de suas mães logo após o parto, depois de mamarem o colostro. As ovelhas passaram a ser ordenhadas manualmente duas vezes ao dia (manhã e tarde), seguindo as recomendações de controle higiênico-sanitário da ordenha (ANDERSON et al., 2005).

Previamente ao experimento, os animais foram submetidos ao exame clínico e exames laboratoriais (hemograma e parasitológico de fezes) de acordo com as recomendações descritas por Radostits et al. (2007), a fim de verificar a higidez dos mesmos. Como medidas profiláticas os animais foram vermifugados e vacinados contra algumas clostridioses<sup>1</sup>.

O período de adaptação de cada um dos animais, aliado ao período experimental foi de aproximadamente 75 dias.

### 4.3 - Inóculo

Foi utilizada uma cepa de campo de *Staphylococcus aureus*, oriunda de um caso de mastite clínica em ovelha da região, que foi caracterizada molecular e bioquimicamente, e previamente testada frente a diferentes antimicrobianos. A cepa foi mantida criopreservada em Caldo Infuso Cérebro-Coração (BHI), associado ao glicerol. Previamente foi realizado um subcultivo da amostra em Agar sangue de carneiro a 5%, para em seguida, no dia anterior à inoculação, as colônias serem repicadas em caldo de enriquecimento<sup>2</sup> e incubadas a 37°C

---

<sup>1</sup> Biodectin, Fort Dodge – Saúde Animal

<sup>2</sup> Infuso de cérebro e coração (caldo BHI) – Vetec Química Fina LTDA. Rio de Janeiro

por 24 horas, com posterior passagem e diluições decimais ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) para PBS, pH 7,2, empregando-se  $1,0 \times 10^4$  unidades formadoras de colônias (ufc)/mL como inóculo.

Foi realizada a anti-sepsia da teta com álcool iodado e posteriormente o agente foi inoculado, por meio de uma sonda<sup>3</sup> acoplada a uma seringa plástica estéril (tipo insulina), na parte proximal da cisterna da teta direita, realizando-se massagens, com movimentos ascendentes, para o inóculo atingir a cisterna da glândula mamária. A glândula esquerda serviu como controle.

#### 4.4 - Momentos Experimentais

Previamente à inoculação foram estabelecidas as informações clínicas e laboratoriais mediante três colheitas, com intervalos de 24h, sempre pela manhã, tendo por finalidade estabelecer um valor médio para cada uma das variáveis estudadas, caracterizando os valores basais, também denominado de momento controle.

Posteriormente, na manhã seguinte, a glândula mamária direita do animal em estudo foi inoculada com a cepa de *Staphylococcus aureus*.

A partir deste instante os animais foram acompanhados diariamente, pela manhã e pela tarde e a mastite foi reconhecida clinicamente no momento em que foram evidenciadas as alterações da glândula mamária, das características do leite, e aparecimento dos sinais clínicos (RADOSTITS et al., 2007). A partir deste momento foram iniciadas as colheitas de material para análise das variáveis propostas nos objetivos. Desta forma os momentos foram estabelecidos da seguinte maneira: Momento controle (*baseline*) – antes da inoculação; 12 horas pós-inoculação (hpi); 24hpi; 36hpi; 48hpi; 60hpi; 72hpi; 84hpi; 96hpi; 108hpi; 120hpi; 132hpi; 168hpi; 180hpi; 288hpi; 336hpi; 30<sup>o</sup> dia pós-inoculação (avaliação clínica).

#### 4.5 - Tratamento

O tratamento foi realizado com o objetivo de minimizar o risco de óbito, a partir de 36hpi, após a ordenha da tarde, por meio de três aplicações, com intervalos de 24h, administrando-se antimicrobiano intramamário<sup>4</sup> e sistêmico<sup>5</sup> (gentamicina intramamária 250mg e parenteral 4,4mg/kg), previamente testado *in vitro*, associado ao flunixinmeoglumine<sup>6</sup> (1,1mg/kg). O tratamento somente foi instituído após o surgimento da infecção e o diagnóstico bacteriológico positivo.

<sup>3</sup> Sonda uretral nº 4.

<sup>4</sup> Gentocin® mastite 250mg, Laboratório Shering Plough Coopers.

<sup>5</sup> Gentocin® solução injetável 40mg, Shering Plough Coopers.

<sup>6</sup> Banamine®, Shering Plough Coopers

## 4.6 – Avaliação Clínica

Os animais foram submetidos ao exame clínico de acordo com as recomendações descritas por Radostits et al. (2007), observando-se o comportamento, apetite, coloração das mucosas, temperatura corpórea, frequência cardíaca, frequência respiratória e dinâmica ruminal. O exame da glândula mamária foi realizado diariamente, pela manhã e pela tarde, conforme as recomendações de Grunert (1993).

## 4.7 - Colheita das amostras

### 4.7.1 – Sangue total

As amostras de sangue para a determinação do fibrinogênio plasmático foram colhidas mediante punção da veia jugular com agulha 25x8mm, adequadas para tubos a vácuo contendo anticoagulante EDTA a 10% (ácido etilenodiaminotetracético, sal dissódico). Para obtenção do soro, o sangue foi colhido conforme descrito anteriormente, em tubos siliconizados sem anticoagulante. Posteriormente foram centrifugados a 1600G durante cinco minutos. As amostras foram aliqüotadas e mantidas a -20°C para posterior realização da separação das frações protéicas e determinação dos minerais.

## 4.8 - Exames Laboratoriais

### 4.8.1 - Determinação do Fibrinogênio Plasmático

A Determinação do fibrinogênio plasmático foi realizada pelo método de precipitação pelo calor (56°C – 58°C) e a leitura realizada em refratômetro<sup>7</sup>, conforme preconizado por Jain (1986).

### 4.8.2 - Proteinograma

#### a) Determinação da proteína total sérica

A determinação da proteína total sérica foi realizada pelo método do biureto, empregando-se *kit* comercial<sup>8</sup> (GORNALL et al., 1949).

#### b) Separação das frações protéicas

A separação das frações protéicas foi realizada utilizando-se eletroforese em gel de acrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme técnica descrita por Laemmli (1970). Após o fracionamento o gel foi corado durante 10 minutos em solução de azul de coomassie, constituída de metanol (50%), água (40%), ácido acético glacial (9,75%) e

<sup>7</sup> Quimis

<sup>8</sup> Proteínas Totais - Labtest.

azul de coomassie (0,25%). Em seguida o gel foi colocado em solução de ácido acético a 7% para retirar o excesso de corante, até que as frações protéicas se apresentassem nítidas. As concentrações dessas proteínas foram determinadas em densitômetro computadorizado<sup>9</sup>. Como referência foi utilizado uma solução marcadora<sup>10</sup> com pesos moleculares 29.000, 45.000, 66.000, 97.400, 116.000 e 205.000 daltons (D), além das proteínas purificadas<sup>11</sup>.

#### **4.8.3 - Determinação do cobre, ferro e zinco**

A determinação dos níveis séricos do cobre (Cu), ferro (Fe) e zinco (Zn) foi realizada seguindo as descrições de Milles et al. (2001). Foi efetuada adicionando-se 9mL de uma solução composta por ácido tricloroacético a 10% e lantânio a 1% em 1 mL do soro, a fim de realizar a desproteinização. Em seguida, o composto foi agitado por 1 minuto e colocado em repouso durante 10 minutos, seguindo-se com a centrifugação a 2500 rpm, por 10 minutos. Por fim, foi retirado o sobrenadante e efetuada a leitura direta para Cu, Fe e Zn no aparelho Espectrofotômetro de Absorção Atômica – EAA<sup>12</sup> em chama.

#### **4.8.4 – Re-isolamento da cepa empregada como inóculo.**

As amostras de leite das glândulas inoculadas foram semeadas segundo as recomendações da FIL-IDF (1981). Foram observadas as características morfo-tintoriais e bioquímicas da cepa de *S. aureus* empregada como inóculo, seguindo as recomendações de isolamento de Carter & Cole Júnior (1990) e Quinn et al. (1994). As placas que não apresentaram crescimento bacteriano foram mantidas incubadas por até 96h antes de serem descartadas.

### **4.9 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa**

O trabalho obteve o parecer favorável da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA), Centro de Ciências Biológicas/Universidade Federal de Pernambuco em 10/05/06 (Lei 9.605-art.32 e decreto 3.179-art.17 de 21/09/99), estando de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo *National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals*.

<sup>9</sup> Shimadzu CS 9301, Tóquio-Japão.

<sup>10</sup> Sigma, St. Louis-MO, Estados Unidos.

<sup>11</sup> Albumina, IgG, haptoglobina,  $\alpha_1$ -antitripsina e transferrina.

<sup>12</sup> Varian, model SpectrAA 220.

#### 4.10- Análise Estatística dos Dados

As variáveis analisadas foram testadas, inicialmente, quanto à sua distribuição normal, utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados que não atenderam a estas premissas foram submetidos à transformação com base logarítmica ( $\text{Log } x+1$ ) ou pela raiz quadrada [ $\text{RQ } (x+1/2)$ ], segundo recomendações de Sampaio (1998).

Os dados com perfil de normalidade e os transformados foram submetidos à análise de variância (Teste F) utilizando-se o procedimento GLM do SAS (SAS, 2000), que separou como causa de variação os efeitos de momentos após a inoculação da cepa de *S. aureus*. Caso existisse significância no teste F as médias dos tratamentos foram comparadas pelo Teste de Duncan (SAMPAIO, 1998).

Realizaram-se, também, análises de regressão ajustadas dos minerais e das proteínas, em função dos momentos experimentais (com o perfil expresso pela equação de regressão) e seus respectivos coeficientes de correlação para verificar a relação entre pares de variáveis.

A significância obtida na regressão foi avaliada por meio do Teste F (LITTLE & HILLS, 1978), ficando estabelecido que existiria uma correlação de alta intensidade entre as variáveis quando  $r > 0,60$ ; média intensidade quando  $0,30 < r < 0,60$ ; e de baixa intensidade quando  $r < 0,30$ , sendo o nível de significância obtido para todas as correlações de  $p < 0,05$ .

Os dados foram analisados por meio do programa computacional *Statistical Analysis System* (SAS, 2000). Para todas as análises estatísticas realizadas foi adotado o nível de significância ( $p$ ) de 5%.



### **3- REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1- MASTITE OVINA**

A mastite é uma doença complexa com diversas causas, graus de intensidade, variações no curso e nas conseqüências. É geralmente causada pela penetração de bactérias patogênicas através do canal do teto para o interior da glândula mamária, onde se multiplicam causando a reação inflamatória do tecido glandular (SCHALM et al., 1971). Caracteriza-se por alterações físico-químicas e bacteriológicas no leite, e lesões irreparáveis no tecido mamário, bem como reações sistêmicas, que podem levar os animais à morte (LADEIRA, 2007; RADOSTITS et al., 2007).

Em ovinos, é considerada uma das enfermidades mais importantes, sendo responsável por prejuízos econômicos significativos causando a morte de cordeiros por inanição, descarte precoce de ovelhas e, ocasionalmente, a morte de animais adultos (KIRK & GLENN, 1996; WINTER, 2001).

Em caprinos e ovinos a perda da produção de leite representa a conseqüência econômica mais importante das infecções intramamárias. Da mesma forma que em bovinos, nos ovinos estas perdas são estimadas entre 22,8% a 27,3% nas ovelhas de primeira cria e de 37,3% em fêmeas de segunda cria. Estes valores variam segundo as características da infecção. Nas infecções unilaterais estas perdas situam-se em 11,5% da produção total, enquanto que se ocorrerem infecções bilaterais estas perdas podem chegar a 58,3% do total do leite produzido (KIRK & GLENN, 1996; SILVA, 1999).

Os fatores predisponentes para a ocorrência da enfermidade incluem traumas associados ao tamanho dos borregos; a conformação do úbere; o número de crias; a idade das ovelhas; o período seco; o estágio da lactação e os sistemas de manejo e ordenha (MENZIES & RAMANOON, 2001). A condição corporal das ovelhas ao parto e durante o início da lactação constitui uma condição de extrema importância, pois fêmeas que produzem pouco leite para o número de cordeiros são particularmente predispostas a lesões nas tetas (WINTER, 2001). A má conformação do úbere pode impedir o acesso de borregos lactentes e levar a um acúmulo de leite nas glândulas, predispondo à mastite. A prevalência da mastite em ovelhas mais velhas é significativamente maior, assim como no terço final da lactação independente da idade. Quanto aos sistemas de ordenha e manejo, ovelhas ordenhadas

manualmente têm altos índices de mastite subclínica, o mesmo vale para a superlotação em sistemas de manejo intensivo (MENZIES & RAMANOON, 2001).

Muitos microrganismos têm sido relatados como causadores de mastite. As bactérias são os agentes isolados e identificados com maior frequência em casos de mastite ovina, entretanto sabe-se que fungos, leveduras, algas e alguns vírus também podem infectar a glândula mamária de ovelhas. O *Staphylococcus* spp são os mais frequentemente diagnosticados como agentes de infecção intra-mamária. Outros microrganismos também têm sido relatados como causadores de mastite clínica, entre os quais *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, *Corynebacterium bovis*, *Actinomyces pyogenes*, *Histophilus ovis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (KIRK & GLENN, 1996; MENZIES & RAMANOON, 2001; WINTER, 2001, CONTRERAS et al., 2007). Oliveira (2007) relataram *S. aureus* como principal agente de mastite clínica em ovelhas no Agreste de Pernambuco. Como agentes de mastite subclínica destacam-se os *Staphylococcus* coagulase-negativo, já tendo sido também relatados *S. aureus*, *Corynebacterium* spp, *Streptococcus* spp, *Micrococcus* sp., *Bacillus* spp., enterobactérias, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas* spp, entre outros (KIRK & GLENN, 1996; MENZIES & RAMANOON, 2001; Mc DOUGALL et al., 2002; COUTINHO et al., 2006, DOMINGUES et al. 2006, ALMEIDA et al., 2007).

Para que a infecção se estabeleça é necessário que o microorganismo tenha acesso à glândula mamária, através do canal da teta e que os fatores de virulência do agente, suplantem os mecanismos de defesa do úbere; levando à infecção (VESTWEBER & LEIPOLD, 1993; SUTRA & POUTREL, 1994). O *S. aureus* tem demonstrado capacidade de aderência às células do ducto epitelial *in vitro*. No entanto, esta característica de adesão não foi claramente demonstrada *in vivo*. Tem sido sugerido que a adesão exerce grande influência na virulência deste agente, já que a bactéria deverá superar o efeito de limpeza que a ordenha exerce na cisterna da teta (PERSSON et al., 1995).

A mastite estafilocócica, em geral causada por *S. aureus*, é mundialmente a forma mais comum de mastite. Pode ser subclínica, aguda ou crônica, sendo a maioria subclínica. As formas superaguda e gangrenosa estão associadas a reações sistêmicas graves e podem ser fatais. *S. aureus* pode produzir quatro toxinas hemolíticas diferentes:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ -toxinas, destas, a  $\alpha$  e  $\beta$ -toxinas parecem exercer o papel principal na virulência bacteriana. A  $\alpha$ -toxina é produzida entre 20% e 50% das cepas causadoras de mastite bovina. A  $\beta$ -toxina é produzida por 75% a 100% destas cepas (SUTRA & POUTREL, 1994). O rápido crescimento de *Staphylococcus* sp, com a produção de altas concentrações de  $\alpha$ -toxina pode

resultar em vasoconstrição, isquemia e um rápido desenvolvimento de gangrena, acarretando alterações sistêmicas, que podem ser fatais (SCHALM et al., 1971, PYÖRÄLÄ, 1995).

Os *Staphylococcus* coagulase-positiva cresce melhor em condições de restrição de ferro quando comparados aos *Staphylococcus* coagulase-negativa. Nestas condições, as cepas coagulase-positivas produzem um sideróforo, a estafiloferrina B, que é responsável pela obtenção de Fe a partir de fontes extracelulares, como a transferrina. As cepas de *S. aureus* que causam mastite em bovinos já foram identificadas como produtoras de cápsulas e “pseudocápsulas” de carboidratos associados frouxamente que favorecem a resistência do microrganismo (HIRSH & ZEE, 1999).

Na forma aguda da doença, na qual o agente envolvido é o *S. aureus* os sinais clínicos surgem dentro de poucas horas, o úbere fica quente, edemaciado, há elevação da temperatura retal (40-42°C), anorexia e severa claudicação. A pele da glândula mamária torna-se avermelhada, com a evolução da doença fica púrpura escura (azulada) e finalmente adquire a cor preta, quando a mama gangrena. A secreção láctea é usualmente em pequena quantidade e de aspecto soro-sanguinolento, a qual finalmente pode secar. A forma aguda gangrenosa caracteriza-se por rápida e maciça multiplicação de bactérias e necrose da glândula infectada, é incomum em vacas, mas frequente em cabras e ovelhas (BRUÈRE & WEST, 1993; SUTRA & POUTREL, 1994; SIMÃO, 2004). Persson-Waller et al. (1997) induziram mastite experimental com a inoculação de *S. aureus* e *E. coli* em ovelhas em lactação, com o objetivo de avaliar o acúmulo de leucócitos e citocinas no úbere, durante a infecção. O *S. aureus* induziu um significativo acúmulo de leucócitos no leite, além de febre e um intenso aumento de volume do úbere.

Os índices de cura bacteriológica da mastite clínica causada por *S. aureus*, são frequentemente baixos. Se este tipo de mastite não for tratado satisfatoriamente, a doença pode assumir a forma crônica, apresentando elevados índices na contagem de células somáticas (CCS). Animais infectados cronicamente são importantes fontes de infecção, sendo necessárias ferramentas diagnósticas para a identificação precoce destes animais (GRÖNLUND et al., 2003).

Segundo Ganheim et al. (2007), a presença de doenças nos rebanhos pode causar custos significativos para produtores, bem como resultar em problemas sérios inerentes ao bem-estar animal, uma consideração importante dada à preocupação ascendente sobre bem-estar animal e segurança alimentar. Ferramentas para a vigilância do estado de hígidez do rebanho poderiam ser um componente útil de um programa de sanidade, existindo desta forma a necessidade de se identificar novos indicadores de saúde e doença.

O diagnóstico rápido e seguro da mastite é primordial, pois otimiza o tratamento e minimiza o tempo de recuperação, reduzindo as perdas na produção e possibilitando o restabelecimento do bem-estar. Atualmente, este diagnóstico é feito primordialmente com base no exame clínico, contagem de células somáticas e exames bacteriológicos do leite. No entanto, a demanda por marcadores objetivos e de rápido processamento que indiquem a saúde da glândula mamária tem crescido significativamente com a implantação dos sistemas mecanizados de produção. Desta forma, tem sido sugerido que as proteínas de fase aguda seriam indicadores confiáveis de inflamação da glândula mamária (HIRVONEN et al., 1996; ECKERSALL et al., 2001).

### **3.2- PROTEINOGRAMA / PROTEÍNAS DE FASE AGUDA**

As proteínas são componentes indispensáveis à vida, representando a base da estrutura de células, tecidos e órgãos. Funcionam como catalisadores enzimáticos nas reações bioquímicas, carreadores de muitos constituintes do plasma e na defesa orgânica como anticorpos (KANEKO, 1989; JAIN, 1993). Pelo significado biológico e múltiplas funções exercidas no organismo animal, a avaliação dos níveis séricos das proteínas totais e de suas frações (albumina, alfa globulinas, beta globulinas e gama globulinas), obtidas por eletroforese, representa um importante auxílio ao diagnóstico clínico (KANEKO, 1989).

As globulinas, geralmente, são separadas eletroforeticamente nas frações alfa, beta e gama, as quais contêm sub-frações com padrões de migração eletroforética similares e onde estão contidas as proteínas de fase aguda (JAIN, 1993).

Alterações nos padrões das frações protéicas não são características de uma doença em particular, mas podem trazer importantes informações diagnósticas, quando usadas em conjunto com outros achados clínicos e laboratoriais (THOMAS, 2000).

Durante os estágios iniciais da resposta inflamatória, o organismo monta um sistema de defesa conhecido como resposta de fase aguda, o qual é caracterizado por um aumento consistente na produção hepática de uma série de proteínas, chamadas de proteínas de fase aguda (PFA). A produção de PFA é mediada pela ação de citocinas pró-inflamatórias liberadas nos estágios iniciais da infecção e/ou inflamação, e sua concentração pode aumentar (PFA positiva) ou diminuir (PFA negativa) como consequência do estímulo inflamatório. A função destas PFA é ligar-se a moléculas que oferecem risco ao organismo, bem como a debris resultantes da injúria tissular, e assim promover a eliminação destes organismos patogênicos e o reparo do tecido (DEIGNAN et al., 2000).

Proteínas que diminuem suas concentrações séricas como resposta ao processo inflamatório são denominadas proteínas de fase aguda negativa, e incluem a albumina e transferrina. Já as proteínas que aumentam suas concentrações séricas sob o mesmo estímulo são conhecidas como proteínas de fase aguda positiva, tais como a proteína C-reativa, glicoproteína ácida- $\alpha_1$ , antitripsina- $\alpha_1$ , antiqumotripsina- $\alpha_1$ , amilóide sérica-A, ceruloplasmina, haptoglobina,  $\alpha_2$ -macroglobina, fibrinogênio e componentes do complemento (THOMAS, 2000). Segundo Fournier et al. (2000), as proteínas de fase aguda positivas podem ser subdivididas em PFA do tipo I, incluído neste grupo a  $GPA\alpha_1$ , componentes do Complemento 3 (C3), amilóide sérica-A, proteína C-reativa, haptoglobina e hemopexina, que são reguladas pela IL-1, IL-6 e glicocorticóides e as PFA do tipo II, representadas pelo fibrinogênio e vários inibidores de protease, sendo estes estimulados por citocinas do tipo IL-6 e glicocorticóides.

Concentrações elevadas de PFA no plasma são tidas como indicadores inespecíficos da inflamação, não sendo específicas para nenhum processo patológico em particular. No entanto, a concentração destas proteínas em outros fluidos orgânicos, que não o plasma, pode fornecer informações úteis pertinentes ao status inflamatório do tecido secretório (O'MAHONY et al., 2006). Eckersall et al. (2001) foram os primeiros a demonstrar, em bovinos, aumentos significativos nas concentrações de PFA no leite de vacas acometidas por mastite clínica (NIELSEN et al., 2004). A reação inflamatória provocada pela forma aguda da mastite aumenta a permeabilidade capilar da mama, permitindo a infiltração de polimorfonucleares e resultando na liberação de fatores humorais que desencadeiam eventos sistêmicos. Este fenômeno de fase aguda, já relatado em bovinos nos casos de mastite causada por endotoxina, acarreta manifestações como febre, aumento dos níveis de cortisol e das PFA (CONNER et al., 1986; LOHUIS et al., 1990; SANDHOLM, 1995; PIÑEIRO et al., 2007).

Há mais de trinta anos, a proteína C-reativa foi a primeira proteína de fase aguda a ser reconhecida. Em humanos, esta proteína se tornou a mais importante PFA a ser analisada a fim de fornecer informações acerca da presença de lesões inflamatórias, do prognóstico e da resposta ao tratamento (ECKERSALL, 2000). No entanto, há diferenças substanciais entre espécies quanto às mudanças relativas à síntese e liberação de proteínas de fase aguda após estímulo. Assim, enquanto a proteína C-reativa é uma importante PFA em humanos, caninos e suínos, em ruminantes a sua concentração sérica é dificilmente alterada na presença de inflamação ou infecção. Em contraste, a haptoglobina é uma importante PFA em ruminantes, nos quais a concentração circulante fisiológica é desprezível em animais saudáveis,

aumentando mais de 100 vezes quando há estímulo para tal (ECKERSALL, 2000; HISS et al., 2004).

Nielsen et al. (2004), avaliando a relação entre as concentrações de proteínas de fase aguda no soro e no leite de um grupo de vacas acometidas por mastite, outro grupo com processos inflamatórios extra-mamários e um terceiro de vacas sadias, concluíam que a amilóide sérica-A e a haptoglobina, duas PFA bovinas, foram úteis na monitorização da higidez da glândula mamária em sistemas mecanizados de produção leiteira.

A síntese extra-hepática de PFA tem sido relatada em animais de produção, embora as informações ainda sejam escassas (NIELSEN et al. 2004; GRONLUND et al., 2005; COORAY et al., 2007). Uma das primeiras citações em animais se deve a McDonald et al. (2001), que identificaram um isótopo de amilóide sérica-A3 no colostro bovino. Hiss et al. (2004) em trabalho com mastite experimentalmente induzida em vacas, concluíram que o aumento precoce nas concentrações de PFA no leite poderia indicar produção local destas proteínas e não apenas tratar-se das mudanças na permeabilidade da barreira (*blood-milk barrier*) que permitiriam o extravasamento das PFA do sangue para o leite. Em trabalho com mastite clínica em bovinos, Eckersall et al. (2001), observaram que não houve correlação entre as concentrações de amilóide sérica-A no soro e no leite, e sugeriram que isto poderia indicar que a proteína foi produzida na glândula mamária infectada.

Já foi demonstrado que, em alguns casos, o aumento nas concentrações de PFA precede o início do aumento na contagem de células somáticas no leite de vacas com mastite clínica (HOGARTH et al., 2002). Grönlund et al. (2003) ressaltaram ainda que em algumas situações a contagem de células somáticas é realizada em amostras de leite advindas do reservatório do total de leite produzido, e desta forma uma moderada alteração na contagem de células somáticas em um quarto afetado por mastite subclínica pode facilmente passar despercebida.

De acordo com O'MAHONY, et al. (2006) várias técnicas já estão bem estabelecidas dentro da análise de rotina do diagnóstico da mastite no leite, a fim de garantir a segurança alimentar, a exemplo do *California Mastitis Test* (CMT) e a contagem de células somáticas (CCS). No entanto, a quantificação de PFA pode não apenas detectar a presença de um processo inflamatório em franca ação, mas também indicar um prognóstico e/ou monitorar a resposta do indivíduo à terapia instituída (ECKERSALL, 2000).

O fracionamento eletroforético representa um dos mais confiáveis métodos de identificação de proteínas sanguíneas (KANEKO, 1989). As técnicas de eletroforese mais utilizadas têm como matrizes fitas de acetato de celulose ou filmes de agarose, as quais

apresentam valor limitado porque permitem o fracionamento de apenas cinco a sete grupos de proteínas (KEAY & DOXEY, 1982; KANEKO et al., 1997). Gordon (1975) relatou que a técnica de eletroforese em gel de acrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) é relativamente simples e de baixo custo, possibilitando a visualização de concentrações protéicas extremamente baixas e a identificação de 20 a 30 proteínas incluindo as imunoglobulinas, ceruloplasmina, transferrina, hemopexina, albumina, antitripsina, haptoglobina, tripsina, dentre outras, necessitando de micro-quantidade de amostra. O emprego da técnica SDS-PAGE pode ser útil na avaliação da cinética das proteínas de fase aguda da resposta inflamatória, facilitando o estabelecimento do diagnóstico, prognóstico e monitoramento das doenças animais (FAGLIARI e SILVA, 2002; FAGLIARI et al., 2006).

### **3.2.1 HAPTOGLOBINA**

A haptoglobina é uma alfa-globulina, com vida média de dois a quatro dias, sendo importante na manutenção da homeostase do ferro, bem como em doenças influenciadas pelo metabolismo férrico (MURATA et al., 2004). Eaton et al. (1982) atribuíram a esta proteína a ação bacteriostática por sua capacidade de ligar-se a hemoglobina livre, indisponibilizando-a como fonte de ferro para o microrganismo agressor.

A quantificação de PFA como biomarcador para infecção ou inflamação vem sendo estabelecida em várias espécies. A haptoglobina foi reportada como um importante indicador diagnóstico da inflamação aguda, em bovinos e ovinos, mas somente agora está sendo recomendada para uso na rotina clínica (SKINNER et al., 2001). Esta proteína de fase aguda é estimulada pela liberação de citocinas como interleucina 1 (IL-1), interleucina (IL-6) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) a partir de macrófagos e monócitos no sítio da inflamação ou infecção (ECKERSALL, 2000). Os hepatócitos são considerados sua principal origem, porém expressões de HPT RNAm têm sido encontradas na glândula mamária e em leucócitos de animais saudáveis (COORAY et al., 2007). Por ser uma proteína “hemoglobina-ligante” a mensuração de HPT em casos de crises hemolíticas não é confiável (THOMAS, 2000).

Segundo Cole et al. (1997), a concentração de HPT corresponde aproximadamente a extensão da injúria tissular resultante do processo inflamatório agudo. Com a presença de injúria tissular severa, a concentração de HPT aumenta rapidamente, geralmente um pouco antes da elevação do fibrinogênio plasmático. A concentração plasmática de HPT geralmente retorna ao normal dentro de sete a 10 dias do início do processo inflamatório. Na maioria dos casos, os níveis de HPT diminuem antes da diminuição dos níveis de fibrinogênio plasmático. Em estudo com mastite experimentalmente induzida por endotoxinas em bovinos, Hiss et al.

(2004) observaram um aumento nas concentrações séricas de HPT três horas após a inoculação intramamária.

Matos (2005), em estudo com haptoglobina, ceruloplasmina e fibrinogênio plasmático em crias ovinas e ovelhas nos períodos de pré-parto e lactação, concluiu que a idade, o sexo e o tipo racial não influenciaram as concentrações séricas destas proteínas de fase aguda.

Em ovinos com obstrução bronquial e pneumonia foi verificado que a mensuração plasmática dos níveis de ceruloplasmina, fibrinogênio e haptoglobina se mostraram melhores indicadores de dano tissular que o número de neutrófilos circulantes (PFEFFER & ROGERS, 1989).

Scott et al. (1992), investigando a capacidade prognóstica da haptoglobina sérica para casos de distocia na espécie ovina, observaram leves aumentos nas concentrações desta proteína no periparto, inclusive nos animais controle que apresentaram parto eutócico.

Elevações consistentes da HPT têm sido observadas durante a mastite ou em leite oriundo de quartos mamários acometidos por mastite subclínica (GRONLUND et al., 2005). Foi também, demonstrado que as concentrações de HPT elevam-se drasticamente, tanto no plasma sanguíneo como no leite, de animais mastíticos (ECKERSALL et al., 2001; COORAY et al., 2007). Para Eaton et al. (1982), a função biológica da síntese de HPT na glândula mamária durante episódios de mastite pode estar relacionada às propriedades bacteriostáticas desta proteína. Acredita-se que a haptoglobina possui um efeito bacteriostático, restringindo a disponibilidade do ferro necessária para o crescimento bacteriano (PETERSEN et al., 2004). A HPT bloqueia o crescimento da *Escherichia coli*, estimulado por ferro em ratos *in vivo*, impedindo a utilização deste mineral a partir da hemoglobina pelo microrganismo. Neste caso, ela poderia substituir ou complementar a função da lactoferrina. Não se sabe ainda se a HPT é capaz de prevenir o crescimento de outros patógenos que não a *E. coli*. O *Staphylococcus aureus*, por exemplo possui múltiplos sistemas de aquisição do Fe, incluindo a fração *hemin* (DIARRA et al., 2002).

Ohtsuka et al. (2001), trabalhando com 18 vacas infectadas com *E. coli*, avaliaram a resposta de fase aguda por meio da mensuração de HPT e glicoproteína ácida- $\alpha_1$  (GPA $\alpha_1$ ) registrando-se que o aumento nas concentrações de GPA $\alpha_1$  foi mais tardio que o da HPT, demonstrando que essas duas PFA são reguladas de forma distinta.

Segundo Hirvonen et al. (1996), em pesquisa visando avaliar a resposta de fase aguda por meio da determinação da haptoglobina, fibrinogênio, glicoproteína ácida e inibidores de protease- $\alpha_1$  em novilhas com mastite experimentalmente induzida por *Actinomyces pyogenes*, *Fusobacterium necrophorum* e *Peptostreptococcus indolicus*, verificaram que a haptoglobina



demonstrou ter um bom valor diagnóstico e prognóstico da infecção, apresentando elevações significativas nos animais severamente acometidos. Além disto, também demonstrou eficácia como indicador prognóstico, corroborando com os achados de Pachauri et al. (2002), que investigaram a utilidade da HPT como marcador sensível para a mastite em bovinos e sua utilidade como indicador prognóstico. Hirvonen et al. (1996), ressaltaram que em casos de mastite a campo, a avaliação diagnóstica é difícil, pois usualmente não se sabe a duração da infecção, sendo benéfico nestas situações a determinação de proteínas de fase aguda, como a haptoglobina.

Horadagoda et al. (1999), afirmaram que para a espécie bovina, as mensurações de proteínas de fase aguda, especialmente HPT e amilóide sérica-A (ASA), podem diferenciar melhor as inflamações agudas das crônicas, quando comparadas aos testes hematológicos. Skinner & Roberts (1994), num estudo com ovelhas, confirmaram que a haptoglobina (HPT) foi melhor indicador de infecção bacteriana quando comparado ao exame hematológico.

### 3.2.2 CERULOPLASMINA

Ceruloplasmina é uma ferroxidase, pois oxida metal ferroso tóxico para sua forma férrica não tóxica, protegendo o tecido de danos provocados por radicais livres ferro-mediados estando envolvida em atividades anti-oxidantes e citoprotetoras (JAIN, 1993; PATEL et al., 2002). Transporta, aproximadamente 90,0% do cobre plasmático e o armazena no fígado e em outros tecidos, sendo cada molécula capaz de ligar-se a seis a oito átomos de cobre ( $\text{Cu}^{3+}$ ). Tem grande importância na homeostase do cobre e na mobilização do ferro (JAIN, 1993). Está envolvida na transferência de cobre dentro das células para a síntese de citocromo oxidase, no metabolismo do ferro e também como antioxidante, podendo ser o principal inibidor extracelular da autooxidação de lipídio plasmático ou “removedor” de oxigênio derivados de radicais livres secretados pelos fagócitos (ECKERSALL & CONNER 1988). A ceruloplasmina pode agir como agente anti-inflamatório reduzindo a adesão neutrofílica ao endotélio e agindo como um destruidor da peroxidase (SEGELMARK et al., 1997).

A aplicação da ceruloplasmina como biomarcador diagnóstico permanece menos comum que a de outras proteínas de fase aguda. No entanto, tem sido demonstrado que esta ferroxidase é um indicador de infecção em bovinos e ovinos (PFEFFER & ROGERS, 1989; PFEFFER et al., 1993; SEGELMARK et al., 1997).

Chassagne et al. (1998) investigando indicadores precoces para a mastite bovina em vacas sob condições de campo na França, concluíram que a ceruloplasmina pode ser um

importante indicador quanto ao risco de mastite clínica em vacas leiteiras. Os níveis de ceruloplasmina se elevaram em bezerros após administração de endotoxinas, no entanto não houve alteração em bezerros infectados com *Pasteurella haemolytica*, apesar de ter sido evidenciado o aumento de outras proteínas de fase aguda, como a haptoglobina em ambos os grupos (CONNER et al., 1989). Fagliari et al (2003) em estudo com bovinos observaram elevação desta proteína de fase aguda após o dano tecidual.

### 3.2.3 GLICOPROTEÍNA ÁCIDA $\alpha$ -1

Uma fração das glicoproteínas séricas, ricas em polissacarídeos ácidos, foi designada por Winzler., no início dos anos 50, como “mucoproteína”, sendo uma das primeiras frações a serem isoladas e relacionadas como proteínas de fase aguda. A Glicoproteína Ácida  $\alpha$ -1 também conhecida como orosomucóide ou seromucóide, é o componente mais importante da fração mucoproteína presente no soro, sendo a porção carboidrato da molécula relacionada a processos de modulação do sistema imune, é muito ácida (pH 3,5) e possui alto teor de carboidrato (45%), o que a torna muito estável. É uma glicoproteína (mucoproteína ou seromucóide) sintetizada e secretada principalmente por hepatócitos. A síntese e glicosilação desta proteína é independentemente regulada, tanto por citocinas como por glicocorticóides. A presença local de  $GPA\alpha_1$  pode contribuir para a manutenção da homeostase reduzindo o dano tecidual associado ao processo inflamatório em curso, em tipos celulares extrahepáticos, notavelmente células endoteliais e epiteliais. A  $GPA\alpha_1$  apresenta duas funções fisiológicas básicas, transporte de drogas e imunomodulação. Como a albumina sérica, a mais importante proteína droga-ligante, a  $GPA\alpha_1$  se liga e transporta substâncias de origem endógena e exógena como heparina, histamina, serotonina e esteróides. Esta função contribui para a manutenção da ligação e transporte de drogas, que permanece inalterado durante respostas de fase aguda, nas quais a albumina sérica, uma proteína de fase aguda negativa, decresce em concentração (FOURNIER et al., 2000; HOCHEPIED et al., 2003).

Para Fournier et al. (2000), a  $GPA\alpha_1$  é um agente anti-inflamatório natural, inibindo a ativação neutrofílica e aumentando a secreção de receptores antagonistas de IL-1 pelos macrófagos. A  $GPA\alpha_1$  também ajuda a intensificar o *clearance* de lipopolissacarídeos ligando-se diretamente a eles e neutralizando sua toxicidade (HOCHEPIED et al., 2003). Tem sido reportada como uma proteína de fase aguda clinicamente importante em bovinos para a monitorização de processos inflamatórios (MURATA et al., 2004). A glicoproteína ácida também é relatada como uma PFA importante na clínica de ovinos no monitoramento de

infecção e processos inflamatórios em geral (REGASSA & NOAKES, 1999; ECKERSALL et al., 2001; REGASSA et al., 2001).

Valores elevados desta proteína foram relatados em bovinos com pericardite traumática, artrite, mastite, pneumonia, leucemia, abscessos hepáticos e hepatites (TAMURA et al., 1989). Apesar da elevação desta proteína não caracterizar um diagnóstico específico, sua elevação parece correlacionar-se com a extensão da lesão. O mecanismo de incremento da síntese desta proteína ainda é desconhecido, no entanto esta elevação está relacionada com o aumento da síntese pelos hepatócitos em resposta às citocinas (IL-1 e fator de necrose tumoral) secretadas pela ativação de macrófagos (JAIN, 1993).

O aumento nos níveis séricos desta proteína foi observado quatro a seis dias pós-inoculação experimental e natural de *F. Necrophorum* na indução de abscessos hepáticos, atingindo valores máximos em muitos casos, por volta de seis a oito dias, persistindo por várias semanas (MOTOI et al, 1992).

#### **3.2.4 ANTITRIPSINA $\alpha_1$**

A antitripsina- $\alpha_1$  é uma globulina que quando separada eletroforéticamente se mostra na fração  $\alpha_1$  globulina, correspondendo a cerca de 65% desta fração, portanto baixos valores de  $\alpha_1$  costuma indicar baixos níveis de antitripsina. É o principal componente da alfa-1-globulina, aumentando de forma rápida, mas inespecífica em processos inflamatórios (KANEKO et al., 1997).

A antripsina- $\alpha_1$  é uma das proteínas de fase aguda com atividade inibidora de protease (elastase). Durante eventos inflamatórios, elas são sintetizadas principalmente pelo fígado com a finalidade de remover proteases que são liberadas após danos teciduais. A antripsina- $\alpha_1$  é notavelmente a principal inibidora de protease circulante que protege tecidos contra a ação da elastase neutrofílica, impedindo a ocorrência de dano tecidual (MURATA et al., 2004).

Hirvonen et al. (1996) estudando a resposta de fase aguda em novilhas com mastite induzida observaram que os níveis séricos de antripsina- $\alpha_1$  se elevaram somente em animais severamente acometidos, sugerindo que tenham sofrido atividade proteolítica prolongada. Também concluíram que esta proteína não mostrou eficácia em predizer a severidade e prognóstico da infecção. Em contraposição, aumentos nos níveis séricos destes inibidores têm sido reportados em bovinos com foco inflamatório (CONNER et al., 1989).

Fagliari et al. (2003) constataram elevações significativas nos níveis de antitripsina  $\alpha_1$  em novilhas com pasteurelose pneumônica experimental.

Segundo Murata et al. (2004), a aplicação de inibidores de proteases ainda não é largamente utilizada na medicina veterinária, por conseguinte, o valor diagnóstico destas proteínas de fase aguda não foi até então confirmado.

### 3.2.5 TRANSFERRINA

A transferrina (Tf) é uma glicoproteína plasmática com a função primordial de transporte do ferro no plasma e no líquido extracelular para suprir as necessidades teciduais. Por esta razão é considerada como proteína ligante de ferro, sendo sua secreção estimulada a partir da interleucina-1 e possuindo meia vida em torno de oito a dez dias, apresentando atividade antiviral e antibacteriana. A concentração de transferrina sérica aumenta em estados de deficiência férrica e prenhez e diminui em doenças hepáticas, infecções agudas e crônicas e leucemia (JAIN, 1993; TIZARD, 2002). Em ruminantes é considerada uma proteína de fase aguda negativa, apresentando diminuição nos seus níveis séricos durante infecções.

Os níveis de ferro nos fluidos corpóreos têm influência sobre a invasão bacteriana, pois muitas bactérias necessitam deste mineral para o seu crescimento. Quando os níveis estão elevados, os animais tornam-se mais susceptíveis à infecção bacteriana (TIZARD, 2002).

Em bovinos, com doença inflamatória crônica, os níveis séricos de Tf decrescem, no entanto se apresentam dentro do limite fisiológico nas infecções agudas, cetose ou após a administração de endotoxinas (THOMAS, 2000).

Segundo Weinberg, (1978), as proteínas da classe das transferrinas são primariamente produzidas nos hepatócitos, porém também há síntese em macrófagos, células de Sertoli e células do epitélio mamário.

Cada molécula de Tf é capaz de ligar-se a dois átomos de Fe e normalmente, apenas um terço de toda a Tf está saturada com Fe. Estas proteínas são encontradas no plasma e em secreções biológicas como leite, muco bronquial ou nasal, saliva, lágrimas, fluido gastrointestinal, bile, fluido sinovial, urina, muco cervical e fluido seminal (WEINBERG, 1978; DE JONG et al., 1990).

Em humanos, consideráveis evidências *in vitro* têm sido obtidas quanto à função microbiostática da transferrina. No entanto, a função microbiostática da lactoferrina foi amplamente estudada, sabendo-se que a lactoferrina, em pH entre 6.4 a 6.7, apresenta maior afeição por Fe que a transferrina no soro e possivelmente facilita a transferência de Fe do plasma para o leite (WEINBERG, 1978; DE JONG et al., 1990).

A glândula mamária da vaca aumenta a síntese de lactoferrina quando exposta à invasão microbiana. Em pesquisa realizada com fêmeas saudáveis, em lactação e secas, a quantidade de lactoferrina começa a aumentar dois dias após o término da lactação regular. Alguns autores acreditam que grandes quantidades de lactoferrina e baixas quantidades de citrato na glândula mamária involuída de vacas secas contribuem para a considerável resistência deste sítio à invasão microbiana (SMITH & SCHANBACHER, 1977). Komine et al. (2006) afirmaram que a lactoferrina é um indicador diagnóstico de mastite em vacas lactantes.

### **3.2.6 ALBUMINA**

A albumina é a fração mais homogênea, solúvel e estável, quando comparada as globulinas, sendo a proteína encontrada em maior quantidade no plasma. Por ser uma grande molécula, é normalmente retida pelos capilares, sendo a primeira proteína a ser perdida a partir do sangue durante danos tissulares. O seu formato singular e altamente flexível lhe permite possuir várias funções no organismo; a principal é a de regulação e manutenção da pressão colóido-osmótica do plasma sendo a proteína plasmática mais osmoticamente ativa, respondendo por cerca de 75% da atividade (JAIN, 1993).

É sintetizada no fígado, sendo a síntese influenciada pelo estado nutricional, hormonal e condição geral deste órgão. Vários fatores podem influenciar a síntese de albumina como nutrição, pressão colóido-osmótica do plasma, concentração intracelular de potássio e hormônios, sendo os dois primeiros mais influentes. Os efeitos exercidos pelo cortisol, tiroxina, hormônios sexuais e do crescimento são aditivos, estimulando a síntese. Essa síntese é deprimida em resposta a processos inflamatórios, sendo considerada uma proteína de fase aguda negativa, sendo regulada pela interleucina 1 (IL-1) e outras citocinas (KANEKO et al., 1997; THOMAS, 2000; MAZZAFERRO et al., 2002).

Praticamente todos os constituintes plasmáticos que não estão ligados a uma proteína específica de transporte, e às vezes até os que já estão, como a tiroxina, são transportados pela albumina, inclusive os microelementos, como o cálcio, o cobre e o zinco (JAIN, 1993; MAZZAFERRO et al., 2002).

A hipoalbuminemia pode comprometer o aporte de zinco, substratos energéticos e drogas para os tecidos com danos inflamatórios, o que pode explicar o retardo no processo de reparação em pacientes enfermos com déficit dos níveis de albumina. Em adição, ocorre uma diminuição da síntese de albumina em processos inflamatórios sistêmicos devido à produção preferencial de proteínas de fase aguda. A hipoalbuminemia também tem sido correlacionada

a um aumento da morbidade e mortalidade tanto em humanos como em animais (MAZZAFERRO et al., 2002).

A desnaturação da albumina no sítio do foco inflamatório pode ocorrer devido a mudanças na temperatura e pH. Essa desnaturação no local da inflamação libera aminoácidos que podem ser utilizados na reparação tecidual. (JAIN, 1993; MAZZAFERRO et al., 2002).

### **3.2.7 HEMOPEXINA**

A hemopexina é uma  $\beta$ 1-globulina, que corresponde a aproximadamente 30% do valor total desta fração (CANAVESSI, 1997). É primordialmente produzida pelos hepatócitos e age como uma proteína de fase aguda, sendo sintetizada após eventos inflamatórios. Níveis séricos de hemopexina são monitorados a fim de revelar a seriedade de casos de hemólise intravascular. Elevados níveis séricos ou plasmáticos de hemopexina estão também associados a doenças neuromusculares crônicas e porfiria aguda intermitente em humanos. Esta proteína está envolvida com a ligação de partículas Heme, uma molécula lipofílica de solubilidade limitada que pode induzir estresse oxidativo (GOMIS-RÜTH, 2004). Protege as células que não possuem receptores Heme por meio de fortes ligações a estas moléculas impedindo seus efeitos deletérios. Impede também os efeitos deletérios do ferro, que na sua forma livre é tóxico, pois este se liga a ferritina e a produção de ferritina é estimulada pela hemopexina (ESKEW et al., 1999). A hemopexina acarreta o seqüestro de frações Heme indisponibilizando o ferro para patógenos invasores, além de prevenir o acesso destes a fontes orgânicas dessas substâncias. As principais fontes de frações Heme são a hemoglobina oriunda de eritrócitos lisados, catalases, peroxidases e citocromos, estando seus níveis elevados principalmente em casos de hemólise (GOMIS-RÜTH, 2004).

### **3.2.8 FIBRINOGENIO**

O fibrinogênio plasmático é uma glicoproteína, primariamente ligada à hemostasia, serve de substrato para a trombina na formação de fibrina (JAIN, 1993), sendo de fundamental importância para o processo de coagulação, e participa na reparação tissular através da migração de células inflamatórias, fibroblastos e células endoteliais (THOMAS, 2000). É a maior das proteínas globulínicas plasmáticas e é a PFA mais utilizada para se avaliar a reação de fase aguda em bovinos, devido à facilidade de mensuração e rapidez na obtenção dos resultados (SMITH, 1993; COLE et al., 1997).

A determinação do fibrinogênio em bovinos tem a vantagem de detectar não somente doenças inflamatórias, mas também a destruição dos tecidos, melhor que os leucócitos. Os

ruminantes não têm uma reserva satisfatória de neutrófilos maduros na medula óssea, podendo não ocorrer uma resposta neutrofilica, ou seja, nas situações inflamatórias agudas, pode ocorrer leucopenia, ou nos casos crônicos os valores dos leucócitos podem permanecer inalterados (JAIN, 1993; KRAMER, 2000).

Segundo Jain (1993), cerca de 50,0 a 84,0% do fibrinogênio está localizado intravascularmente até que se dirija ao tecido lesado em processos patológicos. Adicionalmente, Mcsherry et al. (1970), descreveram que esta proteína também pode ser encontrada em vasos linfáticos, tecidos conectivos e no espaço intersticial. Entre 24 e 36 horas após a injúria tecidual, as concentrações de fibrinogênio se elevam precedendo qualquer aumento nas gama globulinas. A concentração tende a se manter elevada durante o processo patológico pelo tempo que ele permaneça ativo e até que a demanda pelo mesmo não exceda a capacidade hepática de produção. No entanto, sua concentração geralmente retorna aos níveis fisiológicos dentro de alguns dias, após o fim da destruição tissular ativa, deixando uma contínua elevação nas gama globulinas, que são características de processos crônicos (COLE et al., 1997).

McSherry et al. (1970) avaliando o fibrinogênio plasmático em bovinos saudáveis e doentes de diferentes faixas etárias, não observaram variações quanto ao sexo, idade ou prenhez. No entanto, Cole et al. (1997) relataram concentrações levemente aumentadas em vacas que se encontravam no último mês de gestação e no período puerperal.

McSherry et al. (1970), ressaltaram que valores significativamente elevados em animais aparentemente saudáveis se deve, indubitavelmente, a processos inflamatórios em curso e ainda não detectados ou perceptíveis, sendo esta proteína de fase aguda um biomarcador confiável da presença de processos inflamatórios. Os mesmos autores afirmaram que valores baixos de fibrinogênio plasmático em animais doentes é um prognóstico desfavorável.

### **3.2.9- IMUNOGLOBULINAS**

As imunoglobulinas (Igs) são proteínas responsáveis pela resposta imunológica específica humoral. Quando expressas sobre a superfície dos linfócitos B, atuam como receptores capazes de reconhecer e distinguir grande variedade de antígenos (Ag). As duas principais características das Igs como proteínas de ligação ao Ag são a especificidade frente aos diferentes antígenos e a sua diversidade de ações. As Igs possuem atividade biológica secundária de ativação do sistema complemento e de atuação como opsoninas, sendo capazes de prevenir a adesão de microrganismos, inibir o metabolismo bacteriano e neutralizar toxinas (KORHONEN et al., 2000).

Os anticorpos possuem uma estrutura central comum de duas cadeias leves (L) idênticas e duas cadeias pesadas (H) idênticas. Entretanto, quando comparadas entre diferentes Igs, as seqüências dessas cadeias variam amplamente. (KORHONEN et al., 2000; KALLAUR et al., 2007). As cadeias leves de uma imunoglobulina típica contêm cerca de 110 aminoácidos, enquanto que as cadeias pesadas contêm aproximadamente 500 aminoácidos. Existem cinco tipos distintos de cadeias pesadas imunoglobulínicas ( $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  e  $\mu$ ) que determinam sua classe ou isótipo. As imunoglobulinas com as cadeias pesadas  $\alpha$  são chamadas de imunoglobulina A (IgA), aquelas com cadeias  $\gamma$  são chamadas de IgG, as cadeias  $\mu$  formam a IgM, cadeias  $\delta$  são as IgD e com as cadeias  $\epsilon$  formam a IgE (TIZARD, 2002).

As imunoglobulinas formam um sistema biológico de defesa essencial em animais superiores e são encontrados em muitos fluidos corpóreos, embora estejam em altas concentrações e sejam mais facilmente encontradas no soro sanguíneo (TIZARD, 2002; VOET & VOET, 2006).

A classe de imunoglobulina IgG corresponde a 80-90% do total de imunoglobulinas e por esta razão, exerce o papel principal nos mecanismos de defesa mediados por anticorpos. Como a IgG difunde-se mais prontamente que as outras imunoglobulinas para os espaços extra vasculares ela é a espécie predominante nos tecidos não-mucosos, onde neutraliza as toxinas bacterianas. Sua presença em superfície microbiana pode provocar o seu agrupamento induzindo à fagocitose. A IgG, juntamente com a IgA são as principais imunoglobulinas a serem sintetizadas durante a resposta secundária (TIZARD, 2002; ROITT & DELVES, 2004; MEHRA et al., 2006).

A IgA é encontrada em quantidades significativas nos fluidos corporais, aparecendo em secreções seromucosas como lágrimas, saliva, líquidos nasais, colostro e secreções do pulmão, tratos genitourinário e gastrointestinal, onde está envolvida especificamente na proteção das superfícies corpóreas contra microrganismos (ROITT & DELVES, 2004). É a imunoglobulina predominante nestas secreções corpóreas com exceção do colostro dos ruminantes (KORHONEN, 2000). A IgA é sintetizada localmente pelos plasmócitos, sendo sua forma plasmática predominantemente monomérica e, como esta forma é um ativador relativamente fraco do sistema do complemento é provável que o organismo utilize para neutralização direta de quaisquer antígenos que rompam a barreira epitelial e penetrem na circulação em quantidades apreciáveis (ROITT, 2004).



A concentração das várias Igs no sangue e secreção láctea de bovinos varia de acordo com a raça, idade, condição de hígidez e estágio de lactação do animal (McFADDEN et al., 1997).

As imunoglobulinas juntamente com lactoferrina, lactoperoxidase e lisozima formam um importante sistema antimicrobiano da secreção láctea bovina. A função biológica das imunoglobulinas no leite e colostro bovino é proteger a glândula mamária contra patógenos e fornecer ao bezerro proteção imunológica (MEHRA et al., 2006).

### 3.3- MINERAIS E INFECÇÃO

Segundo Corrigan et al. (1976), como consequência de doenças em ruminantes é observado uma mudança nos níveis séricos de uma variedade de minerais, dentre eles o cobre (Cu), o ferro (Fe) e o zinco (Zn).

Os ruminantes são caracterizados por possuírem uma grande capacidade de armazenamento de cobre (Cu) no fígado, geralmente excedendo dois terços da concentração total deste mineral no organismo. Esta alta concentração de Cu hepática em ruminantes, comparado aos monogástricos, provavelmente reflete uma maior retenção do Cu absorvido e não uma maior ingestão do mineral na dieta ou uma maior absorção do mesmo. Em ovinos recém-nascidos, a concentração de Cu hepático é mais baixa que em adultos, ao contrário do que é observado em bovinos, nos quais as concentrações não apresentam grandes variações entre neonatos e adultos (KEEN & GRAHAM, 1989). Em cordeiros da raça *Blackface* foi observada predisposição genética a baixos níveis de Cu e este fato foi associado ao aumento na mortalidade destes animais devido a infecções bacterianas. No mesmo estudo foi observado um aumento na sobrevivência dos cordeiros suplementados com o mineral (SHERMAN, 1992).

O Cu é absorvido em todos os segmentos do trato gastrointestinal. Para a maioria das espécies, a maior parte dessa absorção é feita no intestino delgado proximal, porém em ovinos uma considerável absorção também ocorre no intestino grosso. O Cu absorvido é primariamente ligado à albumina e uma pequena fração à histidina. O Cu ligado a albumina fica disponível para os tecidos. No entanto, a maior parte deste é armazenada nos hepatócitos, onde é redistribuído (KEEN & GRAHAM, 1989).

Em relação ao Fe, Crichton & Charlotteaux-Wauters (1987), afirmaram que todos os organismos vivos, com a possível exceção do *Lactobacillus*, requerem Fe. Este elemento é

importante para processos biológicos porque pode existir em duas formas oxidáveis,  $Fe^{2+}$  e  $Fe^{3+}$ , que podem ser facilmente convertidas. Devido à inacessibilidade do mineral, os organismos se utilizam de uma variedade de mecanismos para obtê-lo do ambiente. Os microrganismos possuem um eficiente sistema de obtenção do Fe que consiste de três mecanismos: (1) um composto de baixo peso molecular que é secretado pelos microrganismos e que possui uma alta afinidade por Fe, chamado de sideróforo; (2) um receptor de membrana que atrai os sideróforos já preenchidos com Fe e transporta o quelante férrico através da membrana microbiana, e (3) um sistema responsável pela liberação do Fe pelo sideróforo (SMITH, 1989).

Grieger & Kluger (1977), observaram que várias bactérias crescem igualmente em temperaturas mais baixas ou mais altas, porém a produção de sideróforos é comprometida sob temperaturas mais altas. Outro fator que afeta negativamente a síntese de sideróforos é a presença de oxigênio e a imunoglobulina G (IgG). Entretanto, vale salientar que a capacidade dos sideróforos de captar o Fe ligado à transferrina não é afetada por nenhum destes fatores citados anteriormente.

Devido ao fato do Fe livre catalizar radicais livres a partir de íons moleculares de oxigênio e hidrogênio, ele pode ter efeitos desastrosos para materiais biológicos. Consequentemente, o Fe intracelular é ligado ou incorporado a várias proteínas ou outros quelantes a fim de reduzir sua toxicidade. Estas proteínas ou quelantes são responsáveis pela absorção, armazenamento e atividade biológica do Fe. Ressalte-se que a maior parte do Fe orgânico está alocada em eritrócitos, como hemoglobina, sendo cada molécula de hemoglobina capaz de conter quatro átomos de Fe. (SMITH 1989).

Quanto ao Zn, o tecido muscular contém cerca de 65% do total da concentração do mineral. De forma similar ao que ocorre com o cálcio no tecido ósseo, o Zn muscular não é liberado em resposta direta a baixos níveis circulantes, embora o catabolismo muscular possa resultar numa significativa liberação do Zn presente no músculo para a circulação (KEEN & GRAHAM, 1989). No sangue, o Zn é encontrado no plasma, eritrócitos, leucócitos e trombócitos. Cerca de 30-40% do zinco plasmático está ligado a  $\alpha$ -macroglobulina e 60-70% a albumina (YUR et al., 2002).

Segundo Keen & Graham (1989), mais de 90 enzimas tem o Zn como um mineral fundamental para o seu bom funcionamento. Enzimas que contém Zn estão presentes nos mais importantes ciclos metabólicos que envolvem carboidratos, lipídeos, proteínas e no metabolismo de ácidos nucléicos. Em adição ao seu papel enzimático, acredita-se que o Zn esteja envolvido na estabilização das estruturas de RNA, DNA e ribossomos. Foi

demonstrado que o Zn promove mudanças conformacionais no DNA, o que sugere que vários genes possam parcialmente ser regulados por  $Zn^{2+}$ . Ainda, o Zn parece apresentar papel crítico na estabilização de membranas, função esta que foi pesquisada por Chvapil (1973), que propôs que o Zn ligado à membrana celular altera a fluidez e estabilidade da mesma. Ainda a importância do Zn na DNA e RNA polimerases sugere um importante papel deste mineral na regulação da expressão gênica para diferenciação e proliferação celular de fatores de mediação e regulação da resposta imune (SHERMAN, 1992).

O Zn é absorvido no trato gastrointestinal, e em bovinos é sabido que a maior parte da absorção é realizada no abomaso. O Zn absorvido liga-se a albumina e uma pequena porcentagem se liga a aminoácidos (KEEN & GRAHAM, 1989). Para Miller (1969), a transferência do Zn para a circulação portal é o passo limitante para a absorção do mineral em ruminantes.

Em todos os estudos publicados até o momento o Zn é reconhecido como um elemento essencial do qual a deficiência pode dar origem a uma ampla variedade de sintomas. Os mais relevantes em mamíferos são interrupção do crescimento e maturação normais, perda de apetite, distúrbios mentais, recuperação retardada de injúrias, maior suscetibilidade a infecções (YUR et al., 2002).

Em trabalho realizado com ovinos e bovinos, analisando o efeito da doença, em animais com acometimento de sistemas orgânicos variados, sobre os níveis de Cu e Zn foi observado que as mudanças plasmáticas destes elementos foram similares às reportadas em monogástricos e em humanos, com aumento nas concentrações de Cu e diminuição do Zn plasmático (CORRIGALL et al., 1976).

Como consequência da forma aguda de mastite por *E coli* em bovinos, existem alterações séricas nos níveis de Cu, Fe e Zn que decaem, enquanto em outras espécies, empregando-se endotoxina e bactéria Gram-negativa, os índices de Cu se elevaram (ETZEL et al., 1982; ERSKINE & BARTLETT, 1993; SANDHOLM & PYÖRÄLÄ, 1995).

Analisando o perfil do ferro em ovelhas, durante infecção intramamária causada por *Staphylococcus* coagulase negativo, Burriel & Heys (1997) relataram uma diminuição nos níveis séricos e uma elevação significativa no leite deste microelemento. A justificativa dada para a redução sérica do Fe e Zn, em resposta a processos inflamatórios agudos, principalmente em bovinos com mastite, é que o fenômeno ocorreria como um mecanismo de defesa não específico do hospedeiro contra infecções bacterianas, e a elevação do Cu sérico em outros animais estaria relacionada ao aumento na síntese da ceruloplasmina pelo fígado (ETZEL et al., 1982; WEINBERG, 1984; LOHUIS et al., 1990).

O padrão de mudanças observadas nos níveis de Cu e Zn em ruminantes doentes tem indicado que estas espécies podem reagir de forma similar àquela descrita para humanos e animais de laboratório. O mecanismo pelo qual estes efeitos são produzidos é atribuído à produção de células fagocitárias de um fator termo-lábil, também conhecido como mediador leucocitário endógeno, uma proteína de baixo peso molecular liberada a partir de leucócitos ativados, que quando administrado em animais saudáveis causa, em apenas cerca de duas horas após sua inoculação, uma rápida migração de Fe, Zn e um grande número de aminoácidos livres do plasma para células hepáticas. Isto é seguido por um aumento na síntese hepática de RNA e na produção de uma variedade de glicoproteínas, dentre elas a ceruloplasmina e o fibrinogênio. Esta seqüência de eventos resulta na diminuição de Zn plasmático seguido por um aumento de ceruloplasmina e, portanto de Cu (CORRIGALL et al., 1976; WEINBERG, 1978).

Os mamíferos, aves, répteis e talvez todos os vertebrados, realizam consideráveis ajustes metabólicos durante a infecção, com o objetivo de indisponibilizar Fe aos microrganismos invasores. Algumas possibilidades seriam: (1) aumento da excreção de Fe endógeno através de urina, suor, bile ou fezes; (2) decréscimo da absorção intestinal de Fe exógeno; (3) redução do Fe do compartimento plasmático e aumento deste nos compartimentos de reserva do metal; (4) posicionamento prioritário de proteínas ferro-ligantes nos principais sítios de invasão; (5) aumento da síntese de proteínas ferro-ligantes; (6) supressão da síntese dos sideróforos microbianos. No entanto, não há evidência para se acreditar que o mecanismo (1) seja utilizado, uma vez que as reservas de Fe necessitariam de repleção após seu esvaziamento durante a infecção. Adicionalmente, o metal excretado, a depender da via de excreção, aumentaria a susceptibilidade de crescimento de microrganismos nesta área (WEINBERG; 1978).

Weinberg (1978), afirma que o Fe plasmático apresenta oscilações nas suas concentrações, na ordem de 10 vezes ao dia, e que a hipoferremia se dá por mecanismos ainda não esclarecidos. É sabido que estes mecanismos suprimem o retorno deste metal do sistema reticuloendotelial, bem como acelera o efluxo do Fe do plasma para os sítios de armazenamento do fígado. Ainda, durante a infecção, a eritropoiese é inibida e assim os compartimentos de reserva devem acomodar também o Fe que seria utilizado na produção de hemoglobina, fazendo-se necessária a síntese de ferritina. Diante disto, aminoácidos derivados de proteínas musculares catabolizadas migram para o fígado durante a infecção e presumivelmente se disponibilizam como substrato para a síntese de mais proteínas de armazenamento.

---

## 5 – RESULTADOS

Apesar da avaliação clínica e da glândula mamária não terem sido objetivos específicos deste estudo, estamos apresentando de forma sucinta, para uma maior compreensão do processo sistêmico, algumas informações resgatadas em outros estudos realizados paralelamente a este, envolvendo o mesmo modelo experimental.

Todas as mamas inoculadas com *S. aureus* apresentaram um quadro de mastite clínica aguda. Das dez ovelhas utilizadas no experimento; oito desenvolveram a forma gangrenosa, uma evoluiu para a forma crônica, com fibrose do parênquima mamário e a outra foi a óbito 48 h p.i., não resistindo à gravidade das manifestações clínicas. O agente foi isolado da amostra de leite obtida às 24h PI em todas as mamas comprometidas. Ao exame clínico foram constatados sinais evidentes como apatia, febre, congestão da mucosa ocular, taquicardia, taquipnéia, anorexia, hipomotilidade a atonia ruminal, ausência da ruminação, fezes diarréicas e claudicação do membro correspondente á glândula inoculada, perda de peso, inclusive a morte de um animal. Ao exame, na glândula mamária se observou assimetria, onde a mama inoculada apresentava-se a partir das 24h PI com edema que evoluiu nos dias seguintes de observação, estendendo-se em algumas ovelhas até a região xifóide; a sensibilidade e a temperatura estavam elevadas à palpação que diminuiu ao longo dos dias de evolução da doença. A coloração da pele era inicialmente avermelhada tornando-se depois cianótica e fria ao toque, exsudando em alguns animais uma secreção soro sanguinolenta; o linfonodo mamário correspondente estava hipertrofiado. Após o tratamento foi verificado que houve em alguns animais o retorno gradativo à normalidade dos indicadores clínicos como apetite, comportamento, temperatura, frequências cardíaca e respiratória, coloração da mucosa, motilidade ruminal e a ruminação, que foi mais bem observado no último momento de avaliação. Houve perda total da funcionalidade da glândula mamária (SIMÃO, 2004; SANTOS et al., 2007).

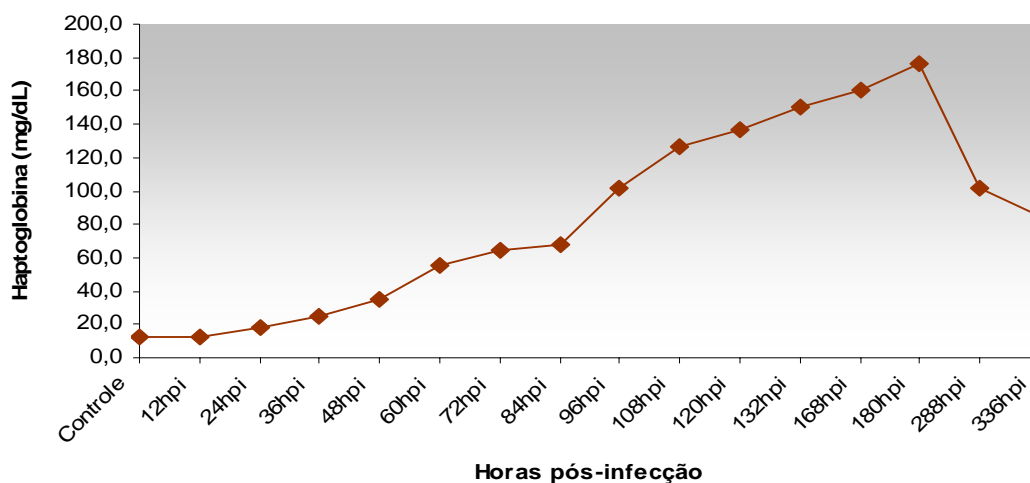
### 5.1 – Proteinograma

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) permitiu o fracionamento de 23 proteínas, cujos pesos moleculares (PM) variaram de 26.000 a 185.000 dáltons (D), sendo possível identificar imunoglobulina A (PM=143.000 D), ceruloplasmina

(PM=115.000 D); transferrina (PM=85.000 D), hemopexina (PM=79.000 D); albumina (PM=66.000 D), antitripsina  $\alpha$ 1 (PM=60.000 D), haptoglobina (PM=45.000 D), glicoproteína ácida  $\alpha$ 1 (PM=40.000 D), imunoglobulina G (PM=36.000 D), bem como as outras restantes proteínas não caracterizadas e identificadas pelos respectivos pesos moleculares.

### 5.1.1 - Haptoglobina

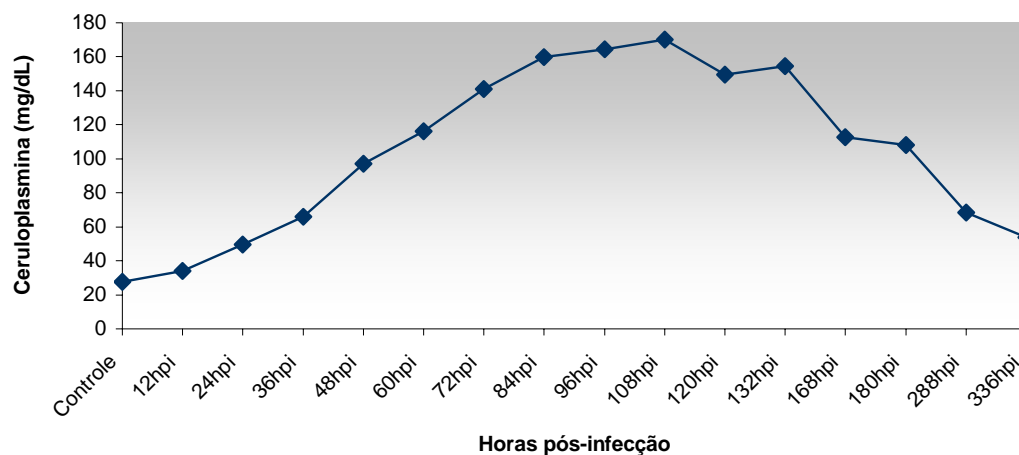
A infecção intramamária por *S. aureus* em ovelhas acarretou nos animais estudados elevação significativa ( $P<0,05$ ) dos níveis plasmáticos de haptoglobina a partir de 36 horas pós-infecção (PI), sendo evidenciado neste momento experimental valores médios de 25,24mg/dL, embora às 24 horas PI já tenha sido observado aumento de 50% no valor médio desta proteína, quando comparado aos níveis observados no momento controle (Tabela 1). A partir das 24 horas PI os níveis da haptoglobina elevaram-se culminando com a evidência de maiores valores às 180 horas PI (Tabela 1 e Figura 1). Às 288 horas PI pôde-se verificar uma tendência à diminuição desta proteína de fase aguda, apesar dos seus níveis ainda se manterem elevados, quando comparados aos evidenciados no momento que antecedeu a inoculação (Figura 1).



**Figura 1-** Valores médios da concentração da haptoglobina (mg/dL) em ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção.

### 5.1.2 - Ceruloplasmina

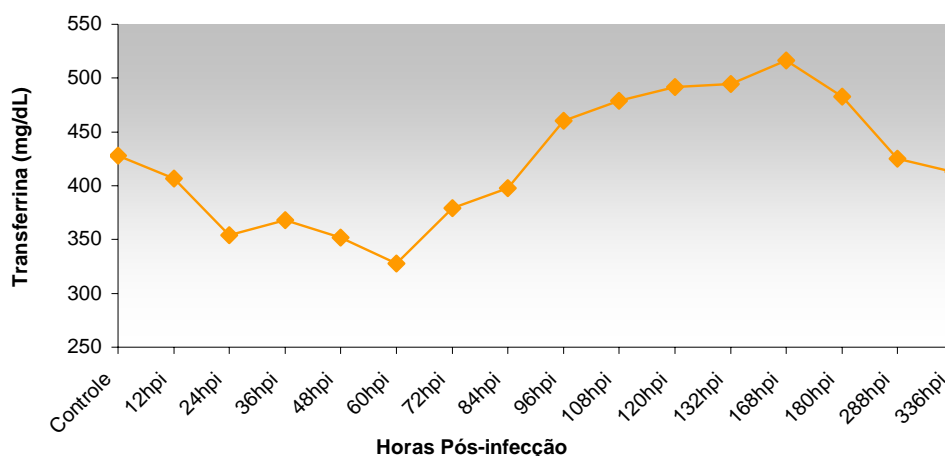
Observou-se que os valores médios de ceruloplasmina se elevaram às 12 horas PI, sendo este aumento significativo a partir das 36h PI ( $P < 0,05$ ). A concentração desta proteína apresentou pico sérico às 108hPI apresentando valor médio de 169,99mg/dL, sendo este aproximadamente seis vezes superior ao evidenciado no momento controle (Tabela 2). Às 120 horas PI verificou-se um decréscimo, embora no último momento experimental ainda estivesse superior ao valor médio verificado no momento prévio à indução (Figura 2).



**Figura 2-** Valores médios da concentração da ceruloplasmina (mg/dL) em ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção.

### 5.1.3 - Transferrina

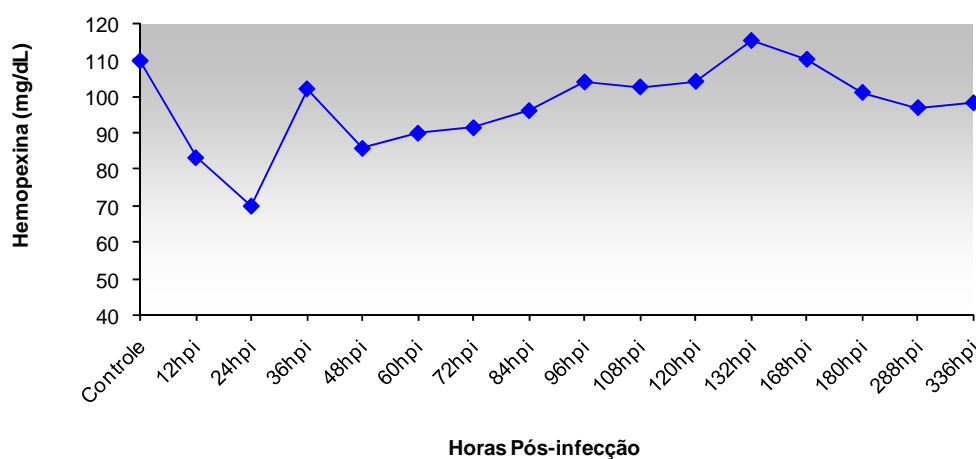
Após a indução experimental da mastite clínica nos ovinos analisados, pôde-se observar que os valores médios de transferrina sérica diminuíram gradativamente de 12 horas PI até 60 horas PI ( $P < 0,05$ ), com valores médios de 406,67 mg/dL e 328,05 mg/dL respectivamente (Tabela 3), onde neste último foi constatado o menor valor para esta proteína e a partir deste momento, os níveis de transferrina elevaram-se até 168 horas, momento em que atingiu o maior valor médio (516,34mg/dL). Posteriormente, esta variável teve sua concentração sérica diminuída, porém sem alteração significativa ( $P > 0,05$ ), quando comparada aos valores observados no momento controle (Figura 3).



**Figura 3-** Valores médios da concentração da transferrina (mg/dL) em ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós- infecção.

#### 5.1.4 – Hemopexina

Observou-se que a proteína hemopexina apresentou diminuição significativa na concentração sérica às 24 horas PI ( $P < 0,05$ ), com valores de 69,99 mg/dL (Tabela 4). A partir das 36 horas PI, estes valores se elevaram e evidenciou-se leve recuperação dos níveis mantendo a partir daí uma linearidade nas concentrações séricas em relação àqueles obtidos no momento controle (Figura 4).

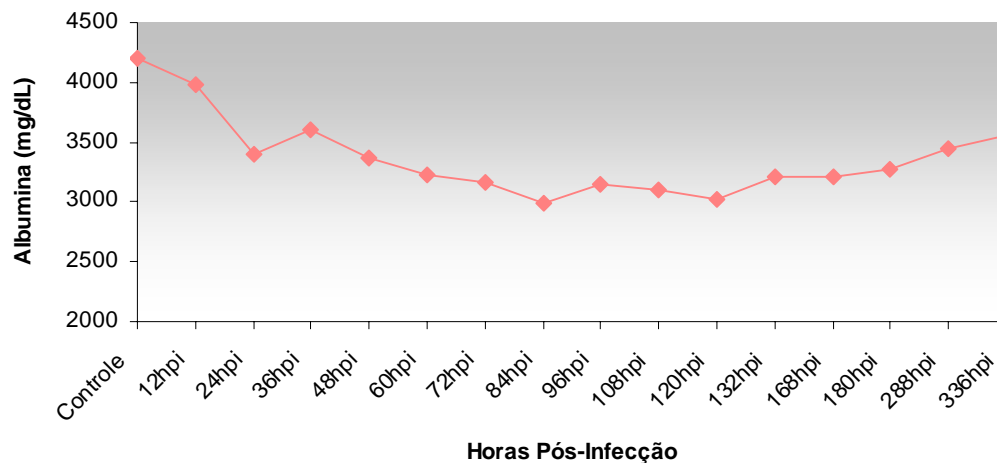


**Figura 4-** Valores médios da concentração da hemopexina (mg/dL) em ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós- infecção.



### 5.1.5 - Albumina

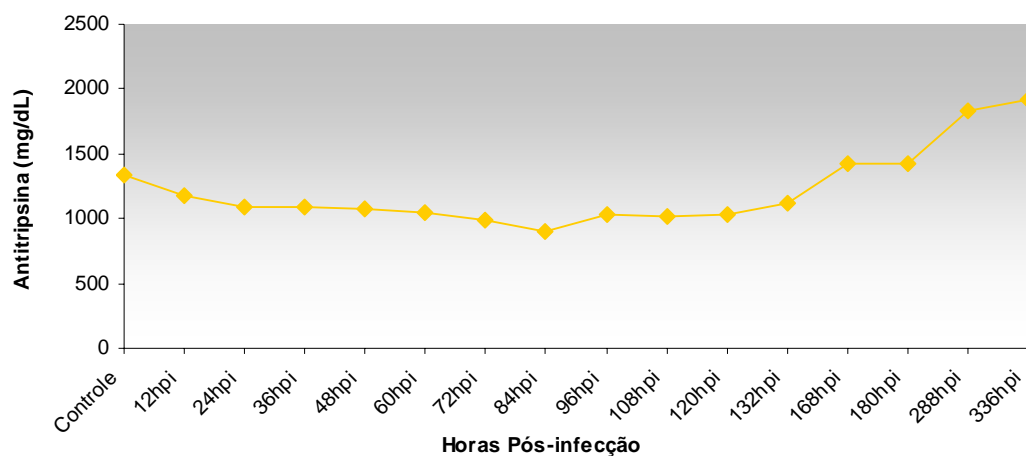
Após inoculação experimental foi observado diminuição significativa ( $P < 0,05$ ) nos valores médios da albumina às 24 horas (3403,07 mg/dL) atingindo seu menor valor às 84 horas PI (2988,63 mg/dL), mantendo-se estável, com um ligeiro aumento nos momentos finais de observação (Tabela 5 e Figura 5).



**Figura 5-** Valores médios da concentração da albumina (mg/dL) em ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós- infecção.

### 5.1.6 – Antitripsina $\alpha$ -1

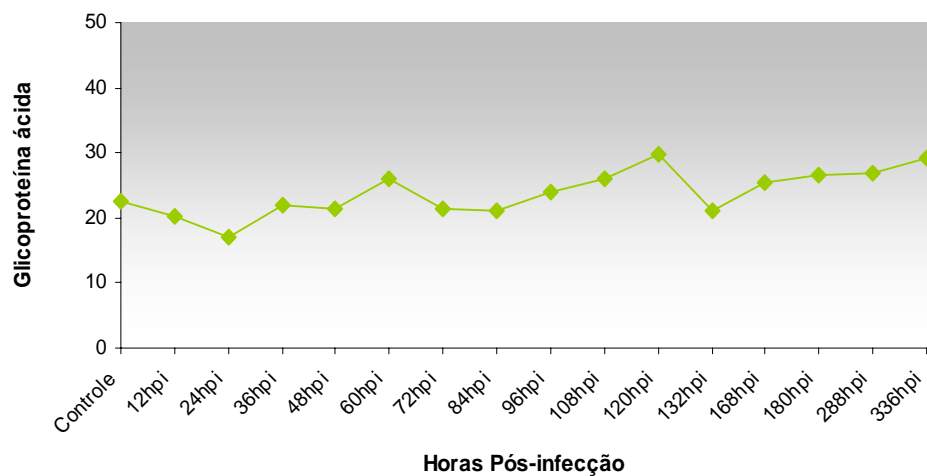
Após a indução experimental com a cepa de *S. aureus*, constatou-se um discreto decréscimo na concentração sérica de antitripsina  $\alpha$ -1 24 horas PI, que se manteve estável, decrescendo às 84horas PI ( $P < 0,05$ ) atingindo o menor valor médio de 904,13 mg/dL (Tabela 6). Nos momentos seguintes houve uma leve recuperação dos valores até apresentarem nos últimos momentos experimentais elevação nos valores bem superior em relação ao momento controle (1922,25 mg/dL) (Figura 6).



**Figura 6-** Valores médios da concentração da antitripsina  $\alpha$ -1 (mg/dL) em ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós- infecção.

### 5.1.7 - Glicoproteína ácida $\alpha$ -1

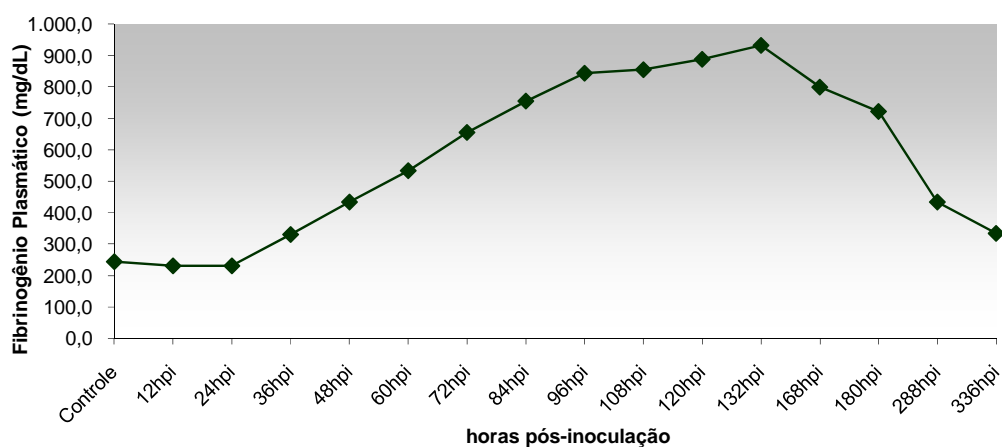
Não foi observada alteração significativa na concentração da glicoproteína ácida  $\alpha$ -1 ( $P>0,05$ ) após a indução de mastite com a cepa de *S. aureus* (Tabela 7 e Figura 7).



**Figura 7-** Valores médios da concentração da glicoproteína ácida  $\alpha$ -1 (mg/dL) em ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-inoculação.

### 5.1.8 – Fibrinogênio Plasmático

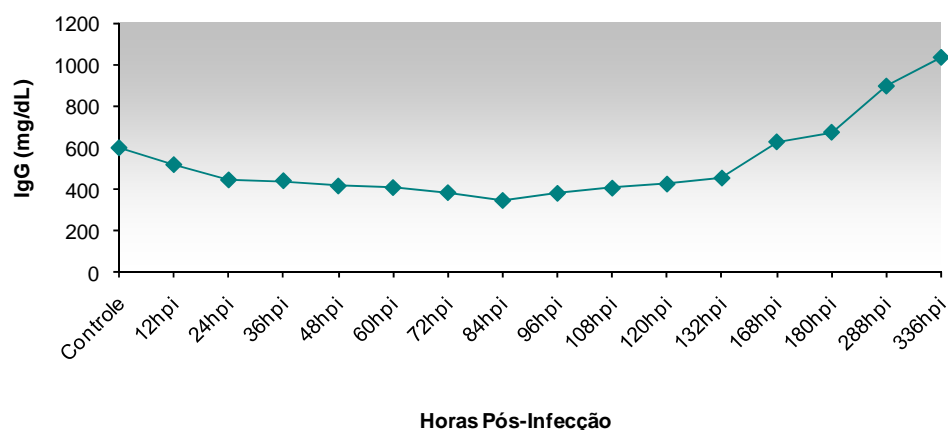
Observou-se que em ovelhas com mastite experimental por *S.aureus* o fibrinogênio plasmático não apresentou variações significativas em seus valores médios até as 36 horas (Tabela 8). A partir das 48h PI foi observada elevação significativa ( $P < 0,05$ ) dos valores séricos em relação ao controle, atingindo o valor máximo (933,33 mg/dL) às 132 horas PI. A partir deste momento verificou-se decréscimo na concentração plasmática desta proteína, atingindo o valor de 333,33 mg/dL às 336 horas PI, retornando assim aos valores médios observados nos momentos iniciais de observação (Figura 8).



**Figura 8-** Valores médios da concentração do fibrinogênio plasmático (mg/dL) em ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção.

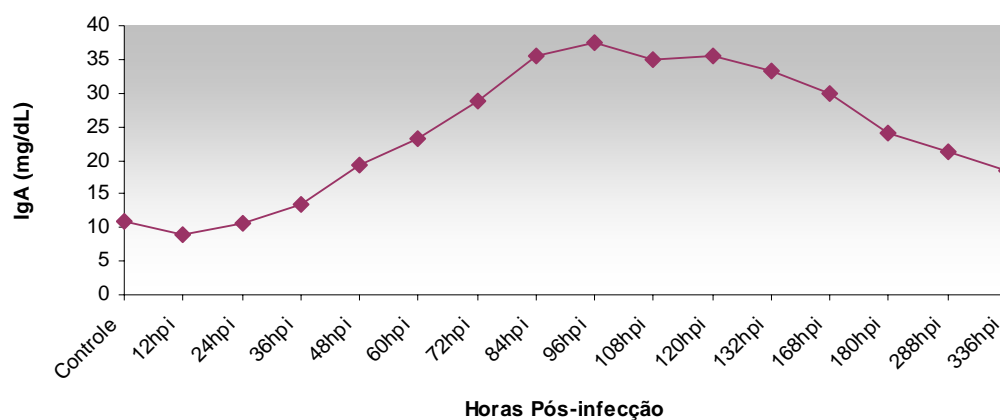
### 5.1.9 - Imunoglobulinas

A concentração sérica da imunoglobulina G (IgG) apresentou discreta diminuição a partir das 12 horas de observação até às 84 horas PI, momento em que inicia a elevação nos valores médios dos níveis desta proteína, alcançando concentração máxima de 1038,23 mg/dL no último momento de avaliação, representando elevação significativa ( $P < 0,05$ ) (Figura 9; Tabela 9).



**Figura 9-** Valores médios da concentração da IgG (mg/dL) em ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção.

Quanto aos níveis séricos de imunoglobulina A (IgA) verificados nos animais com infecção intramamária induzida experimentalmente por *S. aureus* observa-se elevação gradativa e significativa ( $P < 0,05$ ) a partir de 36 horas PI, atingindo valores médios máximos de 37,37 mg/dL às 96 horas PI. (Tabela 10). Posteriormente foi observada diminuição significativa ( $P < 0,05$ ) nas concentrações séricas a partir das 132 horas PI, retornando aos valores um pouco superiores aos encontrados no momento controle (Tabela 10 e Figura 10).



**Figura 10-** Valores médios da concentração da IgA (mg/dL) em ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção.

**Tabela 01** - Valores médios e desvios padrão da concentração da haptoglobina (mg/dL) das ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção.

		<i>Horas pós-inoculação</i>															
<i>Haptoglobina</i> (mg/dL)	Momento Controle	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	168	180	288	336	
		12,40	11,95	18,60	25,24	34,75	55,50	64,67	68,35	101,35	126,54	136,24	149,98	160,22	175,74	101,40	84,26
		± 5,29	± 3,93	± 10,81	± 11,66	± 20,95	± 25,45	± 40,15	± 24,88	± 59,82	± 73,74	± 64,82	± 73,19	± 106,54	± 80,16	± 91,74	± 38,30
	G	G	G	FG	FG	EFG	EFG	DEFG	BCDE	ABCD	ABC	AB	AB	A	BCDE	CDEF	

\* Letras distintas na mesma linha diferem ao nível de 5% de probabilidade ( $P < 0.05$ )

**Tabela 02** - Valores médios e desvios padrão da concentração da ceruloplasmina (mg/dL) das ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção.

		<i>Horas pós-inoculação</i>															
<i>Ceruloplasmina</i> (mg/dL)	Momento Controle	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	168	180	288	336	
		27,57	34,01	49,76	65,96	97,20	116,23	140,88	159,92	164,37	169,99	149,59	154,65	112,61	108,16	68,34	53,69
		± 10,19	± 17,62	± 22,18	± 16,89	± 19,19	± 20,19	± 38,80	± 54,08	± 44,95	± 77,70	± 63,58	± 47,43	± 51,13	± 68,90	± 42,65	± 26,74
	H	H	H	FGH	EFG	BCDE	ABCDE	AB	A	A	ABCD	ABC	CDE	DEF	FGH	GH	

- Letras distintas na mesma linha diferem ao nível de 5% de probabilidade ( $P < 0.05$ )

**Tabela 03** - Valores médios e desvios padrão da concentração da transferrina sérica (mg/dL) das ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção.

		<i>Horas pós-inoculação</i>															
<i>Transferrina</i> (mg/dL)	Momento Controle	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	168	180	288	336	
		427,80	406,67	345,12	368,02	351,62	328,05	379,15	397,50	460,22	479,02	491,55	494,84	516,34	482,72	425,20	412,83
		± 118,01	± 90,20	± 98,90	± 108,15	± 98,40	± 76,46	± 93,31	± 91,83	± 112,94	± 121,06	± 158,07	± 100,45	± 84,61	± 120,21	± 86,86	± 72,46
	ABCDE	ABCDE	DE	DE	DE	E	CDE	BCDE	ABCD	ABC	AB	AB	A	aABC	ABCDE	ABCDE	

\* Letras distintas na mesma linha diferem ao nível de 5% de probabilidade ( $P < 0.05$ )

**Tabela 04** - Valores médios e desvios padrão da concentração da hemopexina sérica (mg/dL) das ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção.

		<i>Horas pós-inoculação</i>															
<i>Hemopexina</i> (mg/dL)	Momento	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	168	180	288	336	
	Controle	110,01	80,30	69,99	102,28	85,88	90,06	91,58	96,28	104,17	102,81	104,34	115,60	110,44	101,31	97,11	98,43
	± 27,53	± 16,99	± 24,45	± 46,52	± 21,72	± 11,97	± 11,87	± 15,97	± 13,99	± 14,85	± 12,14	± 29,30	± 5,73	± 25,66	± 11,88	± 19,84	
	AB	C	BC	AB	BC	ABC	ABC	ABC	AB	AB	AB	A	AB	AB	ABC	AB	

- Letras distintas na mesma linha diferem ao nível de 5% de probabilidade (P<0.05)

**Tabela 05** - Valores médios e desvios padrão da concentração da albumina sérica (mg/dL) das ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção.

		<i>Horas pós-inoculação</i>															
<i>Albumina</i> (mg/dL)	Momento	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	168	180	288	336	
	Controle	4204,48	3974,66	3403,07	3607,85	3367,30	3222,12	3164,01	2988,63	3141,23	3103,33	3029,49	3215,50	3203,80	3274,90	3448,43	3561,34
	± 437,73	± 375,78	± 381,71	± 364,74	± 367,11	± 228,10	± 294,99	± 325,78	± 381,56	± 402,02	± 389,91	± 281,14	± 337,17	± 343,60	± 255,35	± 291,34	
	A	A	BCDE	B	BCDEF	CDEF	DEF	F	DEF	DEF	EF	CDEF	CDEF	BCDEF	BCD	BC	

\* Letras distintas na mesma linha diferem ao nível de 5% de probabilidade (P<0.05)

**Tabela 06** - Valores médios e desvios padrão da concentração da antitripsina  $\alpha$ -1 sérica (mg/dL) das ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção.

		<i>Horas pós-inoculação</i>															
<i>Antitripsina</i> $\alpha$ 1 (mg/dL)	Momento	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	168	180	288	336	
	Controle	1333,69	1181,27	1082,94	1091,26	1071,77	1047,77	987,32	904,13	1037,42	1017,31	1035,20	1112,29	1429,85	1420,32	1825,54	1922,25
	± 250,85	± 233,53	± 262,24	± 185,56	± 246,08	± 299,15	± 301,06	± 195,79	± 302,68	± 263,08	± 312,10	± 309,29	± 387,68	± 369,24	± 446,50	± 493,12	
	BC	BCD	CD	CD	CD	CD	CD	D	CD	CD	CD	BCD	B	B	CD	BC	

\* Letras distintas na mesma linha diferem ao nível de 5% de probabilidade (P<0.05)

**Tabela 07** - Valores médios e desvios padrão da concentração da glicoproteína ácida  $\alpha 1$  sérica (mg/dL) das ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção.

		<i>Horas pós-inoculação</i>															
<i>Glicoproteína Ácida <math>\alpha 1</math> (mg/dL)</i>	Momento Controle	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	168	180	288	336	
		22,48	20,12	17,01	21,89	21,29	26,06	21,30	21,05	23,92	26,14	29,69	21,03	25,43	26,73	27,01	29,11
		± 8,69	± 8,19	± 8,87	± 11,09	± 11,81	± 15,27	± 8,84	± 10,54	± 7,99	± 8,97	± 12,18	± 13,60	± 11,79	± 16,21	± 10,73	± 9,28
	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	

\* Letras distintas na mesma linha diferem ao nível de 5% de probabilidade (P<0.05)

**Tabela 08** - Valores médios e desvios padrão da concentração do fibrinogênio plasmático (mg/dL) das ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção.

		<i>Horas pós-inoculação</i>															
<i>Fibrinogênio Plasmático (mg/dL)</i>	Momento Controle	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	168	180	288	336	
		243,33	230,00	230,00	330,00	433,33	533,33	655,56	755,56	844,40	855,60	888,90	933,33	800,00	722,20	433,33	333,33
		± 86,14	± 94,87	± 82,33	± 115,95	± 122,47	± 100,0	± 133,33	± 142,40	± 200,69	± 245,52	± 231,54	± 217,94	± 223,61	± 178,73	± 239,79	± 173,21
	F	F	F	EF	DE	CD	BC	AB	AB	AB	A	A	AB	AB	DE	EF	

- Letras distintas na mesma linha diferem ao nível de 5% de probabilidade (P<0.05)

**Tabela 09** - Valores médios e desvios padrão da concentração da IgG (mg/dL) das ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção.

		<i>Horas pós-inoculação</i>															
<i>IgG cadeia leve (mg/dL)</i>	Momento Controle	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	168	180	288	336	
		599,40	517,64	443,68	439,43	413,80	406,04	381,57	343,66	378,45	403,44	423,10	453,43	628,36	674,84	898,96	1038,23
		± 161,07	± 128,11	± 144,18	± 103,85	± 95,06	± 137,10	± 136,02	± 81,49	± 171,90	± 129,11	± 148,37	± 142,98	± 175,38	± 216,19	± 291,56	± 347,68
	BCD	BCDE	DE	DE	DE	E	E	E	E	E	DE	CDE	BC	B	A	Aa	

- Letras distintas na mesma linha diferem ao nível de 5% de probabilidade (P<0.05)

**Tabela 10** - Valores médios e desvios padrão da concentração da IgA (mg/dL) das ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção.

IgA (mg/dL)	<i>Horas pós-inoculação</i>															
	Momento Controle	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	168	180	288	336
	10,88	9,05	10,49	13,41	19,40	23,19	28,72	35,54	37,37	34,96	35,47	33,17	29,82	23,93	21,34	18,35
	± 4,91	± 4,11	± 5,07	± 4,75	± 5,67	± 6,30	± 11,81	± 8,75	± 12,80	± 11,60	± 14,20	± 13,38	± 13,25	± 13,73	± 6,67	± 5,39
	GH	H	GH	FGH	EFGH	CDEF	ABCD	A	A	A	A	AB	ABC	BCDE	CDEF	EFGH

\* Letras distintas na mesma linha diferem ao nível de 5% de probabilidade ( $P < 0.05$ )

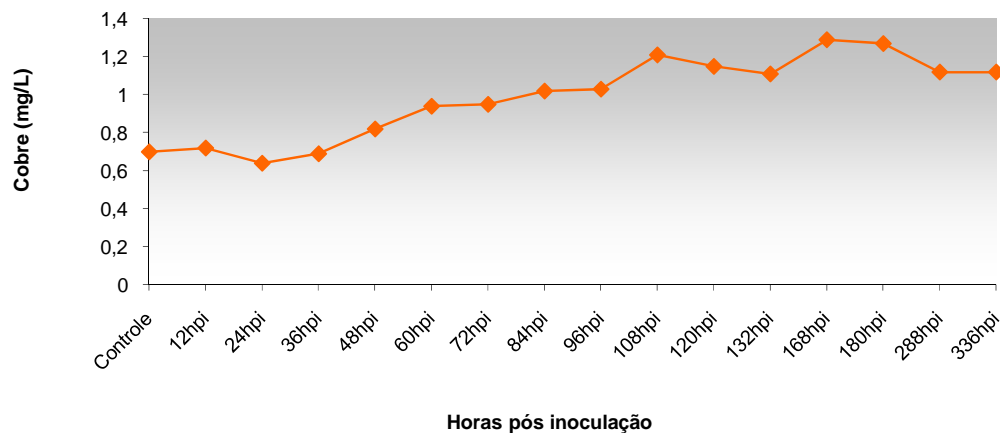


## 5.2-Minerais

### 5.2.1 – Cobre

Com a manifestação clínica da mastite, observada já nas 24 horas PI, constatou-se elevação significativa ( $P < 0,05$ ) nos teores séricos do cobre (Cu), que de forma progressiva alcançou valores médios máximo de 1,29 mg/L às 168 h PI, mantendo-se elevado até o término do período de observação (Tabela 11 e Figura 11).

De acordo com a Tabela 14, foram observados dois tipos de efeitos e respectivos coeficientes de relação da regressão ajustadas do cobre, em função dos momentos experimentais, sendo verificado efeito linear e quadrático ( $P < 0,0001$ ;  $r = 0,57$ ).



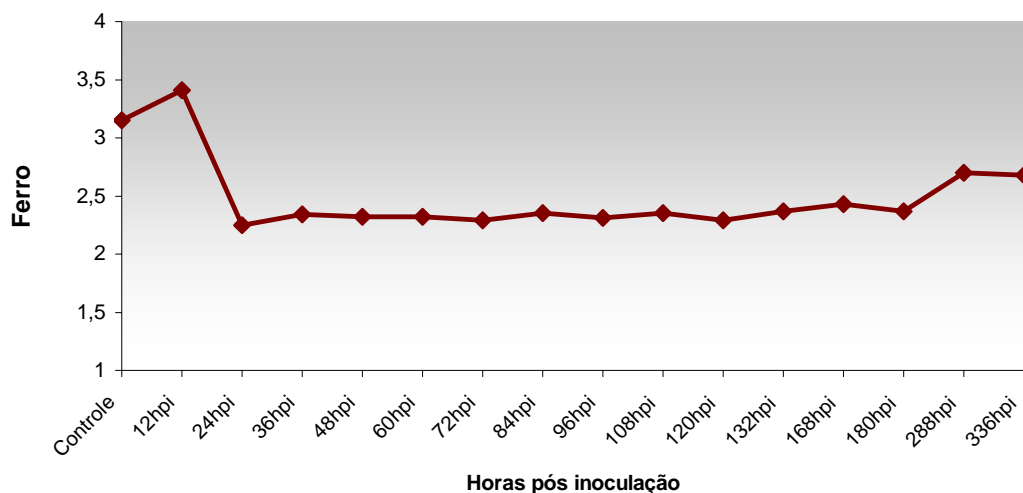
**Figura 11** - Valores médios dos teores de cobre sérico (mg/L) de ovelhas com mastite induzida com cepa de *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção.

### 5.2.2 - Ferro

Neste experimento verificou-se que nos animais com infecção intramamária os valores médios de ferro sérico elevaram-se discretamente 12 horas PI, e a partir de 24 horas PI decresceram ( $P < 0,05$ ), observando os menores valores médios de concentração neste momento (2,25 mg/L), mantendo-se inferior ao estabelecido antes da infecção até

180 horas PI., quando a partir de então houve uma tendência de recuperação dos níveis do ferro sérico em relação ao momento controle (Tabela 12 e Figura 12).

De acordo com a Tabela 14, dos tipos de efeitos e respectivos coeficientes de relação da regressão ajustadas do ferro, em função dos momentos experimentais, verificam-se efeito linear e quadrático ( $P < 0,0001$ ;  $r = 0,42$ ).

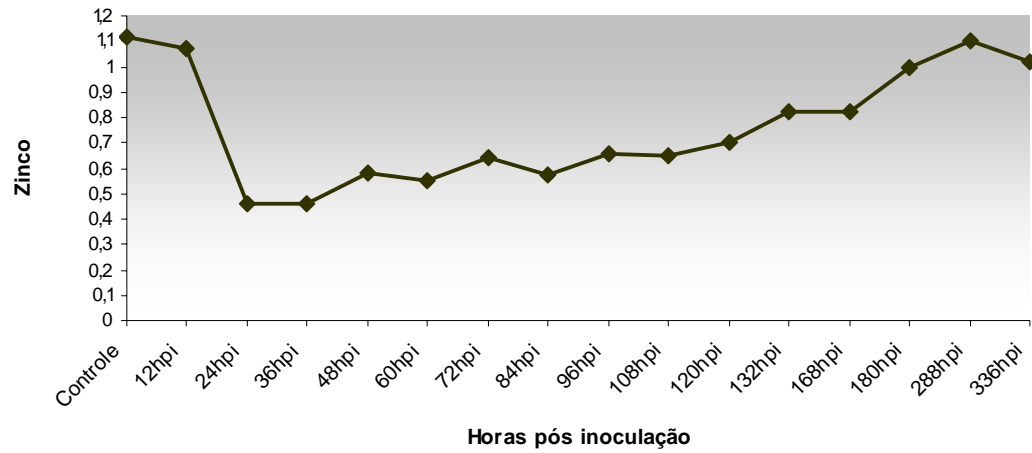


**Figura 12** - Valores médios dos teores de ferro sérico (mg/L) de ovelhas com mastite induzida com cepa de *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção.

### 5.2.3 - Zinco

Avaliando os resultados séricos de zinco dos animais com mastite induzida experimentalmente, evidenciou-se diminuição significativa nos valores médios desta variável a partir de 24 horas PI ( $P < 0,05$ ), com menor valor entre este momento e de 36 horas PI. (0,46mg/L). Posteriormente, houve elevação gradativa dos valores e nos dois últimos momentos experimentais (288 e 336 horas) os teores séricos foram semelhantes aos momentos iniciais (Tabela 13 e Figura 13).

De acordo com a Tabela 14, dos tipos de efeitos e respectivos coeficientes de relação da regressão ajustadas do zinco, em função dos momentos experimentais, verifica-se um adequado efeito tanto linear, quando quadrático e cúbico ( $P < 0,0001$ ;  $r = 0,58$ ).



**Figura 13** - Valores médios dos teores de zinco sérico (mg/L) de ovelhas com mastite induzida com cepa de *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção.

**Tabela 11** - Valores médios e desvios padrão dos níveis séricos de cobre (mg/L) das ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção.

		<i>Horas pós-inoculação</i>														
<i>Cobre Sérico (mg/L)</i>	Momento Controle	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	168	180	288	336
		0,71	0,72	0,64	0,69	0,82	0,94	0,95	1,02	1,03	1,21	1,15	1,11	1,29	1,27	1,12
	± 0,17	± 0,16	± 0,15	± 0,18	± 0,21	± 0,25	± 0,29	± 0,37	± 0,36	± 0,47	± 0,40	± 0,37	± 0,33	± 0,39	± 0,24	± 0,24
	EF	EF	F	F	DEF	CDEF	BCDEF	ABCDE	ABCD	ABC	ABC	ABCD	A	AB	ABED	ABCD

\* Letras distintas na mesma linha diferem ao nível de 5% de probabilidade ( $P < 0.05$ )

**Tabela 12** - Valores médios e desvios padrão dos níveis séricos de ferro (mg/L) das ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção.

		<i>Horas pós-inoculação</i>														
<i>Ferro Sérico (mg/L)</i>	Momento Controle	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	168	180	288	336
		3,15	3,41	2,25	2,34	2,32	2,32	2,29	2,35	2,31	2,35	2,29	2,37	2,43	2,37	2,69
	± 0,61	± 0,19	± 0,42	± 0,55	± 0,48	± 0,52	± 0,40	± 0,52	± 0,49	± 0,55	± 0,51	± 0,59	± 0,68	± 0,65	± 0,75	± 0,86
	AB	A	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	BC	BC

- Letras distintas na mesma linha diferem ao nível de 5% de probabilidade ( $P < 0.05$ )

**Tabela 13** - Valores médios e desvios padrão dos níveis séricos de zinco (mg/L) das ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção.

		<i>Horas pós-inoculação</i>														
<i>Zinco Sérico (mg/L)</i>	Momento Controle	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	168	180	288	336
		1,14	1,07	0,46	0,46	0,58	0,55	0,64	0,57	0,66	0,65	0,69	0,88	0,82	0,99	1,10
	± 0,21	± 0,26	± 0,10	± 0,09	± 0,22	± 0,11	± 0,35	± 0,10	± 0,21	± 0,13	± 0,15	± 0,49	± 0,36	± 0,26	± 0,29	± 0,19
	A	AB	E	E	DE	DE	CDE	DE	CDE	CDE	CDE	ABC	BED	AB	A	AB

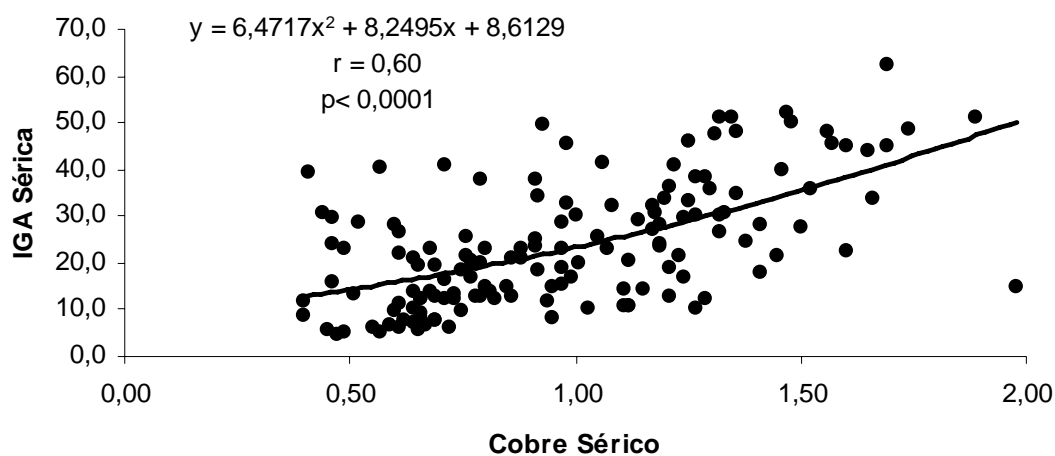
\* Letras distintas na mesma linha diferem ao nível de 5% de probabilidade ( $P < 0.05$ )

**Tabela 14** – Tipos de efeitos e respectivos coeficientes de relação da regressão ajustadas dos minerais séricos, em função dos momentos experimentais, de ovelhas com mastite induzida com cepa de *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção.

Variáveis	Tipo de Efeito da Análise de Regressão			
	L	Q	C	r
Zinco	0,0001	0,0001	0,0001	0,58
Ferro	0,0001	0,0001	0,0014	0,42
Cobre	0,0001	0,0001	ns	0,57

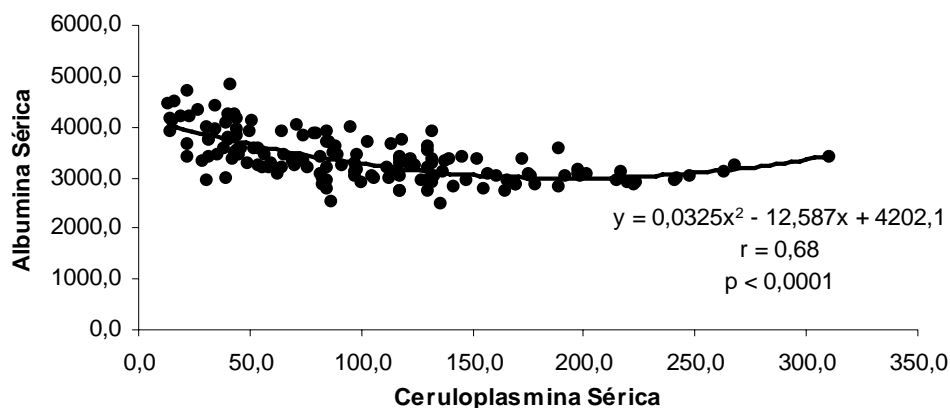
### 5.3 - Análise de Relação entre Variáveis

A análise da relação entre o teor de cobre sérico e IgA sérica mostrou alta relação ( $r = 0,60$ ) nas ovelhas com mastite induzida com cepa de *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção (Tabela 15). Esta relação está expressa pela seguinte equação de regressão: **IgA Sérica =  $6,4717_{CuSr}^2 + 8,2495_{CuSr} + 8,6129$**  e ilustrada na Figura 14.



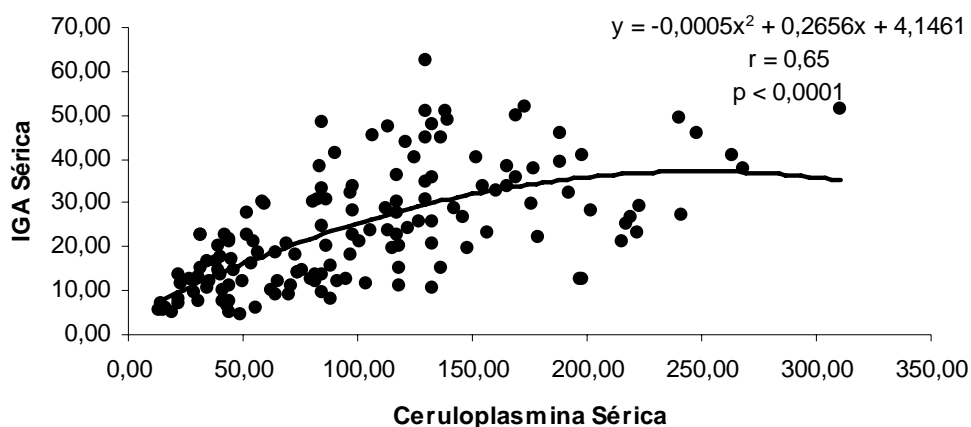
**Figura 14** – Relação entre teor sérico de cobre (mg/L) e IgA (mg/dL) sérica em ovelhas com mastite induzida com cepa de *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção.

A análise da relação entre os teores séricos de ceruloplasmina e albumina mostrou alta relação negativa ( $r = -0,68$ ) nas ovelhas com mastite induzida com cepa de *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção (Tabela 15). Esta relação está expressa pela seguinte equação de regressão: **Albumina Sérica =  $0,0325 \text{ CeruloSr}^2 - 12,587 \text{ CeruloSr} + 4202,1$**  e ilustrada no Figura 15.



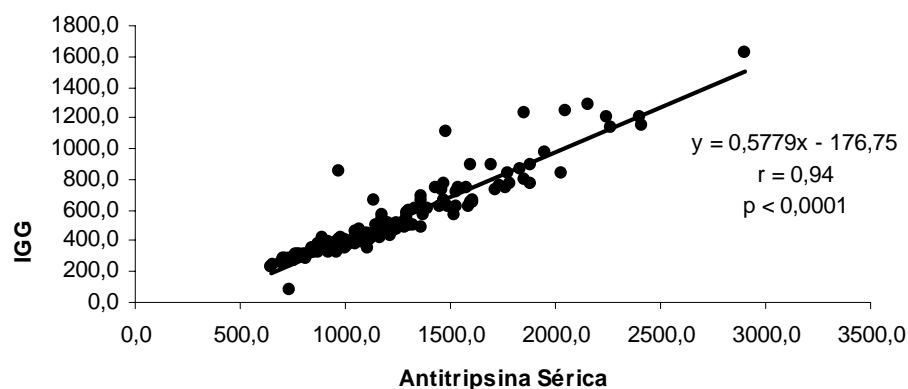
**Figura 15** – Relação entre teor sérico de ceruloplasmina (mg/dL) e albumina (mg/dL) sérica em ovelhas com mastite induzida com cepa de *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção

A análise da relação entre o teor sérico de ceruloplasmina e IgA sérica mostrou alta relação ( $r = 0,65$ ) nas ovelhas com mastite induzida com cepa de *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção (Tabela 15). Esta relação está expressa pela seguinte equação de regressão: **IgA Sérica =  $-0,0005 \text{ CeruloSr}^2 + 0,2656 \text{ CeruloSr} + 4,1461$**  e ilustrada no Figura 16.



**Figura 16** – Relação entre teor sérico de ceruloplasmina (mg/dL) e IgA (mg/dL) sérica em ovelhas com mastite induzida com cepa de *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção

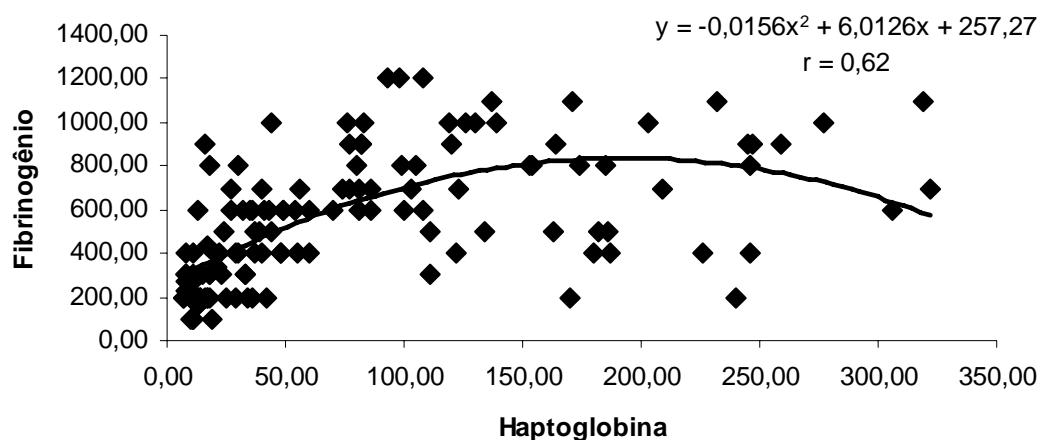
A análise da relação entre o teor sérico de antitripsina e IgG mostrou alta relação ( $r = 0,94$ ) nas ovelhas com mastite induzida com cepa de *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção (Tabela 15). Esta relação está expressa pela seguinte equação de regressão:  $IgG = 0,5779 \text{Antitripsina Sérica} - 176,75$  e ilustrada no Figura 17.



**Figura 17** – Relação entre teor sérico de antitripsina  $\alpha 1$  (mg/dL) e IgG (mg/dL) em ovelhas com mastite induzida com cepa de *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção.

A análise da relação entre a haptoglobina sérica e fibrinogênio plasmático mostrou alta relação ( $r = 0,62$ ) nas ovelhas com mastite induzida com cepa de *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção (Tabela 15). Esta relação está expressa pela seguinte equação de regressão:

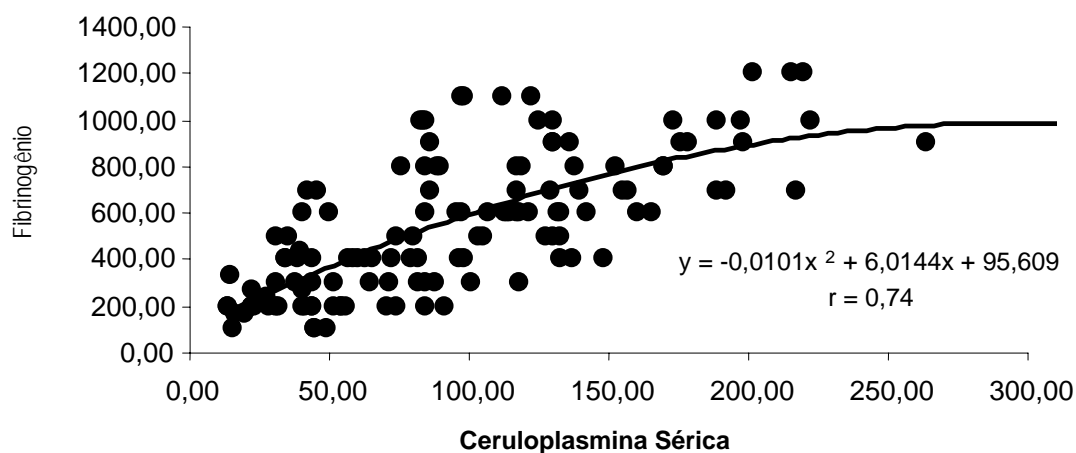
**Haptoglobina =  $8E-05I_{fib}^2 - 0,1875I_{fib} + 116,85$**  e ilustrada na Figura 18.



**Figura 18** – Relação entre a haptoglobina sérica (mg/dL) e fibrinogênio plasmático (mg/dL) em ovelhas com mastite induzida com cepa de *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção

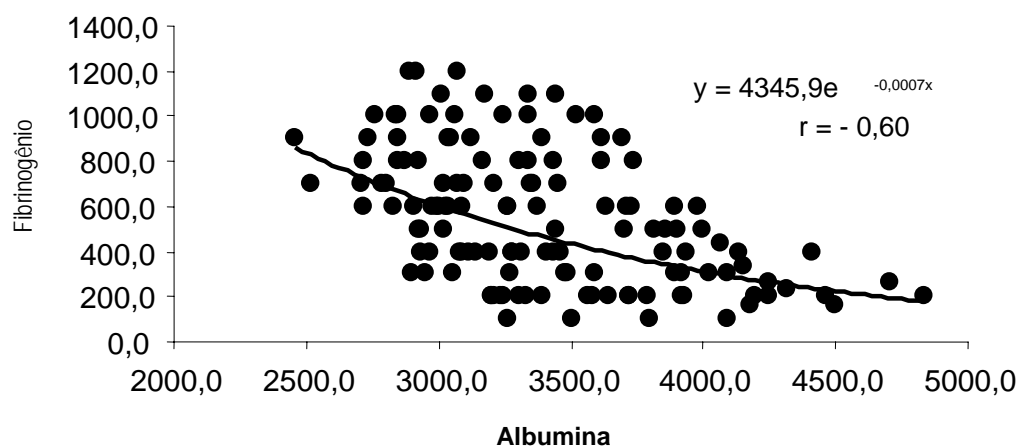
Uma relação altamente significativa foi identificada entre a ceruloplasmina com o fibrinogênio plasmático ( $r = 0,74$ ) nas ovelhas com mastite induzida com cepa de *S. aureus* em diferentes horas pós-inoculação (Tabela 16). Esta relação está expressa pela seguinte equação de regressão: **Fibrinogênio =  $-0,0101C_{eruloplasmina}^2 + 6,0144C_{eruloplasmina} + 95,609$**  e ilustrada na figura 19.





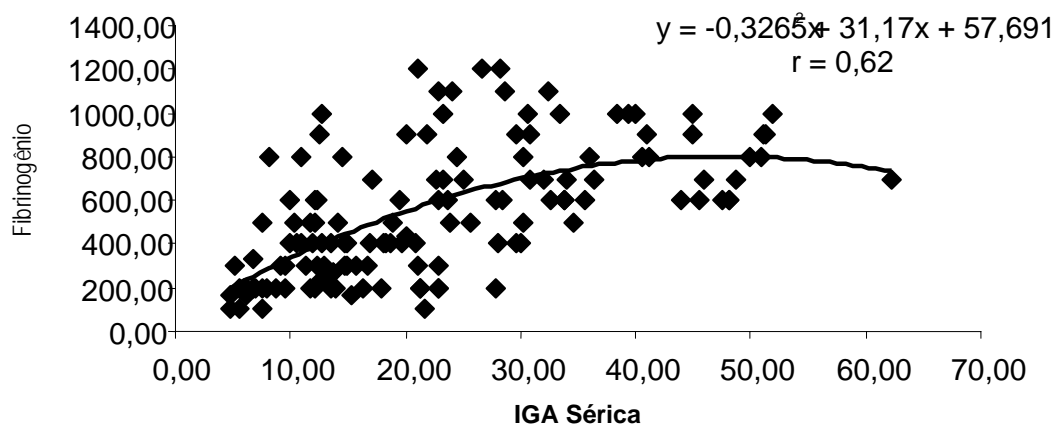
**Figura 19** – Relação entre a ceruloplasmina (mg/dL) e fibrinogênio plasmático (mg/dL) em ovelhas com mastite induzida com cepa de *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção

A análise da relação entre a albumina e o fibrinogênio plasmático mostrou alta relação negativa ( $r = -0,60$ ) nas ovelhas com mastite induzida com cepa de *S. aureus* em diferentes horas pós-inoculação (Tabela 15). Esta relação está expressa pela seguinte equação de regressão: **Fibrinogênio** =  $4345,9e^{-0,0007}$  Albumina Sérica e ilustrada na figura 20.



**Figura 20** – Relação entre a albumina (mg/dL) e fibrinogênio plasmático (mg/dL) em ovelhas com mastite induzida com cepa de *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção.

A análise da relação entre a IgAe o fibrinogênio plasmático mostrou alta relação ( $r = 0,63$ ) nas ovelhas com mastite induzida com cepa de *S. aureus* em diferentes horas pós-inoculação (Tabela 15). Esta relação está expressa pela seguinte equação de regressão: **Fibrinogênio** =  $-0,3265 \text{ IgA}^2 + 31,17 \text{ IgA} + 57,691$  e ilustrada na figura 21.



**Figura 21** – Relação entre a IgA (mg/dL) e fibrinogênio plasmático (mg/dL) em ovelhas com mastite induzida com cepa de *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção.



**Tabela 16**– Tipos de efeitos e respectivos coeficientes de relação da regressão ajustadas dos minerais e proteínas de fase aguda séricos, em função dos momentos experimentais, de ovelhas com mastite induzida com cepa de *S. aureus* em diferentes horas pós-infecção.

Variáveis	Tipo de Efeito da Análise de Regressão			
	L	Q	C	r
Haptoglobina	0,0001	0,0001	ns	0,66
Ceruloplasmina	0,0001	0,0001	0,0001	0,71
Transferrina	ns	ns	0,0177	0,40
Hemopexina	0,0229	0,0480	ns	0,22
Albumina	0,0001	0,0001	0,0001	0,66
Antitripsina $\alpha 1$	0,0001	0,0001	0,0001	0,69
Glicoproteína Ácida $\alpha 1$	ns	ns	ns	0,22
IgG	0,0001	0,0001	0,0001	0,74
IgA	0,0001	0,0001	0,0004	0,66
Fibrinogênio Plasmático	0,0001	0,0001	0,0001	0,76

L – Efeito Linear; Q – Efeito Quadrático; C – Efeito Cúbico

## 6 – DISCUSSÃO

### 6.1 – Proteinograma

Não foram encontradas na literatura consultada informações sobre as alterações séricas das várias frações protéicas relacionadas à infecção experimental da glândula mamária de ovelhas com *S. aureus*.

A técnica de eletroforese permitiu o fracionamento de proteínas de diferentes pesos moleculares, permitindo identificar e quantificar algumas proteínas consideradas de fase aguda bem como imunoglobulinas (IgG e IgA). Estes achados corroboram com a literatura, quanto ao emprego desta técnica, sendo o fracionamento eletroforético em SDS-PAGE uma das mais confiáveis, de execução relativamente simples e de baixo custo, permitindo a detecção de concentrações protéicas extremamente baixas e a identificação de 20 a 30 tipos diferentes de proteínas, incluindo as proteínas de fase aguda e as imunoglobulinas (GORDON, 1975; FAGLIARI & SILVA, 2002), enquanto nos estudos em que foi empregado como matriz, fitas de acetato de celulose ou filmes de agarose, foi relatada a identificação de apenas cinco a sete bandas protéicas (MENDONÇA et al.; 2002; FAGLIARI et al., 2003).

Os estágios iniciais da reação inflamatória na glândula mamária, desencadeada pelo *S. aureus* foram responsáveis por várias alterações denominadas de fase aguda, sendo uma de suas características a ambigüidade de resposta de dois grupos distintos de proteínas de origem hepática. As proteínas de fase aguda positiva, como a haptoglobina, ceruloplasmina, hemopexina, antitripsina e glicoproteína ácida e as proteínas de fase aguda negativa, como a transferrina e a albumina. Segundo Jain (1993) este tipo de resposta é mediada pela ação de citocinas pró-inflamatórias liberadas nos estágios iniciais da infecção e/ou inflamação, e a concentração das proteínas pode aumentar (PFA positiva) ou diminuir (PFA negativa) como consequência do estímulo inflamatório.

#### 6.1.1 – Haptoglobina

A elevação nos valores desta  $\alpha_2$  globulina ocorreu já nas primeiras 24 horas PI, alcançando valores máximos às 180h PI, elevando-se mais de 14 vezes em relação ao encontrado no momento controle, elevação esta que apesar de significativa, foi inferior aos relatados por SALONEN et al. (1996), que verificaram um aumento de mais de 50 vezes em resposta à mastite experimental por *E. coli* em vacas. Este achado poderia estar relacionado ao

agente etiológico envolvido, tendo em vista ser a *E. coli*, uma bactéria Gram-negativa, representando um forte estímulo para a síntese hepática desta PFA, inclusive usada como modelos experimentais (SANDHOLM, 1995).

O aumento desta PFA a partir das 24 h PI foram semelhantes aos relatados por Pepin & Barden (1991) trabalhando com a infecção experimental por *C. pseudotuberculosis* na espécie ovina, onde verificaram elevação nos níveis da haptoglobina entre o primeiro e quinto dia após a infecção.

Estes resultados demonstram a importância desta proteína de fase aguda como indicador de processo inflamatório em ruminantes, entretanto são escassos os trabalhos relacionados a esta proteína na espécie ovina, particularmente em casos de mastite em ovelhas, tendo o *S. aureus*, como agente etiológico. A grande maioria da literatura está associada a estudos relacionados à mastite em vacas e principalmente as causadas por bactérias Gram negativas, sendo, nesta espécie animal, considerada como o melhor indicador inflamatório, quando comparado ao leucograma (JAIN, 1993). Ainda em bovinos, Pachauri et al. (2002) sugeriram haver direta correlação entre o seu nível plasmático e a extensão do dano no tecido mamário, auxiliando no prognóstico da enfermidade.

Em ovinos com obstrução bronquial e pneumonia foi verificado que a mensuração plasmática dos níveis de haptoglobina se mostraram melhores indicadores de dano tissular que o número de neutrófilos circulantes (PFEFFER & ROGERS, 1989).

Os resultados observados neste estudo reforçam os relatos de Skinner & Roberts (1994) quando descreveram que esta PFA pode ser utilizada como marcador para a presença de infecções bacterianas/inflamações em ovelhas, afirmando inclusive que é mais sensível e específica que o exame hematológico.

Alguns autores atribuíram a elevação da haptoglobina nos ovinos ao estresse decorrente da desmama e do transporte (ARTHINGTON et al., 2003; SALGADO, 2007). Os resultados encontrados sugerem a aplicabilidade da determinação desta proteína no diagnóstico precoce da mastite em ovelhas.

### **6.1.2 - Ceruloplasmina**

A elevação da ceruloplasmina em valores seis vezes superiores ao observado no momento controle coincidiu com a gravidade do quadro clínico da mastite desencadeado 24h PI com o *S. aureus*. Esta elevação da concentração desta proteína evidenciada neste estudo pode ser justificada por sua ação antiinflamatória e biocatalisadora (SEGELMARK et al., 1997; CHASSAGNE et al, 1998; PATEL et al, 2002).

Apesar de não serem encontrados na literatura consultada informações quanto a resposta da ceruloplasmina em casos de mastite em ovelhas infectadas com *S. aureus*, resultados semelhantes de elevação desta PFA em outras situações clínicas na espécie ovina, assim como em bovinos, também foram descritos por outros autores (CHASSAGNE et al., 1998; PFEFFER & ROGERS, 1989; PFEFFER et al., 1993; FAGLIARI et al.; 2003)

Embora a aplicação da ceruloplasmina como marcador inflamatório, ainda ser menos comum que a de outras PFA, os resultados obtidos neste experimento, focado na mastite clínica em ovelhas, reforçam a importância da ceruloplasmina como proteína de fase aguda com a capacidade em predizer os processos inflamatórios/infecciosos conforme já descrito por PFEFFER & ROGERS (1989); PFEFFER et al (1993) e (2000).

### 6.1.3 - Transferrina

A diminuição dos níveis séricos de transferrina observados nesta pesquisa até 60 horas PI a caracterizam como proteína de fase aguda negativa, conforme citado por Jain (1993) e Sandholm (1995) na espécie bovina em casos de mastite clínica, estando envolvida na imunidade inespecífica, já que seqüestra íons férricos que poderiam servir de substrato para patógenos e parasitas, auxiliando o organismo animal na defesa contra agentes infecciosos. (MURATA et al., 2004).

Em humanos, acredita-se que esta função bacteriostática da transferrina esteja relacionada à maior avidéz da lactoferrina pelo ferro em pH 6,4 a 6,7, facilitando a transferência deste microelemento do plasma para o leite (WEINBERG, 1978; DE JONG et al., 1990). É sabido que a glândula mamária da vaca aumenta a síntese de lactoferrina quando exposta à invasão bacteriana, sendo relatado que grandes quantidades de lactoferrina na glândula mamária de vacas secas, contribuem para a resistência frente à invasão de patógenos (SMITH et al., 1977), sendo esta proteína no leite um indicador diagnóstico de mastite em vacas lactantes (KOMINE et al., 2006).

Para TIZARD (2002), a concentração de transferrina aumenta em estados de diminuição do ferro sérico, situação que pode ocorrer nas infecções bacterianas causadas por *S. aureus* a partir da utilização deste mineral para o crescimento do microrganismo, conforme também evidenciado neste estudo, coincidindo nesta etapa de evolução do processo com um quadro de anemia microcítica, evidenciado por SIMÃO (2004) trabalhando paralelamente com outras variáveis empregando este mesmo modelo experimental.

#### 6.1.4 – Hemopexina

As informações referentes a determinação da hemopexina nas diferentes espécies animais, particularmente nos ruminantes são bastante escassas, ou mesmo raras. O decréscimo observado nas primeiras 24 horas após a infecção intra-mamária poderia estar relacionado a um mecanismo de defesa do organismo animal, caracterizado pela particularidade desta glicoproteína de se ligar a fração heme da hemoglobina, indisponibilizando o ferro para patógenos invasores, conforme relatado por Jain (1993), que atribui a redução drástica desta variável nas anemias hemolíticas e durante a ineficácia da eritropoiese.

#### 6.1.5 – Albumina

Os valores médios de albumina diminuídos nos momentos experimentais subseqüentes à indução da mastite clínica podem ser justificados pelos relatos de THOMAS (2000), que afirmou ocorrer diminuição desta proteína em resposta a processos inflamatórios, sendo considerada uma proteína de fase aguda negativa, demonstrado neste experimento pela alta correlação negativa com a ceruloplasmina ( $r = -0,68$ ) e o fibrinogênio plasmático ( $r = -0,60$ ). Resultados semelhantes de redução nos valores da albumina foram relatados por Cetin et al. (2005) em casos naturais de mastite gangrenosa causada por *S. aureus* em ovelhas.

A diminuição da concentração sérica da albumina pode ser justificada como decorrente principalmente de dois fatores. O primeiro estaria relacionado ao comprometimento do fígado em sintetizar esta proteína em detrimento de outras, como por exemplo, a haptoglobina, a ceruloplasmina e o fibrinogênio, consideradas como componentes importantes de fase aguda em resposta à inflamação (SANDHOLM, 1995; KANEKO et al., 1997); o outro seria que nos casos de mastite aguda provocada por diferentes agentes etiológicos, em detrimento da alteração da barreira existente entre a corrente sanguínea e o tecido mamário, em que há o aumento da permeabilidade vascular, se verifica a passagem de componentes oriundos do sangue, principalmente a albumina, para a mama acometida, acarretando a elevação desta proteína no leite dos quartos mamários acometidos pela mastite (SCHALM et al., 1971; BURRIEL & WAGSTAFF, 1998; SANTOS et al., 2007).

O discreto aumento dos níveis de albumina verificados a partir de 96 horas PI, demonstraram a tendência de retorno desta proteína aos valores médios evidenciados no momento controle, coincidindo com o restabelecimento clínico dos animais.



### 6.1.6 – Antripsina- $\alpha_1$

Para esta proteína em que foi observado inicialmente diminuição nos valores médios, os resultados verificados neste estudo divergem dos encontrados por Fagliari et al. (2003), que constataram elevações significativas nos níveis de antitripsina  $\alpha_1$  em novilhas com pasteurelose pneumônica experimental.

A antripsina- $\alpha_1$  é notavelmente a principal inibidora de protease circulante, que protege tecidos contra a ação da elastase neutrofílica, impedindo a ocorrência de dano tecidual (MURATA et al., 2004). Diante dos resultados, acredita-se que esta proteína não seja representativa como marcador inflamatório nas infecções intra-mamárias em ovelhas causadas pelo *S. aureus*, pois apesar do inóculo empregado ter acarretado um quadro agudo de mastite, com repercussões sistêmicas severas, estas não foram suficientes para induzir elevação desta proteína nos momentos iniciais de observação, conforme relatado por Hirvonen et al. (1996), que verificaram aumento dos níveis séricos de antripsina- $\alpha_1$  somente em novilhas severamente acometidas com mastite, sugerindo que tenham sofrido atividade proteolítica prolongada, concluindo que esta proteína não mostrou eficácia em predizer a severidade e prognóstico da infecção. Em contra-posição, Conner et al. (1989) relataram aumento dos níveis séricos desta proteína em bovinos com foco inflamatório.

A alta correlação observada entre a antripsina- $\alpha_1$  e a IgG ( $r=0,94$ ) demonstrou que esta proteína considerada por alguns autores como proteína de fase aguda, neste estudo se comportou de forma semelhante à síntese de IgG, sendo sua elevação constatada mais tardiamente, coincidindo com a detecção da imunoglobulina G no soro, não caracterizando a precocidade na sua síntese, a qual caracteriza uma proteína como de fase aguda.

Para Murata et al. (2004), o valor diagnóstico desta proteína de fase aguda na Medicina Veterinária ainda é questionável, daí a importância de se estudar mais detalhadamente o perfil da antripsina- $\alpha_1$  em relação a determinada condição mórbida nos ruminantes, particularmente nos ovinos.

### 6.1.7 - Glicoproteína Ácida $\alpha_1$

Das proteínas identificadas, no fracionamento eletroforético, a glicoproteína ácida  $\alpha_1$ , também conhecida como seromucóide não sofreu alterações ao longo dos momentos de observação, destoando do encontrado na literatura, sendo relatada como uma PFA, usada para monitorar processos inflamatórios em diferentes espécies animais (THOMAS, 2000; ECKERSALL et al., 2001, FAGLIARI et al., 2003), sendo considerada por Murata et al (2004) importante no monitoramento clínico de processos inflamatórios na espécie bovina.

Os resultados evidenciados no comportamento da glicoproteína ácida alfa-1 nos ovinos analisados neste experimento, contrariam as afirmações de Kogika et al. (2003), que pesquisando a dinâmica de PFA descreveram grandes elevações da mesma na circulação sanguínea de cães com processo inflamatório/infeccioso, sendo inclusive a PFA que demonstrou maior alteração nas inflamações agudas, mantendo-se em níveis elevados por até 12 dias, e, assim, foi considerada pelos autores como de eleição para avaliação do processo inflamatório.

Em se tratando de ruminantes os resultados divergem dos de Fagliari et al. (2003), que trabalhando com bovinos, verificaram após quatro a seis horas da inoculação intrabronquial de *Mannheimia haemolytica* um aumento de mais de 400% na concentração da Alfa-1 Glicoproteína Ácida e os de Regassa et al. (2002), que estudando ovelhas com metrite experimentalmente induzida, verificaram níveis elevados desta PFA por até duas semanas pós-infecção, quando comparados aos animais não-infectados, sendo um dos poucos trabalhos encontrados relacionando a elevação da referida proteína nesta espécie animal.

#### **6.1.8 – Fibrinogênio Plasmático**

A concentração do FP apresentou um aumento a partir das 36 horas, caracterizam-se uma hiperfibrinogenemia entre 60 a 180 horas PI, indicativo de um processo inflamatório resultante do aumento de sua síntese pelos hepatócitos, como resposta ao estímulo das interleucinas IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral (JAIN, 1993).

Para Jain (1993), entre 24 e 36 horas após a injúria tecidual, as concentrações de FP se elevam precedendo qualquer aumento nas gama globulinas, corroborando com o observado neste estudo, no qual o início do aumento significativo nas concentrações do FP pôde ser verificado às 36 horas PI.

A determinação do fibrinogênio tem sido utilizada em ovinos como um indicador confiável da presença de inflamação ou infecção bacteriana (PFEFFER et al., 1993), concordando com o observado neste experimento, onde as elevações se mantiveram até a recuperação dos sinais clínicos.

A avaliação do fibrinogênio na espécie bovina tem a vantagem de detectar não somente doenças inflamatórias, mas também a destruição dos tecidos, mais precoce que os leucócitos, em decorrência desta espécie não possuir reserva satisfatória de neutrófilos maduros na medula óssea, podendo não ocorrer resposta neutrofílica, ou seja, nas situações inflamatórias agudas, pode ocorrer leucopenia, ou nos casos crônicos os valores dos leucócitos podem permanecer inalterados (JAIN, 1993; KRAMER, 2000; SIMÃO, 2004).

É a PFA mais analisada mundialmente por ser de fácil determinação e de baixo custo, sendo empregada como marcador não específico da inflamação e de lesão tecidual, apesar de não ser a mais indicada nas diferentes espécies animais (JAIN, 1993). Foi verificado neste estudo alta correlação do fibrinogênio plasmático e a ceruloplasmina ( $r = 0,74$ ) (Figura 19; Tabela 15) e deste com a haptoglobina ( $r = 0,62$ ) (Figura 18; Tabela 15), ambas reconhecidas como importantes proteínas de fase aguda de ruminantes. Desta maneira, foi possível ratificar a utilização da determinação do fibrinogênio como marcador inflamatório da mastite em ovelhas, em virtude dos resultados obtidos nesta pesquisa.

Cole et al. (1997) citaram que a concentração de haptoglobina aumenta rapidamente, geralmente um pouco antes da elevação do fibrinogênio plasmático, concordando com o observado neste estudo, porém ao contrário do que também afirmou este autor, as concentrações de haptoglobina não apresentaram decréscimo dos seus níveis séricos antes que o fibrinogênio aumentasse.

### 6.1.9 – Imunoglobulinas

A técnica de eletroforese em SDS-PAGE permitiu identificar e quantificar as imunoglobulinas da classe IgG e IgA.

O leve decréscimo na concentração da imunoglobulina G nos primeiros dias após a infecção está relacionado à migração desta para a glândula mamária na tentativa de auxiliar no controle da infecção, onde há a passagem das imunoglobulinas do sangue para o leite em decorrência da alteração da barreira existente entre a corrente sanguínea e o tecido mamário, em que há o aumento da permeabilidade vascular, acarretando a passagem de imunoglobulinas, particularmente desta classe (IgG), que é a predominante no soro e no leite de ruminantes (SCHALM, 1977; SANDHOLM & KORHONEN, 1995).

A elevação observada a partir do quinto dia pós-infecção, em que se observa elevação mais intensa desta classe de imunoglobulina, ocorreu em virtude do estímulo antigênico desencadeado pelo *S. aureus*, com a conseqüente elevação da concentração da IgG, considerada uma imunoglobulina específica frente ao agente infeccioso (TIZARD, 2002).

A satisfatória proteção contra agentes infecciosos, dentre estes o *S. aureus*, muitas vezes tem a participação tanto da imunidade mediada por células T, quanto da imunidade humoral, mediada por anticorpos. Desta forma, em várias infecções com repercussão sistêmica, a resposta imune humoral é caracterizada por alto título de IgG, sendo esta imunoglobulina de fundamental importância na eliminação de agentes bacterianos por meio

de opsonização e posterior fagocitose, conforme observado neste estudo (SANDHOLM & KORHONEN, 1995).

A elevação sérica de IgA pode estar relacionada à demanda, tendo em vista a importância desta classe de imunoglobulinas na proteção de superfícies corpóreas, dentre estas a glândula mamária, contra a invasão de agentes infecciosos, prevenindo a aderência bacteriana (JAIN, 1993). O momento em que a concentração desta classe de imunoglobulina começa a decrescer coincide com o aumento no soro da imunoglobulina G.

A concentração de IgA no soro demonstrou correlação positiva com o fibrinogênio ( $r = 0,63$ ) e com a ceruloplasmina ( $r=0,65$ ), ambas PFA positiva, conforme evidenciado neste estudo, podendo talvez esta imunoglobulina ser um bom indicador da infecção precoce da glândula mamária de ovelhas.

## 6.2 – Minerais

As informações relacionadas às alterações dos níveis séricos de cobre nos casos de mastite causada por *S. aureus* em ovinos são escassas, sendo mais comum os relatos em bovinos. Como observado nos resultados, as elevações marcantes dos níveis plasmáticos de cobre foram encontradas em vacas e cabras com mastite experimental por *E. coli* e *S. aureus* (VAN MIERT et al., 1983; LOHUIS et al., 1988ab). Ao contrário do que foi observado por Middleton et al. (2004), nos casos de mastite experimental em vacas por *S. aureus*, que encontraram diminuição sérica nos níveis deste elemento, justificando o fato da infecção ocorrida na glândula mamária ter sido branda e com isso a liberação dos mediadores inflamatórios teve pouca influência sistêmica. Em ovelhas com casos subclínicos de mastite, Lamand & Levieux (1981), verificaram hipercupremia significativa que persistia por longo tempo, mesmo durante o período de convalescença dos animais após o tratamento. Um fator que possa explicar o aumento dos níveis de Cu sérico observado nas ovelhas com mastite, seria a relação do elemento com a ceruloplasmina, proteína de fase aguda produzida pelo fígado que está associada com 90% do Cu presente no plasma/soro, cuja síntese está marcadamente elevada como consequência da infecção intra mamária, pela qual provoca uma redistribuição do teor de cobre hepático para o plasma. Diante do exposto, relata-se que o quadro de hipercupremia pode também estar relacionado à condição de estresse ocorrida no animal, devido a certas afecções que provocam o estímulo à síntese da ceruloplasmina e a sua

liberação pelo fígado (FELDMAN et al., 1981; COUSINS, 1985; CONNER et al., 1986; CLEGG et al., 1987; KEEN & GRAHAM, 1989).

A diminuição expressiva encontrada para os valores do ferro e zinco no soro foi relatada por outros autores, em maior ou menor intensidade, nos casos de mastite em vacas, cabras e ovelhas; e que corroboram com as alterações séricas destes microelementos à resposta inflamatória, iniciada pela liberação de mediadores inflamatórios (LAMAND & LEVIEUX, 1981; VERHEIJDEN, 1982; VAN MIERT et al., 1983; VAN MIERT et al., 1984b; MIDDLETON et al., 2004; YILDIZ & KAYGUSUZOGLU, 2005).

Destaca-se como a mais importante relacionada a este fenômeno as citocinas, incluindo as interleucinas 1 (IL-1), interleucina -6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ), que em função da sua influência, o ferro e o zinco são removidos da circulação e estocados no fígado, acarretando menor disponibilidade livre destes elementos aos agentes causadores da mastite. Além desta ação, as citocinas são responsáveis pela maioria dos sinais observados na inflamação, bem como a mobilização celular na glândula mamária (SANDHOLM, 1995; TIZARD, 2002; WINTER & COLDITZ, 2002). Após a invasão bacteriana, cessa a absorção de ferro e zinco. As citocinas produzidas por macrófagos estimulam a secreção de transferrina e haptogloblina pelos hepatócitos, e há aumento da incorporação de ferro no interior do fígado, reduzindo a disponibilidade deste microelemento, conseqüentemente retardando a multiplicação bacteriana (SANDHOLM, 1995).

Resultados semelhantes foram relatados por Burriel & Heys (1997), que analisando o perfil do ferro em ovelhas, durante infecção intramamária causada por *Staphylococcus coagulase negativo*, relataram diminuição nos níveis séricos deste microelemento, atribuindo ao mecanismo de defesa não específico do hospedeiro contra infecções bacterianas. Weinberg (1978) ressalta que na competição entre o estabelecimento da infecção bacteriana e a supressão bem sucedida da doença por parte do hospedeiro, o ferro é o metal que parece ser mais importante.

A diminuição nos níveis de ferro no soro, conforme evidenciado neste estudo, pode estar também relacionada à competência da aquisição de Fe pelo microrganismo e na habilidade de causar infecções difusas e não apenas locais (PICCIANO & GUTHRIE; 1976).

Apesar de Middleton et al. (2004) concluírem que o processo de indisponibilização de minerais como um mecanismo de defesa inespecífico na mastite por *S. aureus* ser menos acentuado que o descrito para infecções por Gram-negativas, como a causada pela *Escherichia coli*, neste estudo ficou bem caracterizado a potente ação local do *S. aureus* sobre

a glândula mamária de ovelhas e sua repercussão sistêmica por meio da resposta das PFA e das alterações séricas dos minerais Fe, Zn e Cu.

## 7- CONCLUSÕES

A interpretação dos resultados obtidos neste trabalho, de acordo com as circunstâncias metodológicas em que o experimento foi delineado, permitiu-nos chegar as seguintes conclusões:

- O modelo de infecção experimental por *S. aureus* na glândula mamária de ovelhas é capaz de desencadear manifestações clínicas sistêmicas e marcantes alterações na glândula inoculada, acarretando a perda da funcionalidade da mesma.
- O fracionamento eletroforético em SDS-PAGE do soro de ovelhas é um método satisfatório de identificação e quantificação de proteínas de fase aguda, positiva e negativa, bem como imunoglobulinas (IgG e IgA) em ovelhas com mastite.
- A ceruloplasmina e a haptoglobina são proteínas de fase aguda consideradas de eleição como indicadores precoce da mastite em ovelhas e, estas apresentam alta correlação com o fibrinogênio plasmático.
- A infecção experimental da glândula mamária pelo *S.aureus* desencadeou alteração na concentração sérica dos minerais, caracterizada pelo decréscimo do Ferro e Zinco e elevação do cobre

## 8- REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M.Z.P.R.B.; OLIVEIRA, L.G.L.; AFONSO, J.A.B.; LÁZARO, N.S.; MENDONÇA, C.L. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite subclínica em ovelhas da raça Santa Inês no Agreste Meridional do Estado de Pernambuco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 6, 2007, Curitiba. **Anais...** Curitiba, 2007b.

ANDERSON, D.E.; HULL B.L.; PUGH, D.G. 2005. Enfermidades da glândula mamária. In: PUGH, D.G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, p.379-399.

ARTHINGTON, J. D.; EICHER, S. D.; KUNKLE, W. E.; MARTIN, F. G. Effect of transportation and commingling on the acute-phase protein response, growth, and feed intake of newly weaned beef calves. **American Society of Animal Science**, 81, p.1120-1125, 2003.

BERGONIER, D.; BERTHELOT, X. New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. **Livestock Production Science**. Amsterdam, v.79, p. 1-16, 2003.

BURRIEL, A. R.; HEYS, V. Serum and milk iron levels during sheep intramammary infection caused by coagulase-negative staphylococci. **Biological trace element research**, Clifton, v. 59, n.1-3, p. 153-58, 1997.

BURRIEL, A.R.; WAGSTAFF, A. **Animal science** (British Society of Animal Science), v, 67, n.33, p. 499-502, 1998

BRUÈRE, A.N.; WEST, D.M. **The sheep: health, disease & production**. New Zealand: Foundation for continuing education of the New Zealand Veterinary Association - Massey University, 1993. 397p.

CANAVESSI, A. M. O. **Valores do perfil eletroforético das proteínas séricas de bovinos da raça Nelore (*Bos indicus*) criados na região de Botucatu, São Paulo: influência de fatores etários e sexuais**. 1997. 108f. Dissertação (Mestrado em Patologia Clínica Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1997.

CARTER, E.R.; COLE JUNIOR, J.R. 1990. **Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and micology**. 5 ed. New York: Academic Press, 620p.

CASTRO, G. F. Evaluación de procesos inflamatórios em bóvidos: determinación de proteínas de fase aguda. **Medicina Veterinária on Line**. Madrid, v. 17 n. 2. 2000.

CETIN, H; YARALIOGLU GURGOZE, S.; KESKIN, O.; ATLI, M. O. ; KORKMAZ, O. Investigation of antioxidant enzymes and some biochemical parameters in ewes with gangrenous mastitis. **Turk Journal Veterinary Animal Science**, v. 29, p. 303-308, 2005.

CHASSAGNE, M.; BARNOUIN, J.; CHACORNAC, J. P. Biological predictors for early clinical mastitis occurrence in Holstein cows under field conditions in France. **-Preventive veterinary medicine**, Amsterdam, v. 35. p. 29-38, 1998.



- CHVAPIL, M. New aspects in the biological role of Zinc: a stabilizer of macromolecules and biological membranes. **Life Sciences**. Elmsford, v. 13. p. 1041-1049, 1973.
- CLEGG, M.S.; FERREL, F.; KENN, C.L. Hypertension-induced alterations in copper and zinc metabolism in Dahl rats. **Hypertension**, Dallas, v.9, n.6, p.624-628, 1987.
- COORAY, R.; WALLER, K. P.; VENGE, P. Haptoglobin comprises about 10% granule protein extracted bovine granulocytes isolated from healthy cattle. **Vet. immunol. Immunopathol**, Amsterdam, (2007). doi: 10.1016/j.vetimm. 2007.06.026.
- COLE, D. J.; ROUSSEL, A. J.; WHITNEY, M. S. Interpreting a bovine CBC: evaluating the leukon and acute-phase proteins. **The Veterinary clinics of North América - Food animal practice**, Texas, v. 92, n. 5, p. 470-478, Maio. 1997.
- CONNER, J.G., et al. Acute phase response and mastitis in the cow. **Research in Veterinary Science**. London, v. 41, 126. 1986.
- CONNER J.G.; ECKERSALL P.D.; WISEMAN A. et al. Acute phase response in calves following infection with *Pasteurella haemolytica*, *Ostertagia ostertagi* and endotoxin administration. **Research in Veterinary Science**., London, v.47, p.203, 1989.
- CONTRERAS A.; SIERRA, D.; SANCHES, A.; CORRALES, J.C.; MARCO, J.C.; PAAPE, M.J.; GONZALO, C. Mastitis in small ruminants. **Small Ruminant Research**, Amsterdam , v. 68, p. 145-153, 2007.
- CORRIGALL, W.; DALGARNO, A.C.; EWEN, L.A.; WILLIAMS, R. B. Modulation of plasma copper and zinc concentrations by disease states in ruminants. **The Veterinary Record**, London, v. 99. p. 396-397. 1976.
- COSTA, N.A. et al. 2001. Ocorrência de mastite em ovelhas atendidas na Clínica de Bovinos. In: XXVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 28, 2001, Salvador, **Resumos...** Salvador, 2001.
- COUSINS, R.J. Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. **Physiological reviews**., Baltimore, v.65, n.2, p. 238-309, 1985.
- COUTINHO D.A., COSTA J.N., RIBEIRO M.G.; TORRES J.A. Etiologia e sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de bactérias isoladas de ovelhas da raça Santa Inês com mastite subclínica. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.7, n.2 p.139-151, 2006.
- CRICHTON, R. R.; CHARLOTEAU-WAUTERS, M. Iron transport and storage. **European journal of biochemistry**, Berlin, v. 164. p. 485-506. 1987.
- DEIGNAN, T.; ALWAN, A.; KELLY, J.; McNAIR, J.; WARREN, T.; O'FARRELLY, C. Serum haptoglobin: an objective indicator of experimentally-induced *Salmonella* infection in calves. **Research in Veterinary Science**, London, v. 69. p. 153-158. 2000.
- DE JONG, G.; VAN DIJK, J. P.; VAN EIJK, H. G. The biology of transferrin. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 190. p. 1-46. 1990.

- DIARRA, M. S.; PETITLERE, D.; LAASSE, P. Response of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis to exogenous iron sources. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85. n. 9, p. 2141-2148, 2002.
- DOMINGUES, P.F.; LUCHEIS, S.B.; SERRÃO, L.S.; FERNANDES, S.; CONTENTE, A.P.A.; MARTINS, E.C.V.; LANGONI, H. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite subclínica em ovelhas da raça Santa Inês. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v. 22, n. 2, p. 146-152, 2006.
- EATON, J. W.; BRANDT, P.; MAHONEY, J. R.; LEE Jr., J. T. Haptoglobin: a natural bacteriostat. **Science**, v. 215. n. 4533. p. 691-693. 1982.
- ECKERSALL, P. D.; CONNER, J. G. Bovine and canine acute phase proteins. **Veterinary Research Communication**, Amsterdam, v. 12, p. 169-178, 1988.
- ECKERSALL, P. D. Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. 2000. **Révue Méd. Vét.** v. 151. p. 577-584.
- ECKERSALL, P. D.; YOUNG, F. J.; McCOMB, C.; HOGARTH, C. J.; SAFI, S., WEBER, A.; McDONALD, T.; NOLAND, A. M.; FITZPATRICK, J. L. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. **Veterinary Record**, London, v. 148. p. 35-41, 2001.
- ECKERSALL, P. D. The time is right for acute phase protein assays. **The Veterinary Journal**, Glasgow, UK. v. 168, n.1, p. 3-5, 2004
- EL-MASANNAT, E.T.S.; JONES, J.E.T. & SCOTT M.J. The experimental production of mastitis in sheep by intramammary inoculation of *Pasteurella haemolytica*. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, 105, p. 455-465, 1991.
- ERSKINE, R.J.; BARTLETT, P.C. Serum concentrations of copper, iron and zinc during *Escherichia coli* induced mastitis **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.76, p. 375-381, 1993.
- ESKEW, J. D. ; VANACORE, R. M. ; SUNG, L. ; MORALES, P. J. ; SMITH, A. Cellular protection mechanisms against extracellular Heme. **The Journal of Biochemical Chemistry**, v. 274, n. 2, p. 638-648, 1999.
- ETZEL K.R., et al. Endotoxin induced changes in copper and zinc metabolism in the Syrian hamster. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, University Park, v.112, p. 2363-2373, 1982.
- FAGLIARI, J.J.; SILVA, S.L.Hemograma e proteinograma plasmático de equinos hígidos e de equinos acometidos por abdômem agudo antes e após laparotomia. **Arquivo brasileiro de medicina veterinaria e zootecnia**, Belo Horizonte, v. 54, n.6, p. , 2002.
- FAGLIARI J.J.; WEISS D.J.; MCCLENANHAN D.M.; EVANSON O.A.. Serum protein concentrations in calves with experimentally induced pneumonic pasteurellosis. **Arquivo brasileiro de medicina veterinaria e zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n.4, p. , 2003.

FAGLIARI J.J.; RIZOLLI F.W.; SILVA S.L., SILVA D.G. Proteinograma sérico de bezerros recém-nascidos da raça Holandesa obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n.3, p.450-453, 2006.

FELDMAN B.F., et al. Anemia of inflammatory disease in the dog: measurement of hepatic superoxide dismutase, hepatic nonheme iron, copper, zinc, and ceruloplasmin and serum iron, copper, and zinc. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.42, n.7, p. 1114-1117, 1981.

FIL-IDF – FEDERATION INTERNATIONALE DE LAITERIE-INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Bulletin Laboratory Methods for use in mastitis work. Document 132, Brussels, 27p. 1981.

FOURNIER, T.; MEDJOUBY-N, N.; PORQUET, D. Alpha-1-acid glycoprotein. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1482. p. 157-171. 2000.

GANHEIM, C.; ALENIUS, S.; WALLER, K. P. Acute phase proteins as indicators of calf herd health. **The Veterinary Journal**, London, v. 173. p. 645-651. 2007.

GOMES, M. J. P. *Staphylococcus spp* **Microbiologia Clínica. LABACVET. 2007-II**

GOMIS-RÜTH, F.X. **Hemopexin Domains: handbook of metalloproteins**. v. 3. Chichester: John Wiley & Sons, 2004. p. 631-646

GORDON, A.H. **Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels**. Nova York: Elsevier Science Publishers, 1975. 213p

GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAVID, M.M. Determination of serum protein by means of biuret reaction. **The Journal of Biological Chemistry**. Bethesda, Md., US: American Society of Biological Chemists, v.177, p.751-766, 1949.

GRIEGER, T. A.; KLUGER, M. G. Effects of bacteria and temperature on free serum iron levels in the lizard *Dipsosaurus dorsalis*. **Physiologist**, Bethesda, v. 20. p. 37. 1977.

GRÖNLUND, U.; HULTÉN, C.; ECKERSALL, P. D.; HOGARTH, C.; WALLER, K. P. Haptoglobin and serum amyloid a in milk and serum during acute and chronic experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. **Journal of Dairy Research**, Cambridge. v. 70. p. 379-386. 2003.

GRÖNLUND, U.; SANDGREN, C. H.; WALLER, K.P. Haptoglobin and serum amyloid a in milk from dairy cows with chronic sub-clinical mastitis. **Veterinary Research**, Les Ulis, v. 36. p. 191-198. 2005.

GRÜNERT, E. Sistema genital feminino In: DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H.D.; STÖBER M. **Rosenberger: exame clínico dos bovinos**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1993. p.299-308.

HIRSH, D.C., ZEE, Y.C. **Microbiologia Veterinária**. 2, Ed. Guanabara Koogan, 1999. p. 108-112.

- HIRVONEN, J.; PYÖRÄLÄ, S.; JOUSIMIES-SOMER, H. Acute response in heifers with experimentally induced mastitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 63. p. 351-360, 1996.
- HISS, S.; MIELENZ, M.; BRUCKMAIER, R. M.; SAUERWEIN, H. Haptoglobin concentrations in blood and milk after endotoxin challenge and quantification of mammary Hp mRNA expression. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87. p. 3778-3784, 2004.
- HOCHEPIED, T.; BERGER, F.G.; BAUMAN, H.; LIBERT, C.  $\alpha_1$ -acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. **Cytokine & Growth factors reviews**, New York, v. 14, n. 1, p. 25-34, 2003.
- HOGARTH, C. J.; FITZPATRICK, J. L.; NOLAN, A. M.; ECKERSALL, P. D. The acute phase response in bovine mastitis. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 12., 2002, Germany. **Proceedings...** Germany: University of Hannover, 2002.
- HORADAGODA, N. U.; KNOX, K. M. G.; GIBBS, S. W.; REID, S. W. J.; HORADAGODA, A.; EDWARDS, S. E. R.; ECKERSALL, P. D. Acute phase protein in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. **Veterinary Record**, London, v. 144. p. 437-441. 1999.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa Pecuária Municipal**, 2006. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 15 jan. 2007.
- JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 4 ed.; Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. 221p.
- JAIN, N. C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febinger, 1993.
- KALLAUR, A. P.; BUQUI, G A.; SABINO, G. C.; MASTELLARI, R. B.; MORIMOTO, H. K.; VOGLER, I. H.; REICHE, E. M. V. Frequência das alterações dos níveis séricos de imunoglobulinas dos pacientes atendidos no Hospital Universitário, Londrina, Paraná. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 28, n. 1, p. 23-32, jan./jun. 2007.
- KANEKO, J. J. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 4. Ed. California: Academic Press Inc.1989. p. 142-164.
- KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.. BRUSS, M: L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5.ed. New York: Academic Press, 1997. 932p.
- KEAY G.; DOXEY D.L. Species characteristics of serum proteins demonstrated after agarose gel electrophoresis. **Veterinary Research Communication**, Amsterdam, v.5, p.263-270, 1982.
- KEEN, C.L.; GRAHAM; T.W. Trace elements. In: KANEKO, J.J. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 4. ed. San Diego: Academic Press, p. 753-795, 1989.
- KRAMER J.W. Normal hematology of cattle, sheep and goats. IN: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2000, p.1075-1084.

- KIRK, J.H.; GLENN J.S. Mastitis in ewes: the compendium for continuous education for veterinarian practice veterinarian. **Food Animal**, Philadelphia, v.18, p.582-591, 1996.
- KOGIKA, M. M.; PEREIRA, D. A.; ELIAS, F.; NOTOMI, M. K.; DELAYTE, E. H.; KAWARARA, R.; HAGIWARA, M. K. Determinação sérica de haptoglobina, ceruloplasmina, e alfa-glicoproteína ácida em cães com gastrenmterite hemorrágica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33. n.3, p. 513-517, 2003.
- KOMINE, Y.; KOMINE, K.; KAI, K.; ITAGAKI, M.; KUROISHI, T.; ASO, H.; OBARA, Y.; KUMAGAI, K. Effect of combination therapy with lactoferin and antibiotics against *S taphylococcal mastitis* on Drying cows. **The Journal of veterinary medical science**, Tokyo, v. 68, n. 3, p. 205-211, 2006.
- KORHONEN H.; KAARTINEN, L. Changes in the composition of milk induced by Mastitis. In: Sandholm M.; Buzalski T.H.; Kaartinen L.; Pyörälä S. **The bovine udder and mastitis**. Helsinki: Gummerus Kirjapaino, 1995, p.76-82.
- KORHONEN H.; MARNILA, P; GILL, H. S. Milk immunoglobulins and complement factors. **British Journal of Nutrition**, London, v. 84, Suppl. 1, p. 75-80, 2000.
- LADEIRA, S. R. L. . Mastite ovina. In: Franklin Riet-Correa; Ana Lucia Schild; Maria del Carmen Men. (Org.). **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. 2. ed. São Paulo: Varela Editora e Livraria, 2001, v. 2, p. 312-316.
- LADEIRA, S.R.L. Mastite ovina, In: RIET-CORREA, F., et al. **Doenças de ruminantes e eqüinos**. 3. ed. Santa Maria: Pallotti, 2007, v.1, p.312-316.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LAMAND, M., LEVIEUX D. Effects of infection on plasma levels of cooper and zinc in ewes. **Ann. Rech. Vét.**, Versailles, v.12, n.2, p.133-136, 1981.
- LITTLE, T. M.; HILLS, F. J. **Agricultural experimentation: design and analysis**. New York: John Wiley, 1978. 350 p.
- LOHUIS J.A.C.M., VERHEIJDEN J.H.M., BURVENICH C., VAN MIERT A.S.J.P.A.M. Pathophysiological effects of endotoxins in ruminants. Metabolic aspects. **Veterinary Quarterly**, The Hague, v. 10, n.2, p. 117-125, 1988a.
- LOHUIS J.A.C.M., VAN LEEUWEN W., VERHEIJDEN J.H.M., SMIT J.A.H., BRAND A., VAN MIERT A.S.J.P.A.M. Growth of *Escherichia coli* in whole and skim milk from endotoxin induced mastitic quarters: In vitro effects of deferoxamine, zinc and iron supplemetation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 72, p. 2772-2781, 1988b.
- \_\_\_\_\_. Effect of severity of systemic signs during the acute phase of experimentally induced *Escherichia coli* mastitis on milk production losses. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.73, p.333-341, 1990.

- MATOS, J. R. **Proteínas de fase aguda em borregos e ovelhas nos períodos de pré-parto e lactação**. 2005. 56p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal da Bahia, Salvador. 2005.
- MAZZAFERRO, E. M.; RUDLOFF, E.; KIRBY, R. The role of albumin replacement in the critically ill veterinary patient. **Journal of Veterinary Emergency and critical Care**, San Antonio-Tex, v. 12, n.2, p. 113-124. 2002.
- McDONALD, T. L., LARSON, M. A., MACK, D. R., WEBER, A. elevated extrhepatic expression and secretion of mammary-associated serum amyloid A3 (M-SAA3) into colostrums. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 83. p. 203-211. 2001.
- McDOUGALL, S; PANKEY, W.; DELANEY, C.; BARLOW, J.; MURDOUGH, P.; SCRUTON, D. Prevalence and incidence of subclinical mastitis in goats and dairy ewes in Vermont, USA. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 46, p.115-121, 2002.
- MCFADDEN, T.B.; BESSER, T.E.; BARRINGTON, G.M. Regulation of immunoglobulin transfer into mammary secretions of ruminants. In: R.A.S. Welch, D.J.W. Burns, S.R. Davis, A.I. Popay and C.J. Prosser, Editors, **Milk Composition, Production and Biotechnology**, C.A.B. International, Oxon, UK, p. 133–152, 1997.
- McSHERRY, B, J., HORNEY, F, D., DEGROOT, J, J. Plasma Fibrinogen in normal and sick cows. *Canadian journal of comparative medicine*, Ottawa-CA v. 34. p. 191-197. 1970.
- MEDEIROS, J.X. Agronegócio e o trabalho cooperativo. In: WORKSHOP SOBRE CAPRINOS E OVINOS TROPICAIS. 1998, Fortaleza. **Relatório**...Fortaleza: BNB, 1998, p.8.
- MEHRA, R.; MARNILA, P.; KORHONEN, H. Milk immunoglobulins for health promotion. **International Dairy Journal**, Barking, v. 16, p. 1262–1271, 2006.
- MENDONÇA, C. L.; KOHAYAGAWA, A.; SCHENK, M. A. M.; MADRUGA, C. R.; VIEIRA, D.; AFONSO, J. A. B.; CARVALHO, C. M. E. Perfil eletroforético das proteínas séricas de bezerras Nelores infectados experimentalmente com isolados de *Babesia bigemina* das regiões sudeste, nordeste e norte do Brasil, v. 5, n. 2 e 3, 2002.
- MENDONÇA, C.L.; AFONSO, J.A.B., COSTA, N.A.. Mastite em ovelhas. **Veterinária & Zootecnia**, Recife, v. 25, p. 7, 2005.
- MENZIES, P.I.; RAMANOON, S.Z. Mastitis of sheep and goats. **The Veterinary clinics of North América - Food animal practice**, Philadelphia, v. 17, p. 333-358, 2001.
- MIDDLETON, J.R.; LUBY, C. D.; VIERA, L.; TYLER, J. W.; CASTEEL, S. Short Communication: Influence of *Staphylococcus aureus* Intramammary Infection on Serum Copper, Zinc, and Iron Concentrations. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v 87, p. 976-979, 2004.

- MILLER, W. J. Absorption, tissue distribution, endogenous excretion and homeostatic control of Zinc. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 22. n.10. p. 1323-1331. 1969.
- MILLES, P.N.; WILKINSON S., MCDOWELL L.R. **Analysis of mineral for animal nutrition research**. 3. ed. Florida: University of Florida - Department of Animal Sciences/USDA/T-STAR, 2001, 118p.
- MOTOI, Y; ITOH H.; TAMURA K; et al Correlation of serum concentration of  $\alpha$ 1-acid glycoprotein with lymphocyte blastogenesis and development of experimentally induced or naturally acquired hepatic abscess in cattle. **American journal of veterinary research**, Chicago, v.53, p.574, 1992.
- MURATA H.; SHIMADA N.; YOSHIOKA M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **The Veterinary Journal**, London, v.168, p.28-40, 2004.
- MURATA, H. Stress and acute phase protein response: an inconspicuous but essential linkage. 2007. **The Veterinary Journal**, London, v. 173, p. 473-474.
- NETTO, I. Bom preço e retorno rápido são vantagens dos ovinos. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 25 out 2000. Disponível em: <<http://www.estado.estadao.com.br/suplementos/agri>>. Acesso em: 16 jan. 2002.
- NIELSEN, B. H. ; JACOBSEN, S. ; ANDERSEN, P. H. ; NIEWOLD, T. A. ; HEEGAARD, P. M. H. Acute phase protein concentrations in serum and milk from healthy cows, cows with clinical mastitis and cows with extramammary inflammatory conditions. **The Veterinary Record**, London, v. 154. p.361-365, 2004.
- OHTSUKA, H.; KUDO, K.; MORI, K.; NAGAI, F.; HATSUGAYA, A.; TAJIMA, M.; TAMURA, K.; HOSHI, F.; KOIWA, M.; KAWAMURA, S. Acute Phase Response in Naturally Occurring Coliform Mastitis. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 63, n.6, p.675-678, jun. 2001.
- OLIVEIRA, V.L.M. **Aspectos do leite e mastite em ovinos da raça Santa Inês em Sergipe**. 2006. 70p. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Núcleo de Pesquisa e Pós-Graduação e Estudos em Recursos Naturais, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 2006..
- OLIVEIRA, .L.G.L. **Estudo clínico-epidemiológico e bacteriológico da mastite em ovelhas da raça Santa Inês no agreste meridional do Estado de Pernambuco**. 2007. 47f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2007.
- O'MAHONY, M.C. ; HEALY, A. M. ; HARTE, D. ; WALSH, K. G. ; TORGERSON, P. R. DOHERTY, M. L. Milk Amyloid A: correlation of cellular indices of mammary inflammation in cows with normal and raised serum amyloid A. **Research in Veterinary Science**, London, v. 80. p.155-161, 2006.
- ONU-FAO. FAOSTAT Agriculture Database Disponível em:<<http://apps.fao.org/page/collections?subset=agriculture>>. Acesso em: 25 jan. 02.

- PACHAURI, S. P.; GUPTA, M.; SINGH, V. S. Serum haptoglobin concentrations in crossbred cows with mastitis. **Indian Journal of Animal Sciences**, New Delhi, v. 72, n.1, p. 55-56, Jan. 2002.
- PATEL, B. N.; DUNN, R. J.; JEONG, S. Y.; ZHU, Q.; JULIEN, J. P.; DAVID, S. Ceruloplasmin regulates iron levels in the CNS and prevents free radical injury. **The Journal of Neuroscience**, Baltimore, v.22, p. 6578-6586, 2002.
- PERSON-WALLER, K.; COLDITZ, I.G.; FLAPER, P.; FRANKLIN, N.A.; SEOW, H.F. Accumulation of leuocytes and cytokines in the lactating ovine udder during mastitis due to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Research in Veterinary Science**, Amsterdam, v.62, p. 63-66, 1997.
- PEPIN, M.C ; BARDEN. N. **Molec. cell. Biol.** v. 11, p.1647–1653, 1991.
- PERSSON, K. ; AMOLINA, B. ; JONSSON, P. Inflammation in the bovine teat cistern induced by *Staphylococcus aureus*. **Journal Veterinary Medicine**, . v. 42, p. 435-442, 1995.
- PETERSEN, H. H.; NIELSEN, J. P. ; HEEGAARD, P. M. H. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary Research**, Les Ulis, v. 35, p.163-187, 2004.
- PFEFFER A; ROGERS K.M. Acute phase response of sheep: changes in the concentrations of ceruloplasmin, fibrinogen, haptoglobin and major blood cell types associated with pulmonary damage. **Research in Veterinary Science**. Amsterdam v.46, p.118, 1989.
- PFEFFER, A. ; ROGERS, K. M. ; O'KEEFFE, L. ; OSBORN, P. J. Acute phase protein response, food intake, liveweight change and lesions following intrathoracic injection of yeast in sheep. **Research in Veterinary Science**, London, v. 55, n.3, p. 360-366, 1993.
- PICCIANO, M. F. ; GUTHRIE, H. A. Copper, iron and zinc contents of mature human milk. **The American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 29, p. 242-254, 1976.
- PIÑEIRO, M. ; PIÑEIRO, C. ; CARPINTERO, R. ; MORALES, J. ; CAMPBELL, F. M. ; ECKERSALL, P. D. ; TOUSSAINT, M. J. M. ; LAMPREAVE, F. Characterization of the pig acute phase response to road transport. **The Veterinary Journal**, London, v. 173, p. 669-674, 2007.
- PYÖRÄLÄ, S. Staphylococcal and Streptococcal mastitis. In: SANDHOLM, M.; MONHAKEN-BUZALSKI, T.; KAARTINEN, L.; PYÖRÄLÄ, S. **The Bovine Udder and Mastitis**. Helsinki: University of Helsinki, p. 143-148, 1995.
- QUINN, P.J; CARTER, M.E; MARKEY, B; CARTER, G.R.**Clinical Veterinary Microbiology**, Philadelphia: Mosby, p.118, 1994.
- RADOSTITS O. M., GAY C. C., HINCHCLIFF, K. W., CONSTABLE P.D. **Veterinary Medicine**. 10.ed., London: Saunders Elsevier, 2007. 2156 p.



- REGASSA, F. ; NOAKES, D. E. Acute phase protein response of ewes and the release of PGFM in relation to uterine involution and the presence of intrauterine bacteria. **The Veterinary Record**, London, v.144, n.18, p. 502-506, 1999.
- REGASSA, F.; SHELDON, I. M.; NOAKES, D. E. Effect of experimentally induced metritis on uterine involution, acute phase protein response and PGFM secretion in the postpartum ewe. **The veterinary Record**, London, v.150, p. 605-607, 2001.
- REGASSA, F. ; SHELDON, I. M. ; NOAKES, D. E. Effect of experimentally induced metritis on uterine involution, acute phase protein response and PGFM secretion in the postpartum ewe. **The veterinary Record**, London, v. 150, p. 605-607, 2002.
- ROITT, I. M. ; DELVES, P. J. **Fundamentos de Imunologia**. 10. ed. Guanabara Koogan : Rio de Janeiro, 2004. 489p.
- SALGADO, M.L.B. **Efecto del destete y de un transporte terrestre y marítimo de 48 horas sobre los valores de algunos constituyentes sanguíneos indicadores de estrés em corderos corriedale**. 2007. 41f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Facultad de Ciências Veterinárias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, 2007
- SALONEN, M.; HIRVONEN, J. ; PIÖRÄLÄ, S. ; SANKARI, S. ; SANDHOLM, M. Quantitative determination of bovine serum haptoglobin in experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. **Research in Veterinary Science**, London, v. 60, n.1, p. 88-91, 1996.
- SANDHOLM, M. Inflammation in mastitis. IN: SANDHOLML, M. ; BUZALSKI, T. H. ; KAARTINEN, L. ; PYORALA S. **The bovine udder and mastitis**. Helsinki: Gummerus Kirjapaino, 1995. p. 59-75.
- SANDHOLM, M.; KORHONEN H. Infection of the udder-inflammation antibacterial defence mechanisms of the udder. In: SANDHOLML, M. ; BUZALSKI, T. H. ; KAARTINEN, L. ; PYORALA S. **The bovine udder and mastitis**. Helsinki: Gummerus Kirjapaino, 1995. p. 37-48.
- SANDHOLM, M.; PYÖRÄLÄ, S. Coliform mastitis. IN: SANDHOLML, M. ; BUZALSKI, T. H. ; KAARTINEN, L. ; PYORALA S. **The bovine udder and mastitis**. Helsinki : Gummerus Kirjapaino, 1995. p. 149-160.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. Belo Horizonte: Fundação de ensino em medicina veterinária e zootecnia, 1998, 221p.
- SANTOS, R. A.; MENDONÇA, C.L.; AFONSO, J.A.B.; SIMÃO, L.C.V. Aspectos clínicos e das características físico-químicas do leite em ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *Staphylococcus aureus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 1, p. 6-12, 2007.
- SAS INSTITUT. **SAS User's Guide**: statistical Analysis Systems Institute. Inc. Cary, 2000.
- SCHALM, O.W.; CARROLL, E. J.; JAIN, N.C. **Bovine mastitis**. Philadelphia: Lea e Febiger. 1971. 360p.

- SCHALM O.W. 1977. Pathologic changes in the milk and udder of cows with mastitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.170, p.1137-1140, 1977.
- SCOTT P.R., MURRAY L.D., PENNY C.D. A preliminary study of serum haptoglobin concentration as a prognostic indicator of ovine dystocia. **British veterinary journal**, London, 148: 351-355,1992.
- SEARS, P. M.; McCARTHY, K. K. Management and treatment of Staphylococcal mastitis. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**. Philadelphia, v.19. n.1. p.171 - 185, 2003. Disponível em <<http://www.vetfood.theclinics.com/article/PIIS0749072002000798/fulltext>>. Acesso em: 20 jul. 2004.
- SEGELMARK, M. ; PERSSON, B. ; HELLMARK, T. ; WIESLANDER, J. Binding and inhibition of myeloperoxidase (MPO): a major function of ceruloplasmin? **Clinical and experimental immunology**, Oxford, v. 108, p. 167-174, 1997.
- SHERMAN, A. R. Zinc, Copper, and Iron Nutriture and Immunity. Symposium: History of Nutritional Immunology. **The Journal of Nutrition**, Bethesda v.122, n.3, p. 604-609, 1992.
- SILVA, N. Diagnóstico da mastite em animais de importância econômica. In: **ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES**, 3., 1999, Botucatu. Anais... Botucatu: FMVZ, Unesp, SP, 1999, p. 51-55.
- SIMÃO, L. C. V. **Avaliação clínica e hematológica em ovelhas com mastite induzida experimentalmente com staphylococcus aureus**. 2004. 91f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2004.
- SKINNER, J.G. ; ROBERTS, L. Haptoglobin as an indicator of infection in sheep. **The Veterinary Record**, London, v. 134, n.2, p. 33-36. 1994.
- SKINNER, J.G. International Standardization of Acute Phase Proteins. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Bárbara, v. 30, n. 1, p. 2-7, 2001.
- SMITH, K. L.; SCHANBACHER, F. L. Lactoferrin as a factor of resistance to infection of the bovine mammary gland. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 170, p. 1224-1227, 1977.
- SMITH J.E. Iron metabolism and its diseases. In: KANEKO, J.J. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 4 ed. San Diego: Academic Press, p. 256-273, 1989.
- SMITH, B.P. **Tratado de Medicina Interna de grandes animais**. Editora Manole:São Paulo, Capítulo 26, p. 447-464, 1993.
- SOUZA, A.C.K.O.; OSÓRIO, M.T.M.; OSÓRIO, J.C.S.; OLIVEIRA, N.M.V.; SOUZA M.; CORREA, G.F. Produção, composição química e características físicas do leite de ovinos da raça Corriedale. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 11, n. 1,p. 73-77, 2005.

- SUTRA, L. ; POUTREL, B. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 40, p. 391-404, 1994.
- TAMURA ,K.; YATSU, T.; MOTOI, Y. Isolation characterization and quantitative measurement of serum  $\alpha$  1-glycoprotein in cattle. **Japanese journal of veterinary science**, Tokyo, v. 51, n.5, p. 987-994, 1989.
- TERRA. **Produção de leite de ovelhas e manejo para produção de carne de cordeiro**.2000 Disponível em: <<http://www.terra.com.br/rural/técnica>> . Disponível em: 16 jan 2002.
- THOMAS, J. S. Overview of plasma proteins. IN: FELDMAN, B. F. ; ZINKL, J. G. ; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5. ed. Philadelphia: Blackwell Publishing, 2000. p.891-898.
- TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**: uma introdução. 6. ed. São Paulo: Roca, 2002. 532p.
- VAN MIERT A.S.J.P.A.M., VAN DUIN C.T.M., VERHEIJDEN J.H.M., SCHOTMAN A.J.H. Staphylococcal enterotoxin B and *Escherichia coli* endotoxin: Comparative observations in goats on fever and associated clinical hematologic and blood biochemical changes after intravenous and intramammary administration. **American journal of veterinary research**, Chicago, v. 44, n.6, 955-963, 1983.
- VAN MIERT A.S.J.P.A.M., VAN DUIN C.T.M., VERHEIJDEN J.H.M., SCHOTMAN A.J.H., NIEUWENHUIS J. Fever and changes in plasma zinc and iron concentrations in the goat: the role of leukocytic pyrogen. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 94, 543-557, 1984.
- VAZ, A. K. Mastite em ovinos. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 16, p. 75-77, 1996.
- VERHEIJDEN, J. H. M. Plasma zinc and iron concentrations as measurements for evaluating the influence of endotoxin-neutralizing agents in *Escherichia coli* endotoxin-induced mastitis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 43, n.4, p.724-728, 1982.
- VESTWEBER, JG; LEIPOLD, HW. Staphylococcus aureus mastitis. I. Virulence, defense mechanisms, and establishment of infection. **The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian**, Princeton, v. 15 (11).p. 1561-1569, 1993.
- VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 1596p.
- WATSON, D.J.; BUSWELL, J.F. Modern aspects of sheep mastitis. **British Veterinary Journal**, London, v.140, n.6, p.529-534, 1984.
- WEINBERG, E. D. Iron and infection. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 42, n.1, p. 45-66, 1978.
- WEINBERG, E. D. Iron withholding: a defense against infection and neoplasia. **Physiological Reviews**, Baltimore, v. 64, n. 1, p. 65-102, 1984.

WINTER, A. Mastitis in ewes. **In Practice**, London, v. 23, p.160-163, 2001.

WINTER, P. ; COLDITZ, I. G. Immunological responses of lactating ovine udder following experimental challenge with *Staphylococcus epidermidis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 89, p. 57-65, 2002.

WINZLER, R.J. **The plasma proteins**. Academic Press:Nova York, v. 1, p. 309, 1960.

YILDIZ, H.; KAYGUSUZOGLU, E. Investigation of Ca, Zn, Mg, Fe, and Cu Concentrations in blood and milk of cow with negative and positive CMT results. **Veterinary Institute in Pulawy**, Pulawy, v. 49, n.2, p. 209-213, 2005.

YUR, F. ; BILDIK, A. ; BELGE, F. ; KILIÇALP, D. Serum, plasma and erythrocyte zinc levels in various animal species. **Vet. Far. Deg.**, v.13, n.1-2, p. 82-83, 2002.