

VÂNIA FREIRE LEMOS

**PROTEINOGRAMA DO SORO SANGUÍNEO E LÁCTEO DE OVELHAS DA
RAÇA SANTA INÊS EM DIFERENTES FASES DA LACTAÇÃO**

GARANHUNS

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE
RUMINANTES

VÂNIA FREIRE LEMOS

PROTEINOGRAMA DO SORO SANGUÍNEO E LÁCTEO DE OVELHAS DA
RAÇA SANTA INÊS EM DIFERENTES FASES DA LACTAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Orientadora: Dr^a Carla Lopes de Mendonça

GARANHUNS

2011

Ficha Catalográfica
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Setorial UFRPE/UAG

L556t Lemos, Vânia Freire
Proteinograma do soro sanguíneo e lácteo de ovelhas da raça Santa Inês em diferentes fases da lactação / Vânia Freire Lemos. _Garanhuns, 2011.

99f.

Orientadora: Carla Lopes de Mendonça
Dissertação (Curso de Mestrado em Sanidade e Reprodução de Ruminantes) – Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns. 2011.
Inclui e bibliografia

CDD: 636.3

1. Ovinos
 2. Ovelhas
 3. Pequenos Ruminantes
- I. Mendonça, Carla Lopes de
 - II. Título

DEDICO aos que torcem por mim, vibram e me auxiliam, especialmente ao meu esposo Ingo, meus pais: Manoel e Zilda, irmãos: Sirlene, Patrícia e Alysson, e aos amigos Francisco e Juliana, pelo incentivo apoio incondicional, acolhimento e força para continuar a caminhada.

AGRADECIMENTOS

Aos mestres, pois descobri que os melhores docentes não são aqueles que nos ensinam as respostas, mas sim aqueles que ensinam as perguntas. Talvez as respostas que aprendi se percam ao longo do tempo, talvez não me lembre da mais básica equação, porém esquecer quem nos ensinou a questionar, a duvidar, a pensar e a buscar é muito mais difícil.

Aos amigos da primeira turma de mestrado da PPGSRR Andréa Helena, Raquel, Nivan, Saulo de Tarso, Rafael, Daniel, Izildo, Antônio e Leopoldino pela oportunidade de convivência e aprendizado mútuo gerando amizade e coleguismo, permitindo retomar a euforia do tempo de estudante, sentindo que a alegria e o sonho resistem ao tempo e aos tropeços.

À Dra. Carla Lopes de Mendonça pela orientação e principalmente por acreditar em mim possibilitando a conclusão de mais uma etapa. Seu carinho, atenção, profissionalismo, ética e amizade foram além da relação cotidiana proporcionando aprendizagens que levarei por toda a vida.

A todos aqueles que compõem a Clínica de Bovinos de Garanhuns, ambiente de trabalho digno e ético estruturado por seus técnicos, funcionários e residentes, agradeço pelo apoio, carinho e suporte que sempre me acolheram.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), Campus Jaboticabal, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária e aos técnicos do Laboratório de Apoio à pesquisa Paulo César, Renata e Cláudia pelo auxílio e disponibilidade.

Ao Professor Dr. José Jurandir pela coorientação e profissionalismo.

Ao Prof. Pierre Castro Soares, do Departamento de Medicina Veterinária pelo delineamento estatístico.

Ao Prof. Gustavo Ferrer pela revisão gramatical do abstract.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (MCT CNPQ-Edital Universal – 14/2011) pelo auxílio financeiro.

Ao meu anjo da guarda que sempre olhou por mim guiando-me, auxiliando-me e torcendo pelo meu progresso.

Aos proprietários Sr. Jurandir Miranda, Ronaldo e Iranildo, que através da cessão dos seus animais e instalações, possibilitaram a realização deste trabalho, e aos seus

funcionários que foram de suma importância no manejo das ovelhas utilizadas neste experimento.

Ao Colega Eduardo Levi pelo seu apoio, presteza e ajuda nas atividades de campo.

Ao Programa de Pós Graduação em Sanidade de Reprodução de Ruminantes, seus coordenadores pelo apoio sempre presente.

A todos aqueles funcionários, tratadores, animais e colegas que participaram direta ou indiretamente deste trabalho, meu muito obrigada!!

RESUMO

Proteinograma do soro sanguíneo e lácteo de ovelhas da raça santa inês em diferentes fases da lactação. Objetivou-se neste trabalho avaliar a dinâmica do proteinograma do soro sanguíneo e lácteo de ovelhas da raça Santa Inês acompanhadas no período que antecedeu o parto e durante a lactação e comparar/quantificar as proteínas detectadas no traçado eletroforético do soro lácteo de glândulas mamárias sadias e infectadas em diferentes fases da lactação. Foram acompanhadas 34 ovelhas submetidas ao sistema de criação semi-intensivo, com mesmo manejo higiênico, sanitário e nutricional. Para a realização do proteinograma as ovelhas foram investigadas durante, aproximadamente 10 dias que precedeu o parto e 15, 30, 60 e 90 dias após o parto, momentos em que foi realizado o exame clínico da glândula mamária. O proteinograma sanguíneo foi efetuado a partir do momento pré parto e o proteinograma do soro lácteo nos momentos subseqüentes. Realizou-se o cultivo bacteriológico e a caracterização bioquímica das amostras de leite para confirmação de glândulas sadias e infectadas. A separação das frações protéicas foi realizada utilizando-se eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Para o soro sanguíneo observou-se a quantificação de nove proteínas observando influência significativa somente na IgG; no soro lácteo identificou-se oito proteínas havendo influência das fases de lactação na albumina, IgG e β - lactoglobulina. Comparando glândulas sadias e infectadas verificou-se que a haptoglobina, α -1 glicoproteína ácida, lactoferrina, albumina e as imunoglobulinas IgA e IgG presentes no soro lácteo atuam como biomarcadores de infecção na glândula mamária na espécie ovina.

Palavras-chave: Infecção intramamária, lactação, ovelhas, proteína sérica, proteína láctea, SDS-PAGE.

ABSTRACT

Blood serum Proteinogram and whey protein of Santa Ines sheep breed in different phases of lactation. The objective of this work was to evaluate dynamics of the proteinogram of blood serum and whey protein of Santa Ines sheep breed following the antipartum period and during lactation, and to compare/to quantify proteins detected at eletrophoresis of the whey protein from healthy and infectious mammary glands in different phases of lactation. Thirty four sheeps submitted to half-intensive system with same sanitary and nutritional management has been followed. For accomplishment of proteinogram of the sheep, they had been investigated during approximately 10 days from antipartum and 15, 30, 60 and 90 days postpartum, moments where clinical examination of mammary gland was carried through. Blood serum was evaluated at antipartum moment and proteinogram of whey protein at subsequent moments. Bacteriological culture and biochemist characterization of milk samples for confirmation of healthy and infected glands was performed. Separation of protein fractions was carried through using sodium dodecil sulphate polyacrylamide gel eletrophoresis (SDS-PAGE). For the blood serum it was observed quantification of nine proteins with significant influence in IgG. At whey protein, influence of the phases of lactation was identified eigth proteins, having albumin, IgG and β - lactoglobulin.. Comparing healthy and infected glands it was verified that hatptoglobin and α -1 acid glycoprotein, lactoferrin, albumin and immunoglobulins IgA and IgG in whey protein act as potentials biomarkers of infection in mammary gland of ovine species.

Key-words: blood serum, intramamary infection, lactation, ewes, serum protein, whey protein, SDS-PAGE.

LISTA DE FIGURAS

Artigo 1

- Fig. 1.** Valores médios da concentração da proteína total (g/dL) e da albumina (mg/dL) obtidos por SDS-PAGE em ovelhas Santa Inês no momento antes do parto (AP) e após o parto (PP) em diferentes estágios de lactação..... **64**
- Fig. 2.** Valores médios da concentração da haptoglobina (mg/dL) e da ceruloplasmina (mg/dL) obtidos por SDS-PAGE em ovelhas Santa Inês no momento antes do parto (AP) e após o parto (PP) em diferentes estágios de lactação..... **65**
- Fig. 3.** Valores médios da concentração da alfa 1 glicoproteína ácida (mg/dL) e da transferrina (mg/dL) obtidos por SDS-PAGE em ovelhas Santa Inês no momento antes do parto (AP) e após o parto (PP) em diferentes fases de lactação..... **65**
- Fig. 4.** Valores médios da concentração da imunoglobulina A (IgA) (mg/dL) obtidos por SDS-PAGE em ovelhas Santa Inês no momento antes do parto (AP) e após o parto (PP) em diferentes fases de lactação..... **65**
- Fig. 5.** Valores médios da concentração da imunoglobulina G (IgG) de cadeia pesada (IgG CP) (mg/dL) e IgG de cadeia leve (IgG CL) (mg/dL) obtidos por SDS-PAGE em ovelhas Santa Inês no momento antes do parto (AP) e após o parto (PP) em diferentes fases de lactação..... **66**
- Fig. 6.** Coeficiente de determinação (R²) e equações de regressão da concentração da IgG de cadeia pesada (IgG CP) (mg/dL) e IgG Total (mg/dL) obtidos por SDS-PAGE em ovelhas Santa Inês ao longo dos momentos de avaliação..... **66**

Artigo 2

- Fig. 1.** Valores médios da concentração da proteína total (g/dL) e da albumina (mg/dL), obtidos por SDS-PAGE, no soro lácteo de glândulas mamárias sadias de ovelhas Santa Inês em diferentes fases de lactação..... 76
- Fig. 2.** Valores médios da concentração da imunoglobulina IgA e IgG CL (mg/dL), obtidos por SDS-PAGE, no soro lácteo de glândulas mamárias sadias, de ovelhas Santa Inês em diferentes fases de lactação..... 76
- Fig. 3.** Valores médios da concentração da IgG CP (mg/dL) e IgG Total (mg/dL), obtidos por SDS-PAGE, no soro lácteo de glândulas mamárias sadias, de ovelhas Santa Inês em diferentes fases de lactação..... 77
- Fig. 4.** Valores médios da concentração de lactoferrina (mg/dL), obtidos por SDS-PAGE, no soro lácteo de glândulas mamárias sadias de ovelhas Santa Inês em diferentes fases de lactação..... 77
- Fig. 5.** Valores médios da concentração das proteínas de PM 15.000 Da (mg/dL) e PM. 29.000 Da (mg/dL), obtidos por SDS-PAGE, no soro lácteo de glândulas mamárias sadias de ovelhas Santa Inês em diferentes fases de lactação..... 78
- Fig. 6.** Valores médios da concentração da β -lactoglobulina (mg/dL) e α -lactalbumina (mg/dL), obtidos por SDS-PAGE, no soro lácteo de glândulas mamárias sadias de ovelhas Santa Inês em diferentes fases de lactação..... 78

Artigo 3

- Fig. 1.** Valores médios da concentração da proteína total (g/dL) do soro lácteo de glândulas mamárias sadias e infectadas de ovelhas Santa Inês durante a lactação..... **89**
- Fig. 2.** Valores médios da concentração da albumina (mg/dL) do soro lácteo de glândulas mamárias sadias e infectadas de ovelhas Santa Inês durante a lactação..... **89**
- Fig. 3.** Valores médios da concentração de IgG total (mg/dL), IgG de cadeia pesada (mg/dL) e IgG de cadeia leve (mg/dL) do soro lácteo de glândulas mamárias sadias e infectadas de ovelhas Santa Inês durante a lactação..... **89**
- Fig. 4.** Valores médios da concentração de lactoferrina (mg/dL), obtidos por SDS-PAGE, no soro lácteo de glândulas mamárias sadias de ovelhas Santa Inês em diferentes fases de lactação..... **90**
- Fig. 5.** Valores médios da concentração de concentração α - lactoalbumina (mg/dL) do soro lácteo de glândulas mamárias sadias e infectadas de ovelhas Santa Inês durante a lactação..... **90**
- Fig. 6.** Valores médios da concentração de concentração β lactoglobulina (mg/dL) do soro lácteo de glândulas mamárias sadias e infectadas de ovelhas Santa Inês durante a lactação..... **90**
- Fig. 7.** Valores médios da concentração da proteína de PM 15.000 Da (mg/dL) do soro lácteo de glândulas mamárias sadias e infectadas de ovelhas Santa Inês durante a lactação..... **91**
- Fig. 8.** Valores médios da concentração da proteína de PM 29.000 Da (mg/dL) do soro lácteo de glândulas mamárias sadias e infectadas de ovelhas Santa Inês durante a lactação..... **91**

Fig.9. Valores médios da concentração da proteína haptoglobina e α 1 glicoproteína ácida (mg/dL) do soro lácteo de glândulas mamárias sadias e infectadas de ovelhas Santa Inês durante a lactação..... **91**

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	14
2- OBJETIVOS.....	16
2.1 Geral.....	16
2.2 Específicos.....	16
3- REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3.1 MASTITE OVINA.....	17
3.2 PROTEINOGRAMA DO SORO SANGUÍNEO.....	20
3.2.1 Proteínas de fase aguda.....	20
3.2.1.1 Proteínas de fase aguda positiva.....	23
3.2.1.2 Proteínas de fase aguda negativa.....	27
3.2.2 Imunoglobulinas.....	28
3.3 PROTEINOGRAMA DO SORO LÁCTEO.....	30
3.4 ELETROFORESE DAS PROTEÍNAS DO SORO.....	37
3.4.1- Soro Sanguíneo.....	37
3.4.2- Soro Lácteo.....	38
4- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
5- ARTIGOS CIENTÍFICOS	55
Artigo - 1 Proteinograma do soro sanguíneo de ovelhas da raça Santa Inês em diferentes estágios da lactação.....	55
Artigo - 2 Proteinograma do soro lácteo de ovelhas da raça Santa Inês em diferentes fases de lactação.....	67
Artigo - 3 Proteinograma do soro lácteo de ovelhas Sadias e infectadas em diferentes fases de lactação.....	79
6- CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	92
7- ANEXOS.....	93

PROTEINOGRAMA DO SORO SANGUÍNEO E LÁCTEO DE OVELHAS DA RAÇA SANTA INÊS EM DIFERENTES FASES DA LACTAÇÃO

1-INTRODUÇÃO

O efetivo de rebanho ovino brasileiro em 2010 foi de 17,4 milhões de cabeças, apresentando crescimento de 3,4% comparado ao ano de 2009. Em relação à sua distribuição, mais da metade de toda a população de ovinos do Brasil encontra-se na região Nordeste, 56,7% correspondendo à 9.865.800 cabeças (IBGE/PPM, 2011).

As características geográficas do Nordeste brasileiro lhe caracterizam como uma região com vocação 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).

Dentre as raças ovinas a Santa Inês vem se destacando sobre as demais, por ser considerada rústica, resistente às condições áridas, aos parasitas, ter 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. Nas 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 (OLIVEIRA, 2006; PEIXOTO et al., 2010).

Em ovinos a mastite é considerada uma das enfermidades de grande impacto econômico, sendo responsável por prejuízos significativos causando a morte de cordeiros por inanição, descarte precoce de ovelhas e, ocasionalmente, a morte de animais (KIRK e GLENN, 1996; RADOSTITS et al., 2007). A presença da mastite nos rebanhos representa elevação de custos para o produtor, bem como pode resultar em problemas sérios inerentes ao bem-estar animal e segurança alimentar. A existência de ferramentas de diagnóstico 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 recentes em animais domésticos têm levado à identificação de várias proteínas denominadas proteínas de fase aguda (PFA). A síntese dessas proteínas é estabelecida geneticamente, explicando a variabilidade entre as espécies, que são refletidas no padrão fisiológico do perfil eletroforético das proteínas séricas. A produção de PFA é mediada pela ação das citocinas pro-inflamatórias como a interleucina -1, interleucina - 6 e fator de necrose tumoral, liberadas frente ao estímulo inflamatório (KANEKO et al., 1997).

A quantificação das PFAs 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 et al., 2001).

As PFAs produzidas pelos hepatócitos estão presentes em diferentes concentrações no sangue e podem sofrer mudanças consideradas. Podem ser classificadas de acordo com a magnitude de seu aumento em proteínas de fase aguda positiva (como a haptoglobina, ceruloplasmina, proteína C reativa e fibrinogênio plasmático) ou proteínas de fase aguda negativas (quando estão diminuídas como a albumina e transferrina) (PETERSEN et al., 2004; ECKERSALL, 2007; COSTA et al., 2010). As funções das PFAs são variadas, mas geralmente relaciona-se à defesa do animal, ao dano patológico e à restauração da homeostase (ECKERSALL, 2008).

As informações quanto à dinâmica do processo inflamatório da glândula mamária nas diferentes fases de lactação de ovelhas Santa Inês, relacionando glândulas infectadas e sadias, bem como o perfil protéico presentes no soro sanguíneo antes e após o parto (período do parto e lactação) e no soro lácteo durante a lactação são escassas na literatura. A identificação de biomarcadores poderá ser uma ferramenta de diagnóstico importante na detecção da mastite e os indicadores fisiológicos servem como parâmetros de comparação entre animal sadio e infectado. Resultados de pesquisas sugerem que no futuro, ensaios para mensuração de proteínas de fase aguda 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).

2-OBJETIVOS

2.1) Geral:

Avaliar a dinâmica do proteinograma dos soros sanguíneo e lácteo de ovelhas da raça Santa Inês, acompanhadas no período que antecedeu o parto e durante a lactação.

2.2) Específicos:

a) Identificar no decorrer da lactação as glândulas mamárias híginas e glândulas mamárias com mastite subclínica;

b) Identificar e quantificar as proteínas presentes no soro sanguíneo das ovelhas no período que antecede o parto e durante a lactação;

c) Identificar e quantificar as proteínas presentes no soro lácteo de glândulas mamárias sadias em diferentes fases da lactação;

d) Comparar/quantificar as proteínas detectadas no traçado eletroforético do soro lácteo de glândulas mamárias sadias e infectadas durante a lactação.

3-REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Mastite ovina

A mastite é caracterizada por uma inflamação do parênquima da glândula mamária, causada por agentes infecciosos, e não infecciosos, resultando em alterações químicas e físicas no leite e alterações patológicas no tecido glandular. É uma doença complexa com variações nas causas, intensidade, curso e conseqüência. A porta de entrada da infecção na glândula mamária é geralmente o canal do teto e, após a chegada do agente infeccioso na glândula ocorre a multiplicação, causando reação inflamatória (SCHALM et al., 1971; RADOSTITS, 2007).

A ocorrência da mastite está vinculada à interação animal, agente etiológico e meio ambiente. Os fatores que influenciam na susceptibilidade à mastite incluem: resistência natural da glândula mamária, estágio da lactação, hereditariedade, idade do animal, espécie, infectividade e patogenicidade do agente (PRESTES, 2002; OLIVEIRA, 2007).

Em pequenos ruminantes, tal como em bovinos, as infecções intramamárias se apresentam de acordo com a intensidade do processo inflamatório, sob forma clínica, com sintomas facilmente detectáveis, ou sob forma subclínica, que frequentemente passa despercebida aos produtores rurais. Estes processos são sempre responsáveis por diminuição na produção de leite em ovinos (GONZALO et al., 2002; PEIXOTO, 2010). Segundo Menzies (2000), a mastite clínica se caracteriza por alterações palpáveis na consistência da glândula mamária, apresentando endurecimento do tecido, fibrose, abscesso, aumento do tamanho da glândula e alterações na secreção láctea. A mastite subclínica é uma inflamação não detectada clinicamente, mas que compromete a produção de leite (RADOSTITS, 2007).

Menzies e Ramannon (2001) destacam ainda como fatores predisponentes para a ocorrência da mastite ovina, os traumas associados ao tamanho do borrego, a conformação do úbere podendo levar ao acúmulo de leite nas glândulas mamárias, o número de crias e idade das ovelhas, pois ovelhas mais velhas são mais predispostas à mastite. Quanto aos sistemas de manejo e ordenha as ovelhas ordenhadas manualmente tem índices de mastite subclínica mais altos, o mesmo se verifica para a superlotação em sistemas de criação intensivos.

Observa-se que a frequência da mastite é maior nos casos em que a ovelha produz somente um borrego, quando o parto é duplo ou triplo o consumo de leite aumenta, favorecendo o melhor funcionamento das glândulas mamárias (OLIVEIRA, 2000).

Algumas formas de mastite têm impacto significativo sobre as ovelhas, podendo levar a perda total da glândula mamária e em algumas vezes a morte da mesma e/ou do borrego, enquanto que outras formas alteram a produção e os componentes do leite e, algumas influenciam no desenvolvimento dos animais lactentes, acarretando sérias perdas ao criador (WATSON e BUSWELL, 1984; VAZ, 1996; MENZIES e RAMANOON, 2001; WINTER, 2001; OLIVEIRA et al., 2007; SANTOS et al., 2007; ALMEIDA, 2008).

A mastite é uma doença importante nos ovinos, os casos clínicos são geralmente severos com presença de sinais sistêmicos. Frequentemente a glândula comprometida apresenta perda de função parcial ou total; uma ovelha com mastite diminui a produção em cerca de 37%, reduzindo desta forma o ganho de peso dos borregos e aumentando a mortalidade dos mesmos (FTHENAKIS e JONES, 1990; LANGONI et al., 1999; MENZIES e RAMANOON, 2001).

Em ovelhas da raça Santa Inês, acredita-se que a pré-disposição para a ocorrência da mastite esteja relacionada à boa produção de leite principalmente no período das chuvas, quando há maior oferta de alimento e conseqüentemente um aumento na produção de leite, pois apesar de ser uma raça de corte, na sua origem está a raça Bergamácia com aptidão leiteira (OLIVEIRA, 2000; FERREIRA et al., 2007), aliada ao fato de apresentarem longo período de lactação, o que favorece a ocorrência de mastite, pois, após desmame o úbere pode permanecer com leite residual, havendo a possibilidade de crescimento bacteriano (JONES e LANYON, 1990; MELO et al., 2008).

Contreras et al. (2007) encontraram uma diversidade de agentes etiológicos que podem causar a mastite em ovelhas, evidenciando que os *Staphylococcus* spp. são diagnosticados com maior frequência como patógenos responsáveis pela infecção intramamária. *Staphylococcus aureus* tem sido relatado como o agente causal mais comum da mastite clínica em ovelhas leiteiras (MORK et al., 2007; PEIXOTO et al., 2010).

A prevalência da mastite do tipo subclínica é a mais predominante em ovelhas, sendo estimada entre 5% a 30%, podendo ser ainda maior. Em contrapartida, a incidência de mastite clínica apresenta-se em níveis abaixo de 5%, podendo alcançar maiores taxas em determinadas situações (CONTRERAS et al., 2007). Na região do agreste de

Pernambuco, Oliveira et al. (2007) relataram ocorrência de 15,5% de mastite clínica, tendo o *Staphylococcus aureus* como principal patógeno causador, enquanto que Almeida et al. (2008) relataram 29,51% de mastite subclínica com predominância de *Staphylococcus* coagulase negativo em ovelhas da raça Santa Inês.

As infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* necessitam de especial atenção devido ao fato deste agente causar a forma mais agressiva da mastite clínica, a mastite gangrenosa e também a mastite subclínica. O *Staphylococcus aureus* produz toxinas específicas, causando lesões graves na mama, como a α -toxina que provoca necrose nos alvéolos (PENGOV, 2001; ARIZNABARRETA et al., 2002; CONTRERAS et al., 2007; SANTOS et al., 2007).

Na mastite subclínica normalmente não se observa alterações no úbere e na secreção láctea, porém observa-se diminuição na produção de leite, alterações na composição físico-química, aumento do número de células somáticas e isolamento de microrganismos, representando perda de produtividade dos rebanhos e comprometendo a alimentação dos borregos (NACCARI et al., 2003; ANDERSON et al., 2005; SANTOS et al., 2007).

A mastite subclínica geralmente é precursora da mastite clínica causada pelo mesmo agente etiológico, sendo uma das razões mais frequentes do descarte de matrizes nos rebanhos ovinos, comprometendo assim a produtividade dos rebanhos (MENZIES, 2000; OLIVEIRA, 2006).

Segundo Vaz (1996) a mastite em ovinos é mais frequente no período de lactação entre a terceira e quarta semanas após o parto, período que coincide com o pico de produção de leite, embora a enfermidade possa ocorrer em qualquer fase de lactação.

A presença de doenças nos rebanhos onera significativamente os produtores e gera sérios problemas ao bem estar animal, preocupação esta concomitante com as técnicas de produção analisando não somente a saúde animal, mas o bem-estar e a segurança alimentar em conjunto. Ferramentas para a vigilância do estado de higiene do rebanho pode se tornar um componente bastante útil em programas de sanidade, necessitando assim de se identificar novos indicadores de saúde e doença (GANHEIN et al., 2007).

O diagnóstico da mastite em ovelhas está fundamentado no exame clínico, contagem de células somáticas e análise bacteriológica do leite, quanto mais rápido e seguro for o diagnóstico mais rápido será o tratamento e menor o tempo de recuperação.

Com a implantação de sistemas de mecanização de produção, a demanda por marcadores rápidos e precisos tem aumentado significativamente, desta forma tem-se sugerido que as proteínas de fase aguda seriam indicadores confiáveis de um processo inflamatório na glândula mamária (HIRVONEN et al., 1996; ECKERSAL et al., 2001).

3.2 Proteínas do soro sanguíneo

3.2.1 Proteínas de fase aguda

As proteínas são os componentes mais abundantes do plasma, sendo constituídas por aminoácidos essenciais. As funções das proteínas são inúmeras, entre elas a formação básica da estrutura de células de órgãos e tecidos, a manutenção da pressão colóido osmótica, catalizadores de reações bioquímicas e no equilíbrio ácido-básico, participação no processo de coagulação sanguínea, realizam o transporte de metabólitos e participam da defesa do organismo frente à patógenos (JAIN, 1993; ECKERSALL, 2008).

A concentração das proteínas plasmáticas depende do estado nutricional, do balanço hídrico, do balanço hormonal e outros fatores que estão diretamente envolvidos na condição de saúde. A meia vida das proteínas plasmáticas correlaciona-se com a espécie animal e os estados fisiológicos como prenhez, parição e lactação alteram as suas concentrações (JAIN, 1993).

A resposta de fase aguda é uma reação não específica do sistema imunológico inato, observado em todas as espécies animais, é um complexo sistema de defesa frente ao início do processo seja ele traumático, infeccioso, inflamatório e neoplásico. Sua atuação ocorre como centro da resposta imune inata envolvendo barreiras físicas e moleculares, prevenindo a infecção produzida por potenciais patógenos que possam iniciar processos inflamatórios, e contribuir para a resolução e o processo de cicatrização. As proteínas de fase aguda são parte integrante da resposta de fase aguda, sua síntese ocorre principalmente no fígado e sua aplicação é utilizada no diagnóstico, prognóstico, avaliação da saúde e bem estar animal (MOSHAGE, 1997; MURATA et al., 2004; PETERSEN et al., 2004; CERON et al., 2005; MURATA, 2007; CRAY et al., 2009).

A síntese proteica das proteínas de fase aguda é estabelecida geneticamente, o que explica a variabilidade entre espécies e indivíduos, que é refletida no perfil eletroforético das proteínas séricas em situação fisiológica (KANEKO et al., 1997).

Como resposta aos desafios externos ou internos, as proteínas de fase aguda podem apresentar um aumento ou diminuição nas suas concentrações séricas, sendo classificadas em "proteínas de fase aguda positivas" e "proteínas de fase aguda negativas" respectivamente. As proteínas de fase aguda negativas incluem albumina, a proteína mais abundante do plasma, e a transferrina. As proteínas de fase aguda positivas incluem haptoglobina, proteína C-reativa, amilóide sérica A, ceruloplasmina, α 1-glicoproteína ácida e fibrinogênio. As proteínas de fase aguda são glicoproteínas sintetizadas principalmente pelos hepatócitos estimulados pelas citocinas pró-inflamatórias, interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina-1 β (IL-1 β) e liberados na corrente sanguínea. A síntese de proteína de fase aguda extra-hepática também é verificada na maioria das espécies de mamíferos (MURATA et al., 2004; PETERSEN et al., 2004; CERON et al., 2005).

Segundo Eckersall et al. (2010) as proteínas de fase aguda podem alterar as suas concentrações séricas em valores superiores a 25% como resposta ao estímulo das citocinas pró-inflamatórias liberadas durante o processo inflamatório, sendo reconhecidas como biomarcadores da doença, auxiliando no diagnóstico, prognóstico e no monitoramento da resposta ao tratamento estabelecido e ainda no rastreamento da higidez. De uma maneira geral, as proteínas de fase aguda apresentam respostas classificadas em 'maior', 'moderada' ou 'menor' intensidade de acordo com a magnitude da resposta ao desafio. A resposta 'maior' tem uma baixa concentração sérica ($<1 \mu\text{g/L}$) em animais saudáveis, que aumenta drasticamente em 100 a 1000 vezes na estimulação, atingindo um pico máximo entre 24 a 48h e depois declinando rapidamente durante a fase de recuperação, respostas moderadas tem aumento de cinco a dez vezes na ativação, após pico de dois a três dias diminuindo mais lentamente e as respostas menores apresentam aumento entre 50% e 100% do seu valor normal. Estes biomarcadores são altamente sensíveis indicando inflamação, alguns pesquisadores estabeleceram várias análises quantitativas das proteínas de fase aguda, mas a síntese e a liberação das proteínas de fase aguda se processam de maneira diferente entre as espécies (PETERSEN et al., 2004; CERON et al., 2005; ECKERSALL, 2008).

A reação de fase aguda poderá resultar em mudanças de mais de 200 tipos de proteínas de fase aguda, sejam elas positivas ou negativas. Em quase todas as espécies animais, albumina é a proteína de fase aguda com maiores impactos, ocorrendo uma

diminuição na sua concentração sérica, isto devido principalmente as alterações da função renal ou gastrointestinal, ou ainda, diminuição na síntese hepática permitindo que os aminoácidos sejam utilizados para gerar outras proteínas de fase aguda, que atuarão no processo inflamatório (KANEKO et al., 1997). Algumas proteínas de fase aguda tem seu aumento acentuado nas primeiras 48h após o evento desencadeante e muitas vezes têm um rápido declínio devido à sua meia vida muito curta, enquanto que proteínas moderadas e menores apresentam uma resposta mais lenta e mais prolongada podendo ser observada com mais frequência durante processos inflamatórios crônicos. Em vacas e ovelhas a haptoglobina e amilóide sérica A são consideradas PFAs maiores (> 10 x aumento) e alfa-1 glicoproteína ácida, proteína C reativa e fibrinogênio PFA moderada (1 a 10 x aumento) em vacas e, alfa-1 glicoproteína ácida e proteína C reativa são classificadas como moderadas em ovelhas (PETERSEN et al., 2004; CERON et al., 2005; CRAY et al., 2009).

Os ruminantes apresentam reação de fase aguda diferentes das outras espécies, sendo a haptoglobina a proteína de fase aguda mais significativa, em vacas saudáveis sua concentração sérica é < 20 mg/L, enquanto que em dois dias pós infecção pode elevar-se para valores superiores a > 2 g/L, tendo seu uso como biomarcador para diagnóstico e prognóstico de mastite, enterite, peritonite, pneumonia, endocardite e endometrite (MURATA et al., 2004; PETERSEN et al., 2004; ECKERSALL et al., 2010).

A utilização das proteínas de fase aguda pode fornecer informações objetivas sobre a extensão das lesões em curso, individualmente ou no rebanho, estas proteínas poderão ser utilizadas para determinar onde a propagação da doença está ocorrendo (faixa etária, parte do sistema de produção), fornecendo informações sobre a prevalência de curso clínico e infecções subclínicas, indicado por alterações na concentração sérica das proteínas de fase aguda selecionadas. Esses biomarcadores podem ainda, atuar como ferramenta de prognóstico, com a magnitude e a duração da resposta de fase aguda refletindo a gravidade da infecção. No entanto, alguns pontos a se considerar antes de utilizar as proteínas de fase aguda como marcadores objetivos e não-específicos da saúde animal são a possível influência de fatores ambientais, manuseio e outros tipos de estresse na ausência de doença (PETERSEN et al., 2004; BRAUN et al., 2010).

3.2.1.1 Proteínas de fase aguda positiva

a) Haptoglobina

A haptoglobina é uma α -globulina com várias funções biológicas, entre elas a ligação com a hemoglobina, estimulação da angiogênese, regulação do metabolismo lipídico e efeito imunomodulador, mas sua principal função é evitar a perda de ferro promovendo ação bacteriostática por meio do complexo hemoglobina-haptoglobina, restringindo a disponibilidade de ferro necessário para o crescimento bacteriano (PETERSEN et al., 2004; ECKERSALL, 2008).

A haptoglobina é uma das proteínas de fase aguda mais estudadas em animais de produção; em ruminantes sadios os níveis de concentração sérica geralmente são muito baixos ou insignificantes, no entanto aumentam mais de 100 vezes na estimulação ao desafio antigênico. Muitos estudos têm evidenciado a importância da haptoglobina como um parâmetro clínico útil para mensurar a ocorrência e gravidade das reações inflamatórias em animais com mastite, pneumonia, enterite, peritonite, endocardite, abscessos, endometrite e outras infecções naturais ou experimentais (MURATA et al., 2004; PETERSEN et al., 2004).

A concentração da haptoglobina corresponde à extensão da injúria tissular provocada pelo processo inflamatório agudo; quando esta injúria é severa sua concentração aumenta rapidamente, usualmente um pouco antes da elevação do fibrinogênio plasmático (COLE et al., 1997). Em vacas com mastite sugere-se correlação direta entre a severidade do dano ao tecido mamário, que inicia uma série de eventos liberando as citocinas pró-inflamatórias pelos hepatócitos e o aumento da haptoglobina (PACHAURI, 2002).

Conner e Eckersall (1986) relataram que os níveis plasmáticos de haptoglobina, ceruloplasmina e α -1 anti tripsina foram mais elevados nas vacas com mastite quando comparadas as vacas sadias, sugerindo que entre as proteínas de fase aguda de bovinos, que podem detectar atividade biológica, a haptoglobina seria a mais usual e, que a avaliação da cronicidade e severidade da doença usando as proteínas de fase aguda poderia fornecer ajuda valiosa no diagnóstico e prognóstico inicial da mastite. Ademais se demonstrou que em animais com mastite clínica e suclínica, as concentrações de haptoglobina elevaram-se indicando que a resposta de fase aguda ocorreu e, que esta proteína de fase aguda tem potencial de diagnóstico nestes casos (ECKERSALL et al.,

2001). GRONLUND et al. (2005), observou elevação na concentração de haptoglobina e amilóide sérica A no leite de vacas acometidas com mastite clínica e subclínica, após infecção induzida experimentalmente por *Staphylococcus aureus*

Em vacas com mastite clínica verificou-se alta correlação entre as concentrações de haptoglobina no soro sanguíneo e lácteo (ECKERSALL et al., 2001). Aumentos de haptoglobina e amilóide sérica A foram encontrados no soro e no leite de vacas com mastite havendo alta correlação significativa entre a haptoglobina no soro sanguíneo e no leite, indicando um alto potencial desta fração protéica como biomarcador de mastites clínicas e subclínicas (GONZÁLEZ et al., 2007). Colla et al. (2009) evidenciaram relação significativa entre a contagem de células somáticas e a haptoglobina como ferramenta no diagnóstico de mastite subclínica ou na avaliação da qualidade do leite.

A haptoglobina foi reportada como um importante indicador diagnóstico da inflamação aguda de bovinos e ovinos, sendo recomendada para uso na rotina clínica. Skinner e Roberts (1994) identificaram esta proteína como indicador de infecção bacteriana aguda em ovelhas, onde a haptoglobina foi 34% mais sensível que a contagem de leucócitos e 25% mais sensível que a contagem de neutrófilos, sendo que valores menores de 20 mg/dL são considerados ausência de infecção ou inflamação em ovelhas. Costa et al. (2010) verificaram, em ovelhas com mastite experimental, elevação no teor sérico da haptoglobina relatando aumento na sua concentração de 14 vezes durante as primeiras 24 horas quando comparados ao momento controle.

b) α -1 Glicoproteína ácida

A α -1-glicoproteína ácida é uma glicoproteína (mucoproteína ou seromucoíde) sintetizada principalmente pelos hepatócitos, seu peso molecular é representado por 45% de carboidratos e se apresenta muito ácida, pH 3,5 sendo uma proteína estável (FOURNIER et al., 2000). A síntese local da α -1-glicoproteína ácida pode contribuir para a manutenção da homeostase, reduzindo o dano tecidual associado ao processo inflamatório em curso, em tipos de células extra-hepáticas como as epiteliais e células endoteliais. A α -1-glicoproteína ácida apresenta duas grandes funções fisiológicas, realizar o transporte de drogas e imunomodulação. A α -1-glicoproteína ácida juntamente com a albumina e as lipoproteínas pertencem ao grupo das proteínas mais importantes no plasma, podendo se ligar a mais de 300 tipos de moléculas e drogas. Como a albumina, a α -1-glicoproteína

ácida se liga e transporta substâncias de origem endógena ou exógena como a heparina, histamina, serotonina e corticóides. Esta capacidade pode ajudar a manter a ligação e o transporte de drogas comprometidas em respostas de fase aguda, em que a albumina, uma proteína de fase aguda negativa, diminui sua concentração (FOURNIER et al., 2000). A fagocitose, a ativação do neutrófilo e a agregação das plaquetas são inibidas pela α -1-glicoproteína ácida, atuando ainda na maturação dos linfócitos T e B (ISRAILI e DAYTON, 2001). O mecanismo de síntese desta proteína de fase aguda ainda é desconhecido, mas o seu aumento pode estar envolvido na síntese pelos hepatócitos em resposta às citocinas (IL-1 e TNF- α) secretadas pela ativação de macrófagos (JAIN, 1993). A expressão gênica da α -1-glicoproteína ácida é controlada por uma combinação da regulamentação dos seus principais mediadores, ou seja, glicocorticóides e uma rede de citocinas, envolvendo principalmente a interleucina-1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6). A α -1-glicoproteína ácida é um agente antiinflamatório natural, na medida em que inibe a ativação de neutrófilos e aumenta a secreção de IL-1 antagonista do receptor de macrófagos (FOURNIER et al., 2000; HOICHEPIED et al., 2003).

A α -1-glicoproteína ácida é uma importante proteína de fase aguda na clínica de ovinos, sendo utilizada no monitoramento de processos inflamatórios e infecções em geral (ECKERSALL et al., 2001). Em estudo com ovinos infectados experimentalmente com linfadenite caseosa, elevações nas concentrações de haptoglobina e amilóide sérica A, foram observadas, apresentando pico na primeira semana, no entanto verificou-se um leve e persistente elevação da concentração desta proteína ainda após quatro semanas de infecção (ECKERSALL, 2010). Horadagoda et al. (1999) verificaram que a α -1-glicoproteína ácida foi encontrada em alta concentração em 89% dos casos agudos e 72% dos casos crônicos.

Na maioria das espécies animais, a α -1-glicoproteína ácida é uma proteína de fase aguda moderada, aumentando seus níveis mais lentamente, porém permanecendo elevado por muito mais tempo que outras proteínas de fase aguda como a haptoglobina e amilóide sérica A nos bovinos. Isto poderia ser vantajoso no diagnóstico, pois sendo a α -1-glicoproteína ácida uma proteína com um perfil de fase aguda, forneceria a informação de quais circunstâncias e como os processos inflamatórios evoluem da forma aguda para crônica (ECKERSALL, 2008).

c) Ceruloplasmina

A ceruloplasmina transporta 90% do cobre plasmático e o armazena no fígado e outros tecidos; cada molécula é capaz de ligar-se a seis ou oito átomos de cobre (Cu^{3+}), tendo grande importância na homeostase deste mineral e na mobilização do ferro. Em humanos sua síntese se eleva em condições de inflamação bacteriana aguda, viral e parasitária, podendo estar elevada em casos de leucemia, tumores sólidos e cirrose biliar enquanto que sua diminuição é verificada no nascimento e nos casos de desnutrição, má absorção, nefrose e intoxicação por cobre (JAIN, 1993).

A ceruloplasmina é uma ferroxidase, que influencia na oxidação do ferro ferroso tóxico para a sua forma férrica não tóxica (PATEL et al., 2002), protegendo os tecidos das lesões provocadas pelos radicais livres ferro-mediados e está envolvida em diversas atividades antioxidantes e citoprotetoras, sendo sintetizada principalmente pelo fígado, podendo também ser induzida em outros sítios extra-hepáticos (JAIN, 1993). A ceruloplasmina pode atuar como um agente anti-inflamatório (reduzindo o número de neutrófilos marginais) agindo como um “limpador” de peróxido extracelular (SEGELMARK et al., 1997).

Segundo Eckersall (2008) a ceruloplasmina é classificada como uma proteína de fase aguda moderada, apresentando leve variação em seus níveis nos casos de infecção. A utilização da ceruloplasmina como biomarcador diagnóstico permanece menos comum que as outras proteínas de fase aguda, no entanto, tem sido demonstrado que esta proteína de fase aguda é um indicador de infecção em bovinos e ovinos (PFEFFER e ROGERS, 1989; SEGELMARK et al., 1997; COSTA et al., 2010).

Os níveis de ceruloplasmina se mantiveram elevados após 24h de infecção experimental por *Staphylococcus aureus* em ovelhas, coincidindo com o quadro clínico de mastite, apresentando concentrações séricas seis vezes superior ao momento controle, ressaltando seu emprego como biomarcador precoce nos casos de mastite em ovelhas (COSTA et al., 2010).

Conner et al. (1986) detectaram diferenças nos níveis de ceruloplasmina, α -1 antitripsina e haptoglobina em amostras de soro de vacas com mastite, confirmando a resposta de fase aguda na mastite bovina.

3.2.1.2 Proteínas de fase aguda negativa

a) Albumina

A albumina é a proteína mais abundante no plasma, representa de 50% a 65% do total das proteínas séricas, devido ao seu grande tamanho normalmente fica retida pelos capilares, sendo a primeira proteína a ser perdida a partir do sangue durante as injúrias tissulares. As principais funções da albumina são a regulação e manutenção da pressão colóido-osmótica do plasma e transporte de ácidos graxos livres, ácidos biliares, bilirrubina, histamina, porfirinas, drogas, barbitúricos e microelementos como o cálcio, cobre e zinco (JAIN, 1993).

É sintetizada e secretada pelos hepatócitos, sua síntese é controlada pela pressão colóido-osmótica, mas pode ser influenciada pelo estresse, condição geral do fígado, concentração extravascular da albumina, estado de nutrição e por hormônios como a tiroxina, insulina e cortisol. O catabolismo da albumina ocorre em vários tecidos, sendo o tecido muscular, o fígado, e os rins os sítios principais de degradação pela ação da protease. Fatores como a gestação, lactação e idade podem alterar os níveis das proteínas; na gestação das ovelhas a concentração de albumina pode diminuir na fase intermediária, retornando aos valores de normalidade na fase final (ECKERSALL, 2008).

A albumina é uma proteína de fase aguda negativa, diminui sua concentração em mais de 25% durante a resposta de fase aguda frente à doença infecciosa, processos inflamatórios, ou traumas, sendo regulada pelas interleucinas 1 (IL- 1) e outras citocinas (JAIN, 1993; MAZZAFERRO et al., 2002). As doenças bacterianas, virais, protozoárias e helmínticas podem causar diminuição na concentração sérica da albumina (CONTRERAS, 2000; ECKERSALL, 2008). Sua meia vida em bovinos é de 16,5 dias e em ovinos é de 14,28 dias, sendo que esta taxa de catabolismo está em equilíbrio com a taxa de síntese pelos hepatócitos (ECKERSALL, 2008). Contribui com 80% da osmoralidade do plasma sanguíneo, constituindo também importante reserva protéica. A desnaturação da albumina no local da inflamação pode ocorrer devido a mudanças na temperatura e no pH, resultando na liberação de aminoácidos que podem ser utilizados na reparação tecidual (MAZZAFERRO et al., 2002).

A diminuição da síntese de albumina ocorre nos processos inflamatórios sistêmicos devido à produção prioritária de proteínas de fase aguda positiva. A hipoalbuminemia pode comprometer o aporte de zinco, substratos energéticos e drogas para os tecidos inflamados,

justificando o retardo no processo de reparação em pacientes enfermos com déficit dos níveis de albumina (MAZZAFERRO et al., 2002).

b) Transferrina

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

Em ruminantes é considerada uma proteína de fase aguda negativa, apresentando diminuição nos níveis séricos durante as infecções. Os níveis de ferro nos fluidos corpóreos têm influência direta sobre as invasões bacterianas, em virtude da grande maioria das bactérias necessitarem do ferro para o seu crescimento. Quando os níveis estão elevados, os animais tornam-se mais vulneráveis a infecção bacteriana (TIZARD, 2002). Em bovinos, com doença inflamatória crônica, os níveis séricos de transferrina decrescem, no entanto se apresentam dentro do limite fisiológico nas infecções agudas, nos casos de cetose ou após a administração de endotoxinas (THOMAS, 2000).

A transferrina é primariamente produzida nos hepatócitos, porém também há síntese em macrófagos, células de Sertoli e células do epitélio mamário. Cada molécula de transferrina é capaz de ligar-se a dois átomos de ferro e normalmente, apenas um terço de toda a transferrina está saturada com este mineral. A transferrina é uma proteína de fase aguda relacionada ao transporte do ferro, e suas concentrações variam nas doenças do metabolismo férrico. 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, 1984; DE JONG et al., 1990; ECKERSALL, 2008).

3.2.2 Imunoglobulinas

As imunoglobulinas são glicoproteínas que em função da sua estrutura molecular se dividem em diferentes subtipos e subclasses, as IgG, IgD e IgE são monômeros, IgA é um

dímero e IgM é um pentâmero. A grande maioria dos anticorpos são do tipo IgG e estão presentes em todos os animais (KANEKO et al., 1997). Os anticorpos possuem estrutura central comum de duas cadeias leves (L) idênticas e duas cadeias pesadas (H) idênticas, entretanto, quando comparadas entre diferentes imunoglobulinas, sua sequência varia amplamente (KORHONEN et al., 1995, KALLAUR et al., 2007). As cadeias leves de uma imunoglobulina típica contém cerca de 110 aminoácidos, enquanto que as cadeias pesadas contem aproximadamente 500 aminoácidos. Existem cinco tipos distintos de cadeias pesadas imunoglobulínicas (α , γ , δ , ϵ e μ), que determinam sua classe ou isótopo. As imunoglobulinas com as cadeias pesadas α são chamadas de imunoglobulinas A (IgA), aquelas com cadeias γ são chamadas de IgG, as cadeias μ são as IgM, cadeias δ são as IgD e com as cadeias ϵ se formam a IgE (TIZARD, 2002; ECKERSALL, 2008).

Para execução da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS PAGE, as imunoglobulinas (IgG) são divididas em duas cadeias, leve (IgG CL) e pesada (IgG CP), em virtude do uso da substância 2-mercaptoetanol utilizada na solução tampão que é empregada na corrida eletroforética (FAGLIARI e SILVA, 2002).

As imunoglobulinas atuam como anticorpos e são produzidas pela resposta humoral. São altamente específicas se somente uma causa determinante antigénica está envolvida. Quando expressa sobre a superfície dos linfócitos B, atuam como receptores capazes de reconhecer e distinguir grande variedade de antígenos. As duas principais características das imunoglobulinas como proteína de ligação ao antígeno são a especificidade e sua diversidade de ações. As imunoglobulinas possuem atividade biológica secundária de ativação do sistema complemento e de atuação como opsoninas, sendo capazes de prevenir a adesão de microrganismos, inibir o crescimento bacteriano e neutralizar toxinas (KORHONEN et al., 2000; ECKERSALL, 2008).

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

A classe de imunoglobulina IgG representa 80% a 90% do total de imunoglobulinas e exerce o papel principal nos mecanismos de defesa mediados por anticorpos. Como a IgG difundiu-se mais prontamente que as outras imunoglobulinas para os espaços extravasculares ela é a classe predominante nos tecidos não mucosos, onde neutraliza as

toxinas bacterianas. Em várias infecções com repercussão sistêmica, a resposta imune humoral é caracterizada pelo alto título de IgG, sendo esta imunoglobulina de fundamental importância na eliminação de agentes bacterianos por meio de opsonização e posterior fagocitose, conforme observado por Costa et al. (2010) em infecção experimental da glândula mamária por *S. aureus*.

A IgG juntamente com a IgA são as principais imunoglobulinas sintetizadas durante a resposta secundária (TIZARD, 2002; ROITT e DELVES, 2004; MEHRA et al., 2006).

A IgA é encontrada em quantidades significativas nos fluidos corporais, sendo observada em secreções seromucosas como lágrimas, saliva, líquidos nasais, colostro e secreções do pulmão, trato genitourinário e gastrointestinal, onde está envolvida especificamente na proteção das superfícies corpóreas contra microrganismos, representando cerca de 10% a 15% das imunoglobulinas séricas totais (ROITT e DELVES, 2004; KALLAUR et al., 2007). É a imunoglobulina predominante nestas secreções corpóreas com exceção do colostro nos ruminantes, onde predomina a IgG (KORHONEN, 2000). A elevação da IgA no soro sanguíneo nos processos infecciosos da glândula mamária pode estar relacionada à demanda, em virtude da importância desta classe de imunoglobulina na proteção das superfícies corpóreas contra a invasão de agentes infecciosos, inibindo a aderência bacteriana (JAIN, 1993). Geralmente no processo infeccioso, à medida que a concentração de IgA começa a decrescer, observa-se a elevação da IgG no soro sanguíneo (COSTA et al., 2010).

3. 3 Proteínas Do Soro Lácteo

Alguns fatores podem influenciar a concentração de proteínas e peptídeos no leite, sendo os mais importantes a raça, o estado de saúde, as fases da lactação, o sistema de alimentação, as mudanças de estação do ano, a frequência e o sistema de ordenha (GOPAL e GILL, 2000). Durante as fases de lactação, os principais componentes do leite de ovelha variam, seguindo uma curva inversa a da produção de leite, as concentrações de gordura, sólidos totais (caseína e proteínas do soro lácteo) se elevam no início e final da lactação e se encontram em baixos níveis no meio da lactação, quando a produção de leite é elevada, coincidindo o máximo de produção com o mínimo de composição (BENCINI, 2001; VELASCO et al., 2001).

As principais proteínas do leite da ovelha são similares às encontradas no leite da vaca e da cabra. A identificação das proteínas no leite ocorrem em dois momentos distintos, o primeiro ocorre na fase micellar composto pela caseína, o segundo é formado pelas proteínas do soro lácteo (α -lactoalbumina, β -lactoglobulinas, imunoglobulinas e albumina sérica (BORKOVÁ e SNASELOVÁ, 2005; PARK et al., 2007). Segundo Schalm et al. (1971) as proteínas do leite são formadas no ergastoplasma das células acinares e são suplementadas pelo complexo de Golgi. Estas proteínas podem se subdividir em variações genéticas, este polimorfismo é similar ao observado em outras proteínas do organismo. As proteínas do leite originam-se dos aminoácidos livres, presentes na corrente circulatória, sendo alguns destes aminoácidos pré-formados no sangue e incorporados ao leite, e outros passariam previamente por transformações enzimáticas.

A exata composição das proteínas do leite varia entre as espécies, sendo que a maioria (80% a 95%) são sintetizadas nas células epiteliais da glândula mamária incluindo a caseína, α -lactoalbumina, β -lactoglobulina e lactoferrina, enquanto que as imunoglobulinas, albumina sérica e transferrina são proteínas derivadas do sangue e incorporadas às células epiteliais da glândula mamária (BUOGOYONE e DUNCAN, 1998).

Segundo Varnam e Sutherland (1995) a caseína responde por mais de 80% da constituição das proteínas totais do leite e a proporção relativa de proteínas do soro frente à caseína variam segundo o estágio de lactação. O leite produzido nos primeiros dias depois do parto e no final da lactação tem um conteúdo de proteínas do soro muito maior que o leite da metade da lactação. Este incremento está acompanhado de níveis elevados de proteínas do soro sanguíneo.

Auld et al. (1995) analisando dois rebanhos bovinos de raças diferentes, encontraram variações significativas atribuídas ao estágio de lactação, em um rebanho com aumento das concentrações no início e no terço final da lactação, sendo que no segundo rebanho as concentrações não apresentaram diferença significativa, enquanto que Levieux e Ollier (1999) encontraram também em vacas, valores mais elevados das concentrações de albumina sérica, imunoglobulina, α -lactoalbumina e β -lactoglobulina no colostro com diminuição dos valores depois do primeiro mês de lactação.

Em experimento com ovelhas, Bianchi et al. (2004) observaram que as proteínas do soro lácteo se elevaram no final da lactação.

Cozma et al. (2011) em um estudo comparativo entre bovinos, caprinos e ovinos identificaram valores médios de 2,33g/dL de proteína total no soro lácteo de ovelhas.

Nudda et al. (2003) ao estudarem os efeitos do estágio de lactação, parição, genótipo de β -lactoglobulina na composição de proteínas do soro lácteo e contagem de células somáticas em ovelhas da raça Sarda, identificaram frações protéicas no soro lácteo normal e mastítico e, concluíram que o leite de ovelhas apresenta um índice maior de proteínas do soro lácteo quando comparado com o leite de vaca ou de cabra, neste estudo foi utilizado o fracionamento eletroforético com SDS-PAGE.

Raimondo et al. (2009) evidenciaram influência das fases da lactação na concentração da proteína total do soro lácteo, com diminuição no terço final da lactação, o mesmo se observou para lactoferrina, albumina sérica, imunoglobulinas, β -lactoglobulina e a α -lactoalbumina.

a) Albumina sérica

A albumina é uma das proteínas de origem sangüínea, detectada no leite, ou seja, proteína passível de ser transferida do plasma sangüíneo para o leite por transudação, sendo determinada em maiores concentrações na secreção láctea no final da lactação (SCHALM et al., 1971).

Concentrações mais elevadas de albumina sérica no leite podem ser reconhecidas como sensível marcador de processos inflamatórios da glândula mamária, devido à grande e direta correlação existente entre o teor dessa proteína de origem plasmática no leite e a contagem de células somáticas nessa secreção, no entanto a concentração de albumina de origem plasmática no leite sofre variações significativas conseqüentes às fases da fisiologia da produção leiteira: influências da fase da lactação e do número de lactações das vacas (HONKANEN-BUZALSKI, 1982).

A permeabilidade capilar aumenta durante a inflamação e pode permitir a passagem de proteínas do sangue para o leite mais rapidamente que a taxa normal. Aumentos ou diminuições na taxa de síntese de proteínas na glândula mamária influenciariam do mesmo modo a proporção relativa de cada uma destas proteínas no soro lácteo. Sugeriu-se que estes aumentos, em especial a albumina, pode ser um sensível indicador de permeabilidade

capilar aumentada durante o processo inflamatório, permitindo a passagem das proteínas do sangue para o leite (BORTREE et al., 1962).

Segundo Schalm et al. (1971), o aumento da concentração de proteína total e proteínas plasmáticas no soro lácteo, particularmente albumina e imunoglobulinas, acompanhados da diminuição da concentração de caseína representam achados de alteração na glândula mamária.

b) Lactoferrina

A lactoferrina é uma glicoproteína com peso molecular de 80 Da aproximadamente, com elevada afinidade pelo ferro, foi classificada como membro da família da transferrina, devido a sua sequência ser 60% idêntica a transferrina sérica. Apresenta três isoformas diferentes a lactoferrina- α , lactoferrina- β e a lactoferrina- γ (ADLEROVA et al., 2008).

A lactoferrina exerce influência nas reações imunes específicas indiretas. Devido a sua localização estratégica sobre a superfície das mucosas representando um dos primeiros sistemas de defesa do organismo frente aos agentes microbianos que o invadem através das mucosas, comprometendo o crescimento e multiplicação de uma variedade de agentes infecciosos entre eles bactérias, vírus, protozoários e fungos (ADLEROVA et al., 2008).

Smith e Schanbacher (1977) em pesquisa realizada com vacas saudáveis e em lactação, evidenciou que a quantidade de lactoferrina começa a aumentar dois dias após o término da lactação regular. A glândula mamária da vaca aumenta a síntese de lactoferrina quando exposta à invasão microbiana. Estes autores confirmaram as constatações de Welty et al. (1975) ao observarem que o aumento da concentração de lactoferrina iniciava dois a quatro dias após supressão da ordenha rotineira, apresentando um aumento linear de 115 mg/dL por dia. A concentração máxima de lactoferrina láctea detectada foi de aproximadamente 2.000 mg/dL, obtida três a quatro semanas após o início da involução da glândula mamária, preparando-se para a supressão da lactação.

Welty et al. (1975) afirmaram existir amplas variações individuais da concentração de lactoferrina de vacas demonstrando que a concentração de lactoferrina diminuiu sensivelmente antes do parto e no início da nova lactação, indicando que a lactoferrina seria uma proteína em menor concentração no leite normal, mas se tornaria uma das principais proteínas na secreção da glândula mamária em involução e que aumento nos

teores de lactoferrina na secreção láctea seriam indicadores do processo de involução da glândula mamária.

A ação antimicrobiana da lactoferrina foi avaliada *in vitro* por Rainard (1986), concluindo que a lactoferrina inibiu o crescimento de *Escherichia coli*. Qian et al. (1995) analisando a lactoferrina ovina, constataram que a função biológica da lactoferrina é o efeito bactericida e, que esta proteína de fase aguda em ovinos é muito similar a lactoferrina humana, observando concentrações de 13,5 mg/dL em ovelhas.

Naidu et al. (1991) destacaram a grande capacidade de ligação *in vitro* da lactoferrina bovina às células com *Staphylococcus aureus* isoladas de leite de vacas com mastite quando se empregava os meios de cultura ágar sangue, nutriente ou proteose-peptona.

Komine et al. (2006) concluíram que a lactoferrina tem efeito antibacteriano, sendo estes efeitos fisiológicos semelhantes aos efeitos dos antibióticos e indicador de mastite em vacas lactantes.

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 contribuem para a considerável resistência deste sítio à invasão microbiana (SMITH e SCHANBACHER, 1977).

Komine et al. (2006) ratificaram que a lactoferrina é um indicador diagnóstico de mastite em vacas lactantes.

c) β - Lactoglobulina

A β -lactoglobulina foi considerada por Schalm et al. (1971) a proteína sintetizada na glândula mamária, encontrada em maior concentração no soro lácteo. É uma proteína secretada no leite dos ruminantes e devido a sua abundância e facilidade de purificação foi uma das primeiras proteínas em que a composição e a seqüência de aminoácidos foram estabelecidas (EL ZAHAR et al., 2005).

A β -lactoglobulina do leite ovino consiste em uma corrente do polipeptídeo de 162 aminoácidos. Três variações genéticas, β -lactoglobulina A, B e C tem sido descritas e diferem entre si na troca de aminoácidos, sendo que os alelos A e B estão presentes em

quase todas as raças e o alelo C é um mais raro e específico de algumas poucas raças (PARK et al., 2007).

A β -lactoglobulina representa 60% das proteínas do soro lácteo de bovinos, variando sua concentração entre 230 e 490 mg/dL. Nos caprinos sua concentração encontra-se entre 180 e 280 mg/dL e nos ovinos entre 270 e 500 mg/dL, sendo que nos humanos e roedores não se constatou a presença desta proteína (LEDESMA, 2002).

Mao e Bremel (1995) relataram que a β -lactoglobulina poderia ser também detectada no soro sanguíneo de vacas gestantes e o resultado seria utilizado como marcador fisiológico para predizer a futura produção de leite, pois sendo a β -lactoglobulina uma proteína sintetizada pelas células secretoras do tecido epitelial da glândula mamária, passaria para o fluido intersticial e seria absorvida pelo sistema circulatório, integrando-se ao plasma sanguíneo.

d) α - Lactoalbumina

A α -lactoalbumina é a segunda fração protéica mais abundante, representando cerca de 25% das proteínas do soro lácteo, sua concentração no leite bovino varia entre 80 e 120 mg/dL, entre 60 e 110 mg/dL no leite caprinos e entre 120 e 260 mg/dL no leite ovino (LARSON e KENDALL, 1957; SCHALM et al., 1971; LEDESMA, 2002; STĂNCIUC e RĂPEANU, 2010).

A α -lactoalbumina do leite de ovelhas e cabras é homóloga a da vaca, é uma metalo proteína contendo um átomo de Ca por molécula e é fisiologicamente importante na síntese da lactose, facilitando a produção e a secreção do leite. Os cations divalentes dos ligamentos da α -lactolbumina (Ca_{2+} , Zn_{2+}) facilitam a absorção de minerais essenciais. Também, fornece uma fonte bem equilibrada de aminoácidos essenciais para o crescimento de neonatos. Durante sua digestão, seus peptídeos com propriedades antibacterianas e imunoestimulatórios, auxiliam na proteção de encontro às infecções (PARK 2007; STĂNCIUC e RĂPEANU, 2010).

A α -lactoalbumina associa-se com as lisozimas e este complexo responde como uma atividade antibacteriana bastante elevada frente às bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e aumenta a liberação das citocinas pro-inflamatórias interleucinas IL-1, IL-6, e (TNF- α) fator de necrose tumoral α (STĂNCIUC e RĂPEANU, 2010).

A α -lactoalbumina bovina é uma proteína globular de peso molecular aproximado de 14400 Da. Está constituída por 123 aminoácidos e apresenta três variantes genéticas A, B e C, sendo a B a variante mais comum (LEDESMA, 2002; STĂNCIUC e RĂPEANU, 2010).

Em amostras de leite de cabra Levieux e Ollier (1999) determinaram maiores concentrações de α -lactoalbumina nas amostras colhidas até três dias após o parto, diminuindo lentamente e permanecendo estáveis após o oitavo dia de lactação.

No leite bovino, amostras negativas ao teste *Wisconsin Mastitis Test*, evidenciaram concentrações de 178,0 mg/dl, conforme relatadas por Randolph et al. (1974) empregando a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida. Sant'ana et al. (2006) verificaram aumentos significativos nas concentrações de α -lactoalbumina no soro de vacas com retenção láctea.

e) Imunoglobulinas

As imunoglobulinas são encontradas no leite, após serem seletivamente transudadas do plasma sanguíneo para o interior da glândula mamária pelas células acinares do úbere. As concentrações lácteas dessas proteínas foram maiores em amostras de leite de vacas no final da lactação; sendo seus valores superiores durante a fase colostrada (SCHALM et al., 1971).

As imunoglobulinas encontradas no leite estariam relacionadas, diretamente com a função protetora da glândula mamária contra agentes patogênicos causadores de mastites. A concentração dessa fração protéica no leite foi considerada como fisiológica ou, decorrente de infecções ativas de componentes do úbere. A comprovação dessa assertiva mostrou que, quatro horas após infusão de toxinas bacterianas na glândula mamária, observou-se, rapidamente, aumento das imunoglobulinas, inicialmente de IgG₁ e depois, mais lentamente, de IgG₂ (SYMONS e WRIGHT, 1974).

Bortree et al. (1962) analisando o soro lácteo de vacas com mastite experimental, relatou que as imunoglobulinas apresentaram aumentos mais lentos que a albumina sérica, porém mais persistentes.

Caffin e Poutrel (1988) utilizando técnica de imunodifusão radial em amostras de leite de vaca, obtiveram maiores valores de IgG₁ no início da lactação (até 30 dias) e IgG₂

na fase final da lactação (270 dias). Tais variações, Caffin e Poutrel (1988) atribuíram ao aumento do número de células somáticas, por terem observado significativa correlação entre esses dois parâmetros lácteos.

Na avaliação da presença da imunoglobulina A no leite, além de se apresentar em pequenas concentrações, ela permaneceria ligada a glóbulos de gordura do leite, dificultando sua determinação (HONKANEN-BUZALSKI, 1982).

Levieux e Ollier (1999) aplicando a técnica de imunodifusão radial em ágar gel em amostras de soro lácteo de vacas recém-paridas, observaram ampla variação nas concentrações de imunoglobulina G, sendo maiores em amostras colhidas nas ordenhas do primeiro dia após o parto, do que nas amostras colhidas oito dias após o parto. Além do mais, os mencionados pesquisadores observaram, que vacas de primeira cria produziram menor quantidade de imunoglobulinas no colostro do que as vacas que estavam na segunda ou quarta lactação.

As imunoglobulinas juntamente com a lactoferrina, lactoperoxidase e lisozima formam um importante sistema antimicrobiano da secreção láctea (MEHRA et al., 2006).

3.4 Eletroforese das proteínas do soro

3.4.1 Soro Sanguíneo

A eletroforese da proteína de soro é considerada atualmente como o padrão de referência para o fracionamento das proteínas séricas, seu princípio está baseado no movimento das proteínas carregadas em uma matriz de sustentação que separa as proteínas em função do seu peso molecular (ECKERSALL, 2008).

Segundo Fagliari e Silva (2002) as técnicas de eletroforese com fitas de acetado de celulose ou filmes de agarose, apesar de serem amplamente utilizados na rotina clínica, apresentam um valor limitado permitindo apenas o fracionamento de cinco a sete grupos de proteínas. Estes autores sugerem a utilização da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), permitindo a visualização de até 20 a 30 proteínas com pesos moleculares que variam entre 24.000 a 340.000 dáltons (Da). A eletroforese em gel de poliacrilamida é uma técnica de fácil execução, baixo custo e permite a quantificação de diversas proteínas de fase aguda entre elas fibrinogênio, ceruloplasmina, antitripsina, haptoglobina, α -1 glicoproteína ácida, dentre outras,

necessitando de muito pouca quantidade de amostra de soro sanguíneo. A técnica SDS PAGE pode ser utilizada na análise da cinética das frações protéicas durante a resposta inflamatória, propiciando o diagnóstico das doenças animais, e prognóstico clínico (HORADAGODA et al., 1999; FAGLIARI e SILVA, 2002; FAGLIARI et al., 2006; ECKERSALL, 2008).

Costa et al. (2010) empregando o SDS PAGE em soro sanguíneo de ovelhas identificou e quantificou proteínas de fase aguda e as imunoglobulinas IgG e IgA em glândulas mamárias infectadas experimentalmente com *S. aureus*.

3.4.2 Soro Lácteo

A eletroforese tem sido utilizada desde a década de 50 do século passado na separação das frações protéicas do soro sanguíneo e foi indicada como uma importante técnica para o estudo das proteínas do soro lácteo. Com o avanço dos estudos sobre as proteínas do soro lácteo esta técnica tem sido utilizada, permitindo a identificação das imunoglobulinas, β -lactoglobulina, a α -lactoalbumina, albumina de origem plasmática entre outras (SCHALM et al., 1971; FARREL et al., 2004).

A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) é uma técnica importante para a separação de proteínas do leite, pois permite a identificação de várias frações protéicas, bem como sua quantificação (PATEL et al., 2007). A eletroforese em gel de policrilamida pode ainda ser utilizada para caracterizar as variações genéticas individuais de cada fração protéica tais como β -lactoglobulina, a α -lactoalbumina, albumina sérica e lactoferrina. (FARREL et al., 2004).

Hillier (1976), empregando padrões de soro lácteo bovino, evidenciou que a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida poderia ser recomendada com adequada precisão na mensuração das frações protéicas do soro lácteo.

As concentrações das proteínas do soro lácteo teriam uma variação considerada nos casos de inflamação da glândula mamária, enquanto que as alterações na concentração de proteína total do leite não se alterariam de forma significativa (SCHALM et al., 1971; AUDIST et al., 1995).

Kato et al. (1989) utilizando também a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida para o isolamento e identificação das proteínas do leite mastítico de vacas,

destacarem a importância desta técnica para o isolamento e identificação das proteínas e enzimas do leite, contribuindo para o esclarecimento da patogenia das mastites.

Quiles et al. (1992) utilizaram a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida no soro lácteo de cabras e evidenciaram alterações nos valores encontrados em decorrência das diferentes fases de lactação.

Sant'ana (2004) utilizando o proteinograma do soro lácteo de bovinos identificou aumento significativo dos teores de proteína total do leite e do soro lácteo em quartos acometidos por mastite catarral em comparação com as amostras dos quartos sadios.

Rocha et al. (2009) verificando as proteínas no soro lácteo de vacas primíparas e pluríparas, através do proteinograma do soro lácteo em SDS PAGE, observaram que o número de partições influenciou significativamente os teores de IgA, albumina de origem plasmática, IgG, β -lactoglobulina e de α -lactoalbumina.

Raimondo et al. (2009) avaliando a influência da fase de lactação em vacas da raça Jersey, identificaram sete frações protéicas do soro lácteo, utilizando a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida.

4-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLEROVA, L.; BATTOSKOVA, A.; FALDYNA, M. Lactoferrin: a review. **Veterinarni Medicina**, Praha, v. 53, n. 9, p. 457–468, 2008.

ALMEIDA, M. Z. P.R.B. **Estudo da mastite subclínica em ovelhas da raça Santa Inês e sua influência sobre as características físico-químicas do leite**. 2008. 104p. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal de Pernambuco. Departamento de Medicina Veterinária, Recife, 2008.

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

ARIZNABARRETA, A.; GONZALO, C.; SAN PRIMITIVO, F. Microbiological quality and somatic cell count of ewe milk with reference to *Staphylococci*. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, p. 1370-1375, 2002.

AULDIST, M. J.; COATS, S.; ROGERS, G. L.; McDOWELL, G. H. Changes in the composition of milk from healthy and mastitic dairy cows during the lactation cycle. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Victoria, v. 35, n. 4, p. 427-436, 1995.

BENCINI, R. Factors affecting the quality of Ewes milk. In: DAIRY SHEEP SYMPOSIUM. 2001, Wisconsin. **Anais...**Wisconsin: Wisconsin Sheep Dairy Cooperative, 2001. p. 61-92.

BIANCHI, L.; CASOLI, C.; PAUSELLI, M.; BUDELLI, E.; CAROLI, A.; BOLLA, A.; DURANTI, E. Effect of somatic cell count and lactation stage on sheep milk quality. **Italian Journal Animal Science**, Pavia, v. 3, p. 147-156, 2004.

BORKOVA, M.; SNASELOVÁ, J. Possibilities of different animal milk detection in milk and dairy products – a Review. **Czech Journal Science**, Praha, v. 23, n. 2, p. 41-50, 2005.

BRAUN, J. P.; TRUMEL, C.; BÉZILL, P. Clinical biochemistry in sheep: a selected review. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 92, p. 10–18, 2010.

BORTREE, A. L.; CARROLL, E. J.; SCHALM, O. Whey protein patterns of milk from cows with experimentally produced Mastitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 45, p. 1465, 1962.

BUOGOYONE, R. D.; DUNCAN, J. Secretion of milk proteins. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, San Francisco, v. 3, n. 3, p. 275-286, 1998.

CAFFIN, J. R.; POUTREL, B. Physycological and pathological factors influencing bovine immunoglobulins G₂ concentration in milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 43, n. 8, p. 901-911, 1960.

CERON, J. J.; ECKERSALL, P. D.; MARTYNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 34, p. 85-99, 2005.

COLE, D. J.; ROUSSEL, A. J.; WHITNEY, M. S. Interpreting a bovine CBC: evaluating the leukon and acute fase proteins. **The Veterinary Clinics of North América – Foor animal practice**, Charleston, v. 92, n. 5, p. 470-478, 1997.

COLLA, M. F.; VALLE, F. S.; SECCHI, P.; SCALON, M.; DURR, J.W.; GONZALEZ, F. Valores de haptoglobina plasmática em vacas com diferentes contagens de células somáticas em amostras de leite. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 8. 2009. **Anais...**Belo Horizonte, Associação Brasileira de Buiatria, 2009. p. 739-744.

CONNER, J. G.; ECKERSALL, P.D.; DOHERTY, M.; DOUGLAS, T.A. Acute phase response and mastitis in the cow. **Research in Veterinary Science**, London, v. 41, p.126, 1986.

CONTRERAS, P. A. Indicadores do metabolismo protéico utilizado nos perfis metabólicos de rebanhos. In: GONZALEZ, F. H. D.; BARCELLOS, J. O.; OSPINA, H.; RIBEIRO, L.A.O. **Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais**. Porto Alegre: Gráfica Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 23-30, 2000.

CONTRERAS, A.; SANCHES, A.; CORRALES, J. C.; MARCO, J. C.; PAAPE, M. J.; GONZALO, C. Mastitis in small ruminants. **Small Ruminant Reserch**, Amsterdam, v. 68, p. 145-153, 2007.

COSTA, N. A.; SIMÃO, L. C. V.; SANTOS, R. A.; AFONSO, J. A. B.; FAGLIARI, J. J.; CARDOSO, E. C.; SOARES, P. C.; MENDONÇA, C. L. Proteinograma e teores de cobre, ferro e zinco no soro de ovelhas da raça Santa Inês com mastite experimental por *Staphylococcus aureus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 5, p. 435-442, 2010.

COZMA, A.; ANDREI, S.; MIERE, D.; FILIP, L.; LOGHIN, F. Proteins profile in milk three species of ruminants. **Notulae Scientia Biologicae**, Cluj-Napoca, v. 3, p. 26-29, 2011.

CRAY, C.; ZAIAS, J.; ALTMAN, N. H. Acute phase response in animals: A Review. **Comparative Medicine**, Memphis, v. 59, p. 517-526, 2009.

DE JONG, G.; VAN DIJK, J. P.; VAN EIJK, H. G. The biology of transferrin. **Clínica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 190, p. 1-46, 1990.

ECKERSALL, P. D.; YOUNG, F. J.; MCCOMB, C.; HOGARTH, C. J.; SAFI, S., WEBER, A.; MCDONALD, T.; NOLAN, A. M.; FITZPATRICK, J. L. Acute phase protein in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. **Veterinary Record**, London, v. 148, p. 35-41, 2001.

ECKERSALL, P. D.; LAWSON, F. P.; BENCE, L.; WATERSTON, M. M.; LANG, T. M.; DONACHIE, W.; FONTAINE, M. Acute phase protein response in a experimental model ovine caseus lymphadenitis. **BMC Veterinary Research**, London, v. 3, p. 3-35, 2007.

ECKERSALL, P. D. Proteins, Proteomics, and the Dysproteinemia, In: KANEKO. J. J.; HARVEY J. W.; BRUSS M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**, 6.ed. San Diego: Academic Press, 2008. p. 117-155.

ECKERSALL, P. D.; BELL, R. Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **The Veterinary Journal**, London, v. 185, p. 23-27, 2010.

EL-ZAHAR, K.; SITOHY, M.; CHOISSET, Y.; METRO, F.; HAERTLE, T.; CHOBERT, J.M. Peptic hydrolysis of ovine β -lactoglobulin and α -lactalbumin. Exceptional susceptibility of native ovine β -lactoglobulin to pepsinolysis. **International Dairy Journal**, Barking, v. 15, p. 17–27, 2005.

FAGLIARI, J. J.; SILVA, S. L. Hemograma e proteinograma plasmático de equinos hígdos e de equinos acometidos por abdômem agudo antes e após laparotomia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 54, n. 6, p. 559-586, 2002.

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.

FARRELL, H. M.; JIMENEZ-FLORES, R. Jr.; BLECK, G. T.; BROWN, E. M.; BUTLER, J. E.; CREAMER, L. K.; HICKS, C. L.; HOLLAR, C. M.; NG-KWAI-HANG, K. F.; SWAISGOOD, H. E. Nomenclature of proteins of cow's milk- Sixth Revision. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 87, p. 1641-1674, 2004.

FERREIRA, M. I. C.; LIMA, M. Jr, G.; BORGES, I.; VIANA, M. H.; COUTO, J. R. L.; CAVALCANTI, L. F. L. Efeito do número de fetos e do manejo nutricional sobre a produção de leite de ovelhas da raça Santa Inês. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 44. Jaboticabal, 2007. **Anais...** Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2007. (CD-ROM).

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

FTHENAKIS, G. C.; JONES, J. E. The effect of inoculation of coagulase-negative staphylococci into the ovine mammary gland. **Journal of Comparative Pathology**, Amsterdam, n. 102, v. 2, p. 211-219, 1990.

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.

GONZALO, C.; ARIZNABARRETA, A.; CARRIEDO, J. A.; PRIMITIVO, F. S. Mammary pathogens and their relationship to somatic cell count and milk yield losses in Dairy Ewes. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, p. 1460-1467, 2002.

GONZÁLEZ, F. H. D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; CERÓN, J. J. Haptoglobina en rumiantes: generalidades y posibles aplicaciones clínicas. **Anales de Veterinaria Murcia**, Murcia, v. 23, p. 5 -17, 2007.

GOPAL, P. K.; GILL, H. S. Oligosaccharides and glycoconjugates in bovine milk and colostrum. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 84, p. 69-74, 2000.

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

HILLER, R. M. The quantitative measurement of whey proteins using polyacrylamide-gel electrophoresis. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 43, n. 2, p. 259-265, 1976.

HIRVONEN, J.; PYORALA, S.; JOUSIMIES-SOMER, H. Acute response in heifers with experimentally induced mastitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 63, p. 351-360, 1996.

HOCHEPIED, T.; BERGER, F.G.; BAUMAN, H.; LIBERT, C. α 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.

HONKANEN-BUZALSKI, T. **Protein transfer between blood and milk as a marker of bovine mastitis – with special reference to serum albumin, antitrypsin and secretory immunoglobulins**, 1982. 77 f. Tese. (Doutorado em Medicina Veterinária) - College of Veterinary Medicine, Helsinki, 1982.

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**, 2010. Disponível em:< [HTTP://www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br)>. Acesso em: 13 out. 2011.

ISRAILI, Z. H.; DAYTON, P. G. Human alpha-1-glycoprotein and its interaction with drugs. **Drug Metabolism Review**, New York, v. 33, n. 2, p. 161-235, 2001.

JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 4ed.; Philadelphia: Lea & Febinger, 1993, 417 p.

JONES, J. E. T.; LANYON, M. An investigation of the incidence and causes of mastitis in ewes in lowland flocks. **The Sheep Farmer**, Worcestershire, v. 53, p. 9-10, 1990.

KALLAUR, A. P.; BUQUI, G. A.; SABINO, G. C.; MASTELLARI, R. B.; MORIMOTO, H. K.; VOGLER, I. H.; REICHE, E. M. V. Freqüência das alterações dos níveis séricos de imunoglobulinas dos pacientes atendidos no Hospital Universitário, Londrina, Paraná. **Semina: Ciências Biológicas e de Saúde**, Londrina, v. 28, n. 1, p. 23-32, 2007.

KANEKO, J. J. 1997. Serum proteins and the dysproteinemias, p.117-138. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**, 5. ed. New York: Academic Press, 1997. 932p.

KATO, K.; MORI, K.; KATOH, N. Different proteins patterns in normal and mastitic milks by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamida gel electrophoresis. **Japanese Journal Veterinary Science**, Tokyo, v. 51, n. 6, p. 1275-1278, 1989.

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.

KOMINE, Y.; KOMINE, K.; KAI, K.; ITAGAKI, M.; KUROISHI, T.; ASO H.; OBARA, Y.; KUMAGAI, K. Effect of combination therapy with lactoferrin and antibiotics against *Staphylococcal* mastitis on Dryng 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.; Kaatinen, L.; Pyörälä, S. **The bovine udder and mastitis**. Helsinki: Gummerus Kirjapaino, p. 76-82, 1995.

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.

LANGONI, H.; MENDONÇA. L. J. P.; RIBEIRO, F. C.; ARAÚJO, W. N. Aspectos microbiológicos e perfis de sensibilidade de patógenos na mastite ovina. In: **ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES**, 3., 1999, Botucatu _ SP: FMVZ/UNESP, 1999, p. 135.

LARSON, B. L.; KENDALL, K. A. Protein production in the bovine daily production of specific milk proteins during the lactation period. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 40, n. 3, p. 377-386, 1957.

LEDESMA, B. H. **Caracterización y bioactividad de péptidos obtenidos a partir de proteínas lácteas mediante hidrólisis enzimática y procesos fermentativos**. 2002. 230p. Memoria que para optar al grado de Doctor en Farmacia- Universidad Complutense de Madrid Facultad de Farmacia Nutrición y Bromatología II, Madri, 2002.

LEVIEUX, D.; OLLIER, A. Bovine immunoglobulins G, β - lactoglobulin, α - lactoalbumin and serum albumin in colostrums and milk during the early post partum period. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 66, n. 3, p. 421-430, 1999.

MAO, F. C.; BREMEL, R. D. Prediction of milk yields from serum β -lactoglobulin concentration in pregnant heifers. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 78, n. 2, p. 291-295, 1995

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, v. 12, n. 2, p. 113-124, 2002.

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. 1261-1271, 2006.

MELO, C. B.; ALMEIDA, B. M.; OLIVEIRA, A. A.; AZEVEDO, H. C.; MELO, L. S. S.; MATA, S. S. Avaliação de uma metodologia profilática contra a mastite clínica em ovelhas da raça Santa Inês. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 4, p. 1011-1013, 2008.

MENZIES, P. I. **Mastitis of sheep – Overview of recent literature**. University of Guelph, 2000. Disponível em <http://www.vwex.edu/ces/animal/sheep/mastitis>>. Acesso em: 20/04/2000.

MENZIES, P. I.; RAMANOON, S. Z. Mastitis of sheep and goats. **The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 1, p. 333-358, 2001.

MORK, T.; WAAGE, S.; TOLLERSRUD, T.; KVITILE, B.; SVILAND, S. Clinical mastitis in ewes; bacteriology, epidemiology and clinical features. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v. 49, n. 1, 23, 2007.

MOSHAGE, H. Cytokines and the hepatic acute phase response. **Journal of Pathology**, New York, v. 181, p. 257-266, 1997.

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. **The Veterinary Journal**, London, v. 173, p. 473-474, 2007.

NACCARI, F.; MARTINO, D.; GIOFRÈ, F.; PASSANTINO, A.; De MONTIS, P. Therapeutic efficacy of tilmicosin in ovine mammary infections. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 47, n. 1, p. 1-9, 2003.

NAIDU, A. S.; ANDERSON, M.; MIEDZOBRODZKI, L.; FORSGREN, A. Bovine lactoferrin receptors in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 4, p. 1218-1226, 1991.

NUDDA, A.; FELIGINI, M.; BATTACONE, G.; MACCIOTTA, N. P. P.; PULINA, G. Effects of lactation stage, parity, α -lactoglobulin genotype and milk SCC on whey protein composition in Sarda dairy ewes, **Italian Journal Animal Science**, Pavia, vol. 2, p. 29-39, 2003.

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. **Aspectos clínico-epidemiológicos e etiológicos da mastite clínica em ovelhas da raça Santa Inês no Agreste Meridional do Estado de Pernambuco**. 2007. 47p. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal de Pernambuco. Departamento de Medicina Veterinária, Recife, 2007.

OLIVEIRA, J. J. A solução é apalpar o úbere do Santa Inês. **O Berro**, Uberlândia Nov/Dez 2000. Disponível em < http://www.zebus.com.br/zootecnia3_40_berro.htm > Acesso em 01 dez. de 2010.

PACHAURI, S. P.; GUPTA, M. V.; 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, 2002.

PARK, Y. W.; JU´AREZ, M.; RAMOS, M.; HAENLEIN, G. F. W. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 68 p. 88–113, 2007.

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.

PATEL, H. A.; ANEMA, S. G.; HOLROYD, S. E.; SINGH, H.; CREAMER, L. K. Methods to determine denaturation and aggregation of proteins in low-, medium- and high-heat skim milk powders. **Lait**, Les Ulis, v. 87, p. 251–268, 2007.

PEIXOTO, R. M.; MOTA, R. A.; COSTA, M. M. Mastite em pequenos ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 9, 2010.

PENGOV, A. The role of coagulase-negative Staphylococcus spp. and associated somatic cell counts in the ovine mammary gland. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, p. 572-574, 2001.

PETERSEN, H. H.; NIELSEN, J. P.; HEEGARD, P. M. H. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary Research**, Paris, 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**, London, 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.

PRESTES, D. S.; FILAPPI, A.; CECIM, M. Susceptibilidade à mastite: fatores que a influenciam - uma revisão. **Revista FZVA**, Uruguaiana, v. 9, n. 1, p. 118-132, 2002.

QIAN, Z.; PIERRE, J.; MIGLIONE-SAMOUR, D.; FIAT, A. Isolation and characterization of sheep lactoferrin, an inhibitor of platelet aggregation and comparison with human lactoferrin. **Biochimica et Biophysica Acta**, Paris, v. 1234, p. 25-32, 1995.

QUILES, A.; HEVIA, M.; FUENTES, F.; BARCINA, Y.; RAMÍREZ, A.; Fraccionamiento electroforético de las proteínas de leche de cabra de raza Murciano-Granadina. **Animal Vetererinary**, Murcia, v. 8, p. 07-13, 1992.

RADOSTITS, O. M.; GAY C.C.; HINCHCLIFF, K. W.; CONSTABLE, P.D. **Veterinary medicine**, 10 ed., London: Saunders Elsevier, 2007. 2156p.

RAIMONDO, R. F. S.; MIYASHIRO, S. I.; BIRGEL, E. H. B. Jr. Influência da fase de lactação nas proteínas do soro lácteo de vacas jersey. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 8. 2009. **Anais...Ciência Animal Brasileira – Suplemento 1**, 2009. p.732.

RAINARD, P. Bacteriostasis of *Escherichia coli* by bovine lactoferrin, transferring and immunoglobulins (IgG1, IgG2, IgGM) acting alone or in combination. **Veterinary Microbiology**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 103-115, 1986.

RANDOLF, H. E.; ERWIN, R. E.; RICHTER, R, L. Influence of mastitis on properties of milk. VII. Distribution of milk proteins. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 57, n. 1, p. 15-18, 1974.

ROCHA, T. G.; FRANCIOSI, C.; NOCITI, R. P.; SILVA, P. C.; SAMPAIO, A. A. M.; FAGLIARI, J. J. **Eletroforetograma das proteínas do soro lácteo de vacas canchim primíparas e pluríparas.** Ciência Animal Brasileira – Suplemento 1, 2009 – Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria.

ROITT, I. M.; DELVES, P. J. **Fundamentos de imunologia.** 10 ed. Rio de Janeiro Guanabara Koogan: 2004. 489p.

SANT'ANA, V. A. C. **Proteinograma do leite de vacas: padrões e variabilidade**. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária). Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2004. 161p.

SANT'ANA, V. A. C.; BIRGEL, E. H.; ROSENFELD, A. M. F.; SOARES, P. C. Proteinograma do leite de vacas lactantes submetidas à retenção láctea. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 43, n. 2, 2006.

SANTOS, R. A.; MENDONÇA, C. L.; AFONSO, J. A. B.; SIMÃO, L. C. V. Aspectos clínicos e características 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.

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

SEGELMARK, M.; PERSSON, B.; HELLMARK, T.; WIESLANDES, J. Binding and inhibition of myeloperoxidase (MPO): a major function of ceruloplasmin? **Clinical & Experimental Immunology**, Oxford, v. 108, p. 167-174, 1997.

SKINEER, 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.

STĂNCIUC, N.; RĂPEANU, G. An overview of bovine α -lactalbumin structure and functionality. **Food Technology**, Chicago, v. 34, n. 2, 2010.

SYMONS, D. B. A.; WRIGHT, L. J. Changes in bovine mammary gland permeability after intrammary exotoxin infusion. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 84, n. 1, p. 9-17, 1974.

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.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Leche y productos lácteos**. Série 1 Alimentos Básicos. Editorial Acribia: Zaragoza, 1995. 476p.

VAZ, A. K. Mastite em ovinos. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 16, p. 75-77, 1996.

VELASCO, S.; CAÑEQUE, V.; DIAZ, M. T.; PEREZ, C.; LAUZURICA, S.; HUIDOBRO, F.; MANZANARES, C.; GONZALES, J. Producción lechera y composición lipídica de la leche de ovejas Talaveranas durante el período de lactancia. **Investigación Agraria y Producción Sanidad Animal**. Madrid, v. 16, n. 1, p. 181-192, 2001.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**, 3 ed. Porto Alegre: Armed, 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 withholding: a defense against infection and neoplasia. **Physiological Reviews**, Baltimore, v. 64, n. 1, p. 65-102, 1984.

WELTY, F. K.; LARRY, SMITH, K.; SCHANBACHER, L. F. Lactoferrin concentration during involution of the bovine mammary gland. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 59, n. 2, p. 224-231, 1975.

WINTER, A. Mastitis in ewes. **In practice**, London, v. 23, p. 9160-163, 2001.

5- ARTIGOS CIENTÍFICOS

5.1- Artigo 1

PROTEINOGRAMA DO SORO SANGUÍNEO DE OVELHAS DA RAÇA SANTA INÊS EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE LACTAÇÃO¹

Vânia F. Lemos^{2*}, Eduardo L. S. Guaraná³, José A. B. Afonso⁴, José J. Fagliari⁵, Paulo C. Silva⁵, Pierre C. Soares⁶, Carla L. Mendonça⁴

ABSTRACT.- Lemos V.L., Guaraná E.L.S., Afonso J.A.B., Fagliari J.J., Silva P.C., Soares P.C., Mendonça C.L. [Blood Serum Proteinogram Of Santa Ines Sheep Breed In Different Stages Of Lactation.] Proteinograma do soro sanguíneo de ovelhas da raça Santa Inês em diferentes estágios de lactação. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Clínica de Bovinos, Campus Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Bom Pastor s/n, Cx. Postal 152, Mundaú, Garanhuns, PE 55292-901, Brazil. E-mail: vanialemos91@gmail.com

The phase of transistion of peripartum is probably most important, not only for metabolic diseases that can happen during this period, but also for the survival you create of them, production and preparation for lactation. With the use of the technique in SDS-PAGE, it was objectified in this study, to evaluate the physiological characteristics of the dynamics of the proteinogram in Saint Ines sheep. The ovine created in system using the same sanitary and nutritional management before/during lactation period: approximately 10 days antepartum, 15, 30, 60 and 90 days postpartum (final period of weaning and lactation). A number of 163 samples of blood had been collected and centrifuge 1600G during five minutes. The determination of serum concentration of total protein was employed by biuret using commercial kit. The separation of protein fractions was carried through using sodium dodecil sulphate polyacrylamide gel eletrophoresis, that allowed quantification of nine protein, including: IgA, ceruloplasmin, transferrin, albumin, IgG of heavy chain (IgG CP), haptoglobin, acid glycoprotein, IgG of chain light (IgG CL) and PM 23.000. In proteins of blood serum was not observed significant variation in total protein PT ($P>0,3434$) and IgA ($P>0,2773$), ceruloplasmin ($P>0,0950$), transferrin ($P>0,5465$), albumin ($P>0,01102$), haptoglobin ($P>0,6831$), acid glycoprotein ($P> 0,6646$), IGG CL ($P>0,0660$) and PM 23000 ($P>0,6390$). Significant variation was only observed at the IgG CP ($P<0,0008$) and Total IgG ($P<0,0020$), presenting a continuous growth in lactation phases. The physiological alterations in the daily antepartum, as well as different moments of lactation had not influenced albumin, ceruloplasmin, transferrin, haptoglobin, α -1 acid glycoprotein, PM 23.000 Da and the immunoglobulin (IgA) concentrations, influencing only in the imunoglobulin G (IgG) of the serum blood in the Saint Ines sheep.

INDEX TERMS: Antipartum, ewes, phase of lactation, physiology, mammary gland, SDS PAGE.

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

Parte da Dissertação do primeiro autor no Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

² Pós-Graduanda em Sanidade e Reprodução em Ruminantes/UFRPE. Av.: Bom Pastor, s/n, Caixa postal 152 - Boa Vista. CEP 55292-270. Garanhuns-PE. * Autor para correspondência: vanialemos91@gmail.com

³ Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária/ UFRPE. Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos. Recife- PE. CEP 52171-030.

⁴ Clínica de Bovinos, Campus Garanhuns/ UFRPE. Av.: Bom Pastor, s/n. Caixa postal 152 - Boa Vista. CEP 55292-270. Garanhuns-PE. carlalopes.mendonca@gmail.com

⁵ Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, UNESP, Campus Jaboticabal, Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellani, s/n, Jaboticabal- SP. CEP 14884-900.

⁶ Departamento de Medicina Veterinária/ UFRPE. Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos. Recife-PE. CEP 52171-030.

RESUMO.- A fase de transição do periparto é provavelmente a mais importante, não apenas pelas doenças metabólicas que podem advir durante este período, mas também pela sobrevivência das crias, a produção e o preparo para a lactação. Com a utilização da técnica em SDS-PAGE, objetivou-se neste estudo, avaliar as características fisiológicas da dinâmica do proteinograma de ovelhas híbridas da raça Santa Inês. Um rebanho ovino criado em sistema semi-intensivo e submetido ao mesmo manejo higiênico-sanitário e nutricional foi acompanhado antes/durante o período de lactação: aproximadamente 10 dias que precedeu ao parto, 15, 30, 60 e 90 dias pós parto. Foram coletadas 163 amostras de sangue centrifugadas à 1600G. A determinação da concentração sérica da proteína total foi obtida pelo método do biureto. A separação das proteínas foi realizada utilizando-se eletroforese em gel de poliácridamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), que permitiu a quantificação de nove proteínas, dentre elas: IgA, ceruloplasmina, transferrina, albumina sérica, IgG de cadeia pesada (IgG CP), haptoglobina, α_1 glicoproteína ácida, IgG de cadeia leve (IgG CL), IgG total (IgG CP + IgG CL) e PM 23.000. Nas proteínas do soro sanguíneo não foi observado variação significativa na proteína total PT ($P>0,3434$) e nas respectivas proteínas: IgA ($P>0,2773$), ceruloplasmina ($P>0,0950$), transferrina ($P>0,5465$), albumina ($P>0,01102$), haptoglobina ($P>0,6831$), $\alpha -1$ GPA ($P>0,6646$), IGGCL ($P>0,0660$) e PM23000 ($P>0,6390$). Variação significativa foi observada somente na IgG CP ($P<0,0008$) e IgG total ($P<0,0020$), apresentando um crescimento contínuo durante as fases de lactação. As alterações fisiológicas no pré-parto, bem como os diferentes momentos da lactação não influenciaram as concentrações protéicas de albumina, ceruloplasmina, transferrina, haptoglobina, $\alpha-1$ glicoproteína ácida, PM 23.000 Da e imunoglobulina A (IgA), influenciando apenas na concentração da imunoglobulina G (IgG) do soro sanguíneo de ovelhas da raça Santa Inês.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Anteparto, ovelhas, fases da lactação, fisiologia da glândula mamária, SDS PAGE.

INTRODUÇÃO

A fase de transição nas ovelhas, que compreende o periparto, é talvez a mais importante, não apenas pelas doenças metabólicas que podem advir durante este período, mas por toda a influência que exerce sobre a sobrevivência das crias, a produção e o preparo para a lactação. Neste período os animais são submetidos a intensas alterações metabólicas relacionadas ao final do período gestacional e início da produção de leite, repercutidas em uma série de alterações sistêmicas, que promovem aumento ou decréscimo na concentração protéica sanguínea (Grummer 1995)

As proteínas são os componentes mais abundantes do plasma, sendo constituídas por aminoácidos essenciais. Dentre as inúmeras funções, destacam-se a formação básica da estrutura de células de órgãos e tecidos, a manutenção da pressão colóido-osmótica, catalisadores de reações bioquímicas e no equilíbrio ácido-básico, participação no processo de coagulação sanguínea, realização do transporte de metabólitos e participação da defesa do organismo frente à patógenos (Jain 1993, Eckersall 2008).

A concentração plasmática das proteínas depende do estado nutricional, do balanço hídrico, do balanço hormonal e outros fatores que estão diretamente envolvidos na condição de higiene do animal. A meia vida das proteínas plasmáticas está diretamente relacionada à espécie animal e os estados fisiológicos como prenhez, parição e lactação são condições nas quais a concentração pode estar alterada (Jain 1993).

A técnica de eletroforese é considerada atualmente como o padrão de referência para o fracionamento da proteína no soro sanguíneo; seu princípio está baseado no movimento das proteínas carregadas em uma matriz de sustentação, que separa as proteínas em função do seu peso molecular (PM) (Eckersall 2008). A eletroforese em gel de poliácridamida, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) permite a visualização de 20 a 30 proteínas com pesos moleculares que variam entre 24.000 a 340.000 dáltons, dentre estas algumas proteínas de fase aguda e imunoglobulinas (Fagliari & Silva 2002).

A síntese das proteínas de fase aguda é estabelecida geneticamente, o que explica a variabilidade entre as espécies e indivíduos, que é refletida no perfil eletroforético das proteínas em situação fisiológica (Eckersall et al. 2008). A interpretação da magnitude e duração da resposta de fase aguda refletindo a gravidade de um processo infeccioso pode atuar como ferramenta de prognóstico,

fornecendo informações objetivas sobre a extensão das lesões em curso, clínicas ou subclínicas, individualmente ou no rebanho, atuando como marcadores objetivos e não-específicos da saúde animal (Petersen et al. 2004, Braun et al. 2010), particularmente no período de transição em que a imunodepressão pode estar presente predispondo o aparecimento de processos infecciosos, inclusive a mastite (Mallard et al. 1998).

Diante do exposto e da inexistência na literatura de informações relacionadas ao perfil eletroforético em SDS-PAGE na espécie ovina no pré e pós parto, bem como no período de lactação, este estudo teve por objetivo descrever informações sobre a dinâmica do proteinograma de ovelhas híbridas da raça Santa Inês no período final da gestação e nos diferentes estágios da lactação, conhecendo assim quais proteínas de fase aguda estão presentes neste período de transição e qual sua concentração no soro sanguíneo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi acompanhado um rebanho comercial de ovelhas da raça Santa Inês, criadas em sistema semi-intensivo, submetidas ao mesmo manejo higiênico, sanitário e nutricional, avaliadas dez dias antes do parto e posteriormente em diferentes estágios da lactação 15, 30, 60 e 90 dias pós parto (dpp), sendo este último o momento que ocorre o desmame na região.

O acompanhamento das ovelhas nos cinco momentos de avaliação resultou no processamento de 163 amostras de soro de ovelhas saudáveis (Diffay et al. 2005), obtidas mediante punção da veia jugular em sistema a vácuo em tubos siliconizados sem anticoagulante⁷, centrifugadas⁸ a 1600 G durante cinco minutos para obtenção do soro sanguíneo. As amostras foram fracionadas e armazenadas em tubos tipo eppendorf previamente identificados e mantidos em ultrafreezer⁹ a -80°C, para posterior análise laboratorial.

A determinação da concentração sérica da proteína total foi realizada pelo método do biureto empregando-se reagente comercial¹⁰. A separação das frações protéicas foi realizada por eletroforese em gel de poli(acrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme técnica descrita por Laemmli (1970) e Fagliari & Silva (2002). Para a identificação das frações protéicas foi empregada como referência solução marcadora¹¹ com pesos moleculares variando de 6.500 a 200.000 Daltons (Da), além das proteínas purificadas albumina, imunoglobulina IgG, haptoglobina, α_1 -antitripsina e transferrina. Após o fracionamento o gel foi corado durante dez minutos em solução de azul de coomassie, constituída de metanol (50%), água (40%), ácido acético glacial (9,75%) e azul de coomassie (0,25%). Em seguida foi colocado em solução de ácido acético a 7% para retirada do excesso de corante, até que as frações protéicas se apresentassem nítidas. A determinação das concentrações protéicas foi obtida por meio de densitômetro computadorizado¹².

Os dados foram previamente avaliados quanto à sua normalidade e, posteriormente, análise de variância (ANOVA), utilizando-se o procedimento GLM do SAS¹³. As médias foram comparadas pela diferença mínima significativa (d.m.s.) do teste de *Student Newman Keuls (SNK)* ao nível de significância de 5%. Do conjunto de proteínas identificadas no soro sanguíneo, a ceruloplasmina, haptoglobina e α 1-glicoproteína ácida não apresentaram normalidade e foram submetidas à transformação logarítmica. Os dados foram expressos em média e desvios padrão, análise de regressão das frações protéicas, que apresentaram significância no teste F da ANOVA, foi realizada em função dos diferentes momentos de avaliação, adotando o nível de 5% de significância. A análise de correlação de Pearson de pares de variáveis das frações protéicas foi realizada adotando o nível de 5% de significância, sendo considerada alta quando $r > 0,60$; média quando $r > 0,30$ e $< 0,60$; e baixa quando $r < 0,30$ (Little & Hill 1978).

⁷ Vacutainer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA.

⁸ Centrífuga Fanem Ltda Baby I, Mod. 206, Av. General Ataliba Leonel, 1790, São Paulo, SP, Brasil.

⁹ Ultralow freezer NuAire Inc., 2100 Fernbrook Lane N. Plymouth, MN 55447, USA.

¹⁰ Proteína Total, Labtest Diagnóstica S.A., Av. Paulo Ferreira da Costa 600, Lagoa Santa, 33400-000, Minas Gerais, MG, Brasil.

¹¹ Sigma-Aldrich Corporation 3050 Spruce Street. St. Louis MO 63103, Missouri, USA.

¹² Shimadzu CS 9301, 1 Nishinokyo-Kuwabara-cho, Nakagyo-Ku, Kyoto 604-8511, Japan.

¹³ SAS Institute, Statistical Analysis Systems Institute, Inc. Cary, 2000.

O trabalho obteve parecer favorável da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal Rural de Pernambuco licença n. 017/2010 (6029/2010 D08) CEPE/UFRPE, de acordo com as normas sugeridas pelo COBEA e pelo *National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras permitiram a identificação de 24 a 30 proteínas, cujos pesos moleculares (PM) variaram de 15.000 a 277.000 Da. Os valores observados são demonstrados no Quadro 1.

Foram consideradas de interesse clínico e submetidas à protocolo estatístico, as seguintes proteínas: albumina, ceruloplasmina, transferrina, haptoglobina, α -1 glicoproteína ácida (GPA), PM 23.000 Da (proteína ainda não identificada nominalmente) e as imunoglobulinas IgA, IgG de cadeia pesada (IgG CP) IgG de cadeia leve (IgG CL) e IgG total (IgG CP + IgG CL), sendo que na avaliação clínica realizada nos momentos de observação, no qual era realizada a colheita do material, todas as ovelhas estudadas apresentaram-se saudáveis e com boa condição corporal.

Proteína total e Albumina. Apesar de não ser constatada diferença entre os momentos de observação ($P > 0,3434$), verificou-se que do momento que antecedeu ao parto até os 15/30 primeiros dias da lactação discreto decréscimo na concentração da proteína total, para posteriormente elevar-se gradativamente até a fase de desmame (90 dias), em que foi verificada concentração sérica média de 7,38 g/dL (Quadro 1 e Fig.1), não caracterizando um quadro de hipoproteinemia (Jain 1993). Assim como a proteína total, a concentração média da albumina não sofreu efeito do tempo pós parto ($P > 0,112$), apresentando valores médios de 3763,25 mg/dL (Quadro 1), no entanto, observa-se que do momento que antecede ao parto, até os primeiros dois meses de lactação ténue diminuição na concentração desta variável, apresentando aumento no último momento de avaliação (período de secagem) (Fig.1). Identificou-se alta relação positiva ($r = 0,60$) entre estas proteínas no soro sanguíneo das ovelhas no periparto, ratificando ser a albumina a principal proteína encontrada no soro sanguíneo, constituindo de 35% a 50% do total das proteínas séricas (Eckersall 2008). Os valores médios da concentração de albumina foram pouco inferiores aos relatados por Costa et al. (2010) e Diógenes et al. (2010), ambos trabalhando com ovelhas sadias e superiores aos citados por Eckersall (2008) em vacas. Resultados semelhantes aos observados neste estudo foram relatados por Pechová et al. (2002) em vacas de leite, no que diz respeito à uniformidade na concentração da albumina sérica no período antes e após o parto, mantendo-se nos padrões fisiológicos para a espécie estudada.

Ceruloplasmina - Não foi verificada diferença significativa nos valores obtidos de ceruloplasmina entre os momentos de observação ($P > 0,0950$), e os valores de concentração média foram de 63,45 mg/dL (Quadro 1, Fig.2), não caracterizando processo inflamatório, inclusive no período que antecede ao parto até os primeiros 15 dias de lactação. Em vacas foi relatado neste período elevação de algumas proteínas de fase aguda, como consequência do parto (Uchida et al. 1993, Kovác et al. 2009). A utilização da ceruloplasmina como biomarcador diagnóstico permanece menos comum que as outras proteínas de fase aguda, no entanto, tem sido demonstrado que esta proteína é um bom indicador de infecção em bovinos e ovinos (Pfeffer & Rogers 1989, Segelmark et al. 1997, Costa et al. 2010, Simplício 2011). Matos (2005), estudando proteínas de fase aguda em ovelhas da raça Santa Inês, verificou concentrações de ceruloplasmina, inferiores aos deste estudo, de 27,18 mg/dL, 35,00 mg/dL e 28,43 mg/dL, respectivamente, nos momentos pré parto, meio e final de lactação, empregando a metodologia da atividade oxidásica; por outro lado Simplício (2011) utilizando SDS PAGE verificou valores inferiores aos deste estudo em ovinos sadios, que variaram de 10,8 a 16,1 mg/dL.

Haptoglobina - Foi observada pequena elevação (Quadro 1) não significativa ($P > 0,6831$) da haptoglobina no período entre a fase final do parto e aos quinze primeiros dias da lactação, decrescendo gradativamente durante a lactação (Fig.2). Resultados semelhantes, nos quais não observou-se variação nesta proteína no periparto foram também relatados por Saini et al (1998) e Nazifi et al. (2008) em vacas e por Saut et al. (2009) em cabras. A elevação da concentração neste período poderia ser justificada como decorrente do momento do parto, com o posterior decréscimo, conforme relatado por Tóthova et al. (2008), que atribuiu o aumento em vacas saudáveis à condição de estresse. Os valores médios de haptoglobina encontrados neste estudo de 8,98 mg/dL foram inferiores

aos relatados por Costa et al. (2010) 12,40 mg/dL e Simplício (2011) 27,0 mg/dL, bem como inferiores a concentração de 20 mg/dL, citada por Skinner & Roberts (1994), como limiar mínimo para caracterizar a possibilidade de infecção ou inflamação, já que esta é uma das principais proteínas de fase aguda empregada como marcador inflamatório em ovinos (Skinner 2001, Costa et al. 2010).

Transferrina - Não foi observada diferença ($P>0,5465$) na concentração da transferrina do parto e ao longo da lactação, onde a concentração média verificada foi de 449,07 mg/dL (Quadro 1, Fig.3). Tal perfil é análogo ao encontrado por Costa et al. (2010), que relataram valores de 427,80 mg/dL e superiores aos encontrados por Simplício (2011) de $256\pm 21,9$ mg/dL, ambos empregando a espécie ovina. Em ruminantes esta proteína é considerada de fase aguda negativa (Jain 1993), estando envolvida na imunidade inespecífica, já que transporta íons férricos, que poderiam servir de substrato para o crescimento bacteriano, auxiliando a defesa do organismo contra agentes infecciosos (Murata et al. 2004), situação esta não evidenciada neste estudo, já que os animais apresentavam-se saudáveis.

Glicoproteína ácida - A concentração da α -1 glicoproteína ácida (GPA) manteve-se praticamente estável desde o momento que antecedeu o parto até os 60 dias pós parto, quando apresentou ligeiro aumento não significativo ($P>0,6646$), apresentando valores médios de 7,91 mg/dL (Quadro 1, Fig.3), corroborando os valores encontrados por Simplício (2011), relatou concentrações variando entre 8,3 a 10,1 mg/dL em soro de ovinos sadios. Diferentemente do observado neste estudo na espécie ovina, Saut et al. (2009) relata um aumento da concentração desta proteína durante o puerpério fisiológico de cabras, assim como Sheldon et al. (2001) em vacas. A α -1-glicoproteína ácida é uma importante proteína de fase aguda na clínica de ovinos, sendo utilizada no monitoramento de processos inflamatórios e infecções em geral (Eckersall et al. 2001).

PM 23000 Da - Não foi verificada diferença estatística ($P>0,6390$) nos valores médios da proteína não identificada nominalmente, cujo peso molecular era de 23.000 Da, que praticamente se manteve constante ao longo dos momentos de observação, apresentando valores médios de 201,24 mg/dL (Quadro 1). Esta proteína também foi relatada nos trabalhos de Rocha (2009) na espécie bovina, que salientaram a elevação nos teores desta proteína após a ingestão do colostro, aumentando gradativamente até os 30 dias de vida.

Imunoglobulinas

IgA - Não foi verificada alteração significativa ($P>0,2773$) na concentração sérica de IgA nos momentos de avaliação, onde esta classe de imunoglobulina apresentou valor médio de 41,80 mg/dL (Quadro 1), corroborando os valores citados por Tizard (2002) entre 10 a 50 mg/dL como de referência para IgA em ovinos. Apesar de não significativo estatisticamente, observa-se discreto decréscimo do momento que antecedeu ao parto até os 15 dias da lactação e posteriormente na fase de desmame (Fig.4). Esta variação está provavelmente relacionada à demanda de imunoglobulinas para a glândula mamária, elevando seus níveis na fase intermediária da lactação (maior produção de leite pela ovelha) momento em que esta classe de imunoglobulinas propicia a proteção das superfícies corpóreas dentre elas a glândula mamária contra a invasão de agentes infecciosos, prevenindo a aderência bacteriana (Jain 1993).

IgG total, IgG de cadeia leve (IgG CL) e IgG de cadeia pesada (IgG CP) - Os valores médios de IgG CL apresentaram aumento contínuo, apesar de não significativo ($P>0,0660$) a partir do primeiro mês de lactação (30DPP) até a fase de desmame aos 90 dias, com valor médio de 791,59 mg/dL (Quadro 1, Fig.5). Quanto a IgG de cadeia pesada, ressalta-se ser esta a única proteína de interesse identificada no traçado eletroforético em que foi observada diferença ($P<0,0008$) entre os momentos de observação onde as menores concentrações de 1.383,01 mg/dL e 1395,40 mg/dL foram verificadas no 10^o e 15^o dias de lactação, respectivamente. Posteriormente observa-se a elevação da concentração ($P<0,0008$) desta classe de imunoglobulina ao longo da lactação (Quadro 1, Fig.5). Observou-se, ainda, alta correlação da proteína total do soro sanguíneo com a IgG CL ($r = 0,61$), bem como da proteína total com a IgG CP ($r = 0,60$) ($P<0,0001$).

Considerando os resultados da IgG total, resultante da associação da IgG CL e IgG CP, observou-se um comportamento análogo a IgG CP, apresentando concentrações mais baixas na fase inicial da lactação, se elevando ($P<0,0020$) a partir do 30^o dia da lactação, com valores superiores a

2.500 mg/dL nos dois últimos estágios da lactação (Quadro 1, Fig.5). O crescimento linear e contínuo de IgG CP e IgG total ao longo da lactação, pôde ser ratificado pelo alto coeficiente de determinação (R^2) de 0,84 e 0,88, respectivamente (Fig.6).

As concentrações mais baixas da imunoglobulina G nos últimos 10 dias de gestação, bem como nos primeiros 15 e 30 dias de lactação podem ser justificados pela migração desta classe de imunoglobulina para a glândula mamária da ovelha no momento que precede o parto para a formação do colostro e posteriormente, em concentrações bem menores, para o leite. Essa variação também foi relatado por Ciuperescu (1977) ao avaliar a dinâmica das imunoglobulinas séricas (IgG1 e IgG2) em ovelhas durante a gestação e a lactação, empregando a técnica de imunodifusão radial, onde observaram o declínio, particularmente de IgG1 já nos momentos que anteciparam o parto, que se mantiveram baixas pelos dois primeiros meses de lactação, não se recuperando completamente nos quatro meses de acompanhamento.

A correlação positiva das concentrações séricas da proteína total com a imunoglobulina IgG também foi verificada por Tóthová et al. (2008) em vacas de leite, que atribuiu este comportamento como sendo decorrente não só da transferência das imunoglobulinas para a glândula mamária, como também da albumina, conforme também observado neste estudo com esta última variável.

CONCLUSÃO

As concentrações séricas de IgG no soro sanguíneo de ovelhas da raça Santa Inês, são mais elevadas no final da lactação. As demais proteínas albumina, ceruloplasmina, transferrina, haptoglobina, α -1 glicoproteína ácida, PM 23.000 Da e imunoglobulina A (IgA) não são influenciadas pelo parto nem pelo período de lactação.

Agradecimentos - Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (MCT CNPQ-Edital Universal – 14/2011) pelo auxílio financeiro e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Ensino Superior (CAPES) pela concessão da Bolsa de Demanda Social.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Braun J. P., Trumel C., Bézill P. 2010. Clinical biochemistry in sheep: a selected review. *Small Ruminant Research* 92:10–18.
- Ciuperescu D. D. 1997. Dynamics of serum immunoglobulin concentrations in sheep during pregnancy and lactation. *Research Veterinary Science* 22:23-27.
- Costa N. A. et al. 2010. Proteinograma e teores de cobre, ferro e zinco no soro de ovelhas da raça Santa Inês com mastite experimental por *Staphylococcus aureus*. *Pesq. Vet. Bras.* 30(5):435-442.
- Diogenes P. V. A. et al. 2010. Serum protein electrophoretic profile of goats infected with *Haemonchus contortus*. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 9(11):1603-1606.
- Eckersall P. D. et al. 2001. Acute phase protein in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. *Veterinary Record* 148:35-41.
- Eckersall P. D. 2008. Proteins, proteomics, and the dysproteinemia, 117-155. In: Kaneko J. J., Harvey J.W., Bruss M.L. (Eds), *Clinical biochemistry of domestic animals*, 6.ed. Academic Press, San Diego.
- Fagliari J. J. & Silva S. L. 2002. Hemograma e proteinograma plasmático de equinos hípidos e de equinos acometidos por abdômem agudo antes e após laparotomia. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 54(6):559-586.
- Grummer R. R. 1995. Impact of changes in organic nutrients metabolism on feeding the transition cow. *Journal of Animal Science* 73:2820-2833.

- Jain N. C. 1993. Schalm's veterinary hematology. 4ed. Lea & Febinger, Philadelphia, 417p.
- Kovac G. et al. 2009. Acute phase proteins and their relation to energy metabolites in dairy cows during the pre-and postpartal period. *Acta Veterinaria BRNO*. 78: 441-447.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Little T.M. & Hill F.J. 1978. *Agricultural experimentation – Design and Analysis*. John Wiley & Sons New, York, 350p.
- Mallard B. A. et al. 1998. Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. *Journal of Dairy Science* 81:585–595.
- Matos J. R. 2005. Proteínas de fase aguda em borregos e ovelhas nos períodos de pré-parto e lactação. *Dissertação Mestrado em Medicina Veterinária –Universidade Federal da Bahia, Salvador, 56f.*
- Murata H., Shimada N., Yoshioka M. 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *The Veterinary Journal* 168:28-40.
- Nazifi S. et al. 2008. Evaluation of serum haptoglobin in clinically healthy cattle and cattle with inflammatory diseases in Shiraz, a tropical area in southern Iran. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 11(2):95-101.
- Petersen H. H., Nielsen J. P., Heegard P. M. H. 2004. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet. Res.* 35:163-187.
- Pechova A. et al. 2002. Metabolic effects of chromium supplementation in dairy cows in the peripartal period. *Acta Veterinaria Burno* 71:9–18.
- Pfeffer A. & Rogers K. M. 1989. 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* 46:118-124.
- Rocha T. G. et al. 2009. Eletroforetograma das proteínas do soro lácteo de vacas canchim primíparas e pluríparas. In: *Congresso Brasileiro de Buiatria, 8. Anais...* Belo Horizonte: *Ciência Animal Brasileira, Suplemento 1.*
- Saini P. K. et al. 1998. Development of a simple enzyme immunoassay for blood haptoglobin concentration in cattle and its application in improving food safety. *American Journal Veterinary Research* 59:1101–1107.
- Sampaio I. B. M. 2007. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 3 ed.: FEP MVZ Editora, Belo Horizonte, 265p.
- Sas Institute Inc. 2000. *SAS user's guide: Statistical Analysis Systems Institute. Inc. Cary.*
- Saut J. P. E. et al. 2009. Influência do puerpério sobre o proteinograma sérico de caprinos da raça Saanen obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida. *Semina: Ciências Agrárias* 30(3):661-670.
- Segelmark M. et al. 1997. Binding and inhibition of myeloperoxidase (MPO): a major function of ceruloplasmin. *Clinical & Experimental Immunology*. 108:167-174.

- Sheldon I. M. et al. 2001. Acute phase protein responses to uterine bacterial contamination in cattle after calving. *Veterinary Record*. 148(6):172-175.
- Simplicio K. M. M. G. 2011. Leucograma e proteínas de fase aguda de ruminantes domésticos sadios e enfermos. Dissertação Mestrado - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 118p.
- Skinner J.G. 2001. International Standardization of Acute Phase Proteins. *Veterinary Clinical Pathology*. 30(1):2-7.
- Skineer J. G. & Roberts L. 1994. Haptoglobin as an indicator of infection in sheep. *The Veterinary Record*. 134(2):33-36.
- Tizard I. R. 2002. *Imunologia veterinária: uma introdução*. 6 ed.: Roca, São Paulo, 532p.
- Tóthová C. S. et al. 2008. Acute phase proteins and variables of protein metabolism in dairy cows during the pre and postpartal period. *Acta Veterinaria BRNO*. 77:51-57.
- Uchida E., Katoh N., Takahashi K. 1993. Appearance of haptoglobin in serum from cows at parturition. *Journal Veterinary Medical Science* 55:893-894.

LEGENDA DE FIGURAS

- Fig. 1. Valores médios da concentração da proteína total (g/dL) e da albumina (mg/dL) obtidos por SDS-PAGE em ovelhas Santa Inês no momento antes do parto (AP) e após o parto (PP) em diferentes estágios de lactação.
- Fig. 2. Valores médios da concentração da haptoglobina (mg/dL) e da ceruloplasmina (mg/dL) obtidos por SDS-PAGE em ovelhas Santa Inês no momento antes do parto (AP) e após o parto (PP) em diferentes estágios de lactação.
- Fig. 3. Valores médios da concentração da alfa 1 glicoproteína ácida (mg/dL) e da transferrina (mg/dL) obtidos por SDS-PAGE em ovelhas Santa Inês no momento antes do parto (AP) e após o parto (PP) em diferentes fases de lactação.
- Fig. 4. Valores médios da concentração da imunoglobulina A (IgA) (mg/dL) obtidos por SDS-PAGE em ovelhas Santa Inês no momento antes do parto (AP) e após o parto (PP) em diferentes fases de lactação.
- Fig. 5. Valores médios da concentração da imunoglobulina G (IgG) de cadeia pesada (IgG CP) (mg/dL) e IgG de cadeia leve (IgG CL) (mg/dL) obtidos por SDS-PAGE em ovelhas Santa Inês no momento antes do parto (AP) e após o parto (PP) em diferentes fases de lactação.
- Fig. 6. Coeficiente de determinação (R^2) e equações de regressão da concentração da IgG de cadeia pesada (IgG CP) (mg/dL) e IgG total (mg/dL) obtidos por SDS-PAGE em ovelhas Santa Inês ao longo dos momentos de avaliação.

QUADRO

Quadro 1. Valores médios, desvios-padrão, média geral e níveis de significância das concentrações das proteínas sanguíneas obtidas por SDS-PAGE de ovelhas Santa Inês no momento antes do parto e em diferentes fases da lactação.

Proteínas (mg/dL)	Antes do Parto(AP)		FASES DA LACTAÇÃO			Média Geral ± Desvio Padrão	Pr > F
	10 dias ap	15 dias pp	30 dias pp	60 dias pp	90 dias pp		
Proteína Total (g/dL)	7,38±0,73	7,25±0,70	7,24±0,85	7,47±0,60	7,57±0,80	7,38±0,74	0,3434
Albumina	3971,6±445,87	3797,4±542,82	3687,2±706,50	3594,6±608,55	3756,1±621,02	3763,25±596,29	0,1102
Ceruloplasmina	59,75±40,00	52,85±32,53	61,82±35,03	75,19±37,85	67,61±44,09	63,45±38,26	0,0950
Transferrina	469,15±89,85	452,98±99,21	435,39±87,35	446,64±79,48	437,20±91,68	449,07±89,19	0,5465
Haptoglobina	8,95±7,23	9,99±9,96	9,09±9,18	9,07±9,87	7,76±8,15	8,98±8,88	0,6831
GPA	7,67±4,85	7,84±4,98	7,77±5,05	7,43±5,16	9,02±8,15	7,91±5,66	0,6646
PM 23000	193,27±37,10	193,71±40,70	203,06±41,06	204,85±36,86	206,08±65,79	201,24±42,10	0,6390
IgA	40,28±34,23	37,03±21,84	47,52±30,69	46,82±31,54	34,37±22,83	41,80±29,18	0,2773
IgGCP	1383,01±304,81 ^B	1395,40±285,19 ^B	1457,01±280,93 ^B	1646,08±352,85 ^A	1610,85±382,72 ^A	1494,92±326,28	0,0008
IgG CL	724,22±183,90	749,95±198,74	759,38±211,08	856,20±214,34	831,19±270,26	791,59±221,10	0,0660
IgG Total	2107,23±472,45 ^B	2145,35±469,20 ^B	2216,37±473,26 ^{AB}	2502,28±549,24 ^A	2481,73±575,51 ^A	2286,50±529,36	0,0020

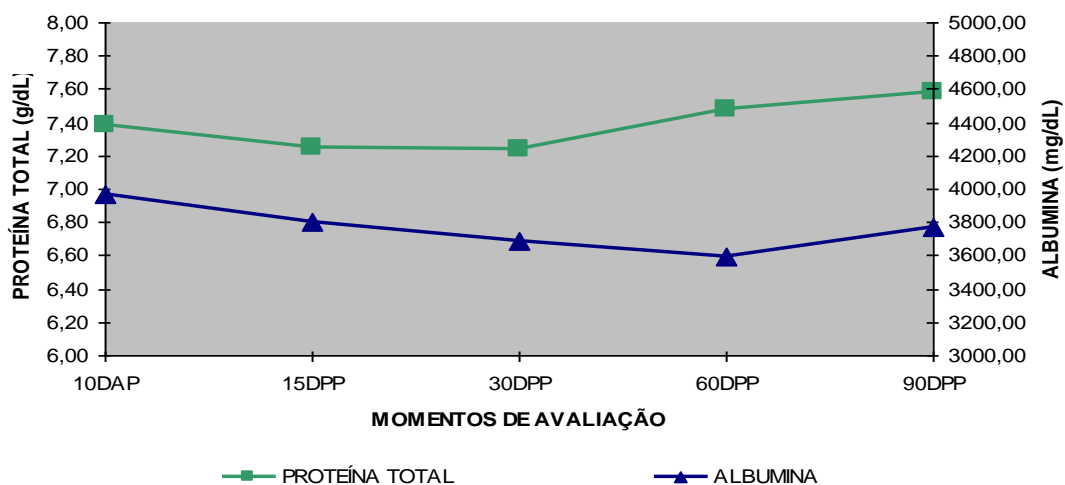


Figura 01

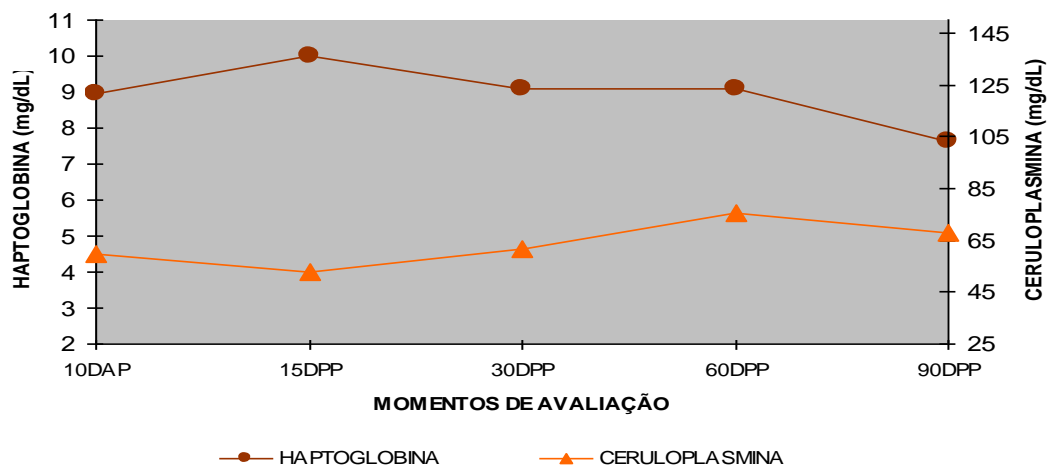


Figura 02

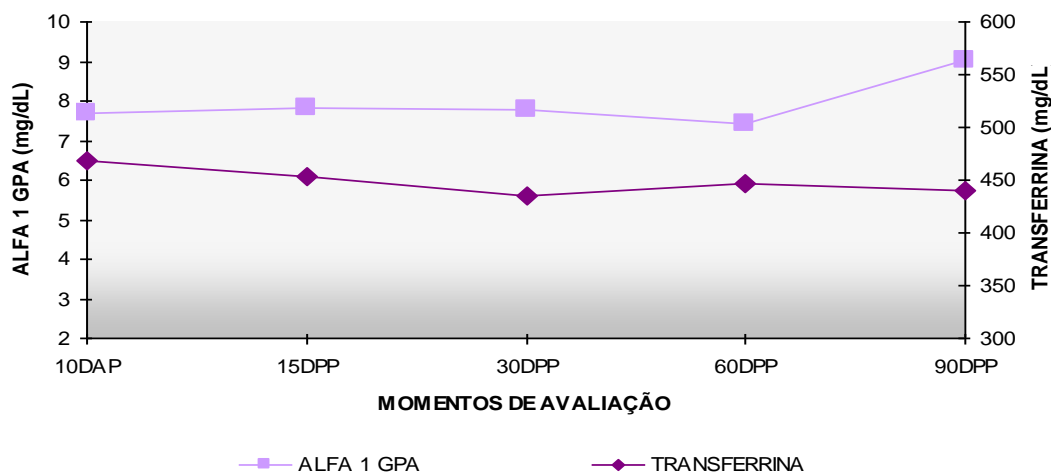


Figura 03

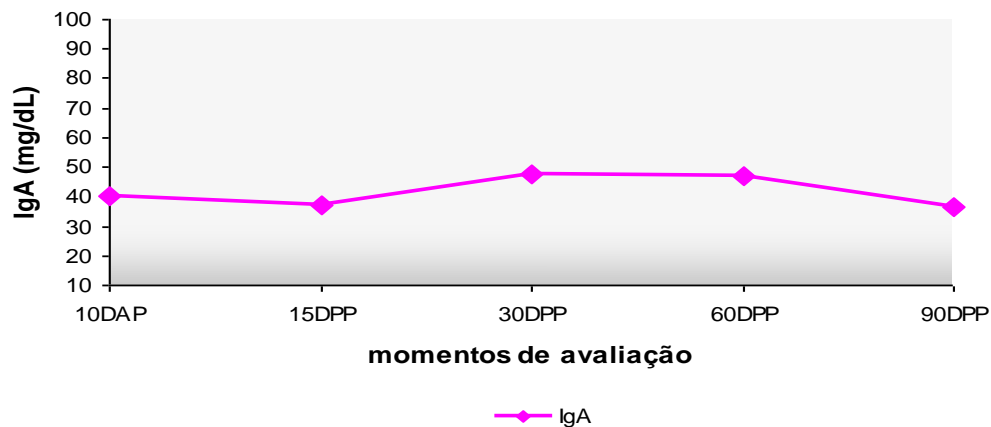


Figura 04

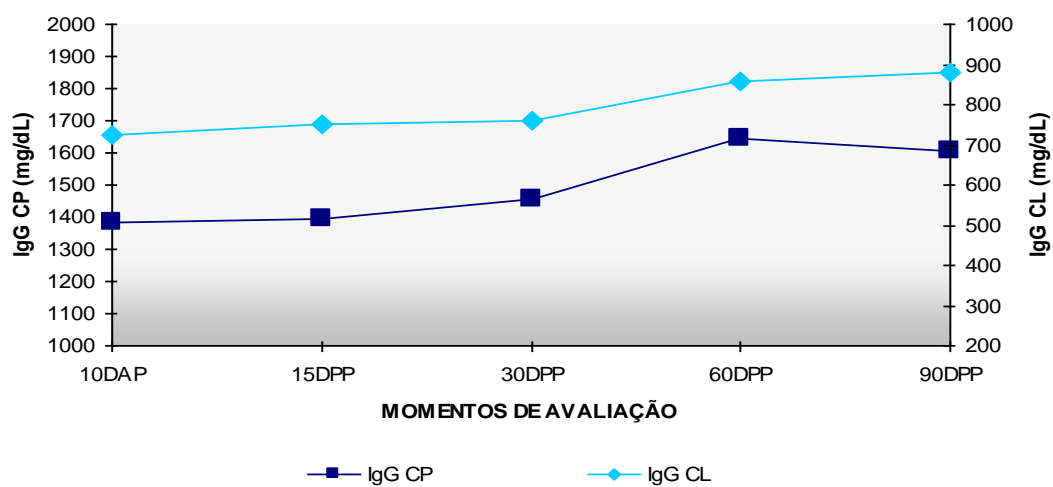


Figura 05

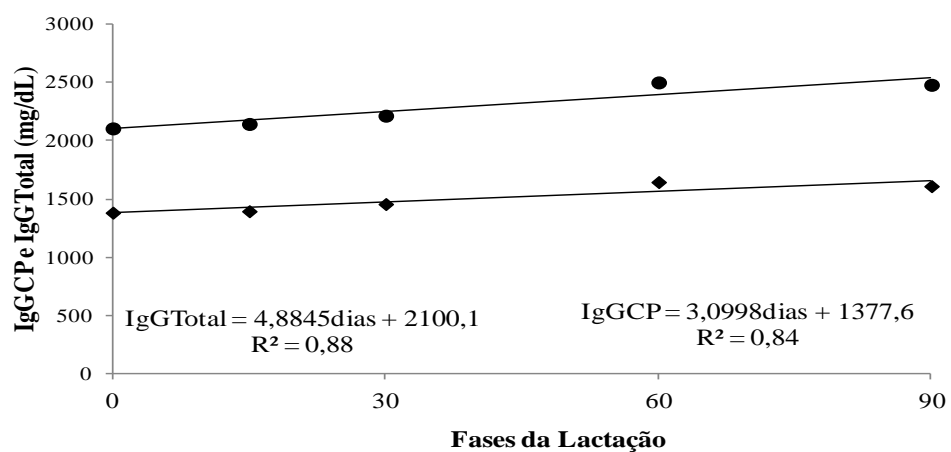


Figura 06

5.2 Artigo 2

PROTEINOGRAMA DO SORO LÁCTEO DE OVELHAS DA RAÇA SANTA INÊS EM DIFERENTES FASES DE LACTAÇÃO¹⁴

Vânia F. Lemos^{15*}, Eduardo L. S. Guaraná¹⁶, José A. B. Afonso¹⁷, José J. Fagliari¹⁸, Paulo C. Silva¹⁸, Pierre C. Soares¹⁹, Carla L. Mendonça¹⁷

ABSTRACT.- Lemos V.L., Guaraná E.L.S., Afonso J.A.B., Fagliari J.J., Silva P.C., Soares P.C., Mendonça C.L. [Proteinogram the whey protein of Santa Ines sheep breed in different stages of lactation] Proteinograma do soro lácteo de ovelhas da raça Santa Inês em diferentes fases de lactação. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Clínica de Bovinos, Campus Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Bom Pastor s/n, Cx. Postal 152, Mundaú, Garanhuns, PE 55292-901, Brazil. E-mail: vanialemos91@gmail.com

This work aimed evaluate influence of lactation phases on proteinogram of whey protein Santa Inês sheep. Sheep were accompanied in a semi-intensive system using the same sanitary and nutritional management evaluated at 15, 30, 60 and 90 days postpartum (end of weaning and lactation). Clinical examination of the mammary gland was carried out through and bacteriological culture. The screening of the material resulted in 44 milk samples of healthy glands concurrent negative by CMT and bacteriological culture exam. For obtaining the whey protein Renin solution was used. The whey was fractionated into aliquots and kept in the -80C freezer to later separation of protein fractions. For determination of total protein of whey protein was employed the biuret, observing the linearity of the test. Separation of protein fractions was performed, using polyacrylamide gel containing sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE). Eighth protein were observed including lactoferrin, serum albumin, IgA, IgG (heavy chain IgG (IgG CP), light chain IgG (IgG CL), β -lactoglobulin, α -lactalbumin and proteins identified as PM 15000 and PM 29000. No significant difference was observed at different stages of lactation in the following protein: IgA ($P < 0.3895$), lactoferrin ($P > 0.1611$), PM 29000 ($P > 0.4879$), α -lactalbumin ($P > 0.0799$) and PM15000 ($P > 0.4494$). In total protein ($P < 0.0022$), albumin protein ($P < 0.0377$) and IgG ($P < 0.0354$) it was observed a significant variation in the first moments of observations, in the β -lactoglobulin protein ($P < 0.0005$) there was significant variation with reduction of 15 to 30 days postpartum with progressive elevation until the last stage of lactation (90 days postpartum). The SDS-PAGE technique allowed the quantification of eighth whey proteins in health sheep. The protein fractions identified reflect the profile of whey to ovine species, with influence of stages of lactation in albumin, IgG and β -lactoglobulin.

INDEX TERMS: Post partum, lactation, small ruminants, milk, SDS-PAGE.

¹⁴ Recebido em

Aceito para publicação em

Parte da Dissertação do primeiro autor no Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

¹⁵ Programa de Pós-graduação em Sanidade e Reprodução em Ruminantes/UFRPE. Av.: Bom Pastor, s/n. Caixa postal 152 - Boa Vista. CEP 55292-270. Garanhuns-PE. *Autor para correspondência: vanialemos91@gmail.com

¹⁶ Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária/ UFRPE. Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife- PE. CEP 52171-030.

¹⁷ Clínica de Bovinos, Campus Garanhuns,/ UFRPE. Av.: Bom Pastor, s/n. Caixa postal 152 - Boa Vista. CEP 55292-270. Garanhuns-PE. carlalopes.mendonca@gmail.com

¹⁸ Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, UNESP, Campus Jaboticabal, Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellani, s/n, Jaboticabal –SP. CEP 14884-900.

¹⁹ Departamento de Medicina Veterinária/ UFRPE. Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife-PE. CEP 52171-030.

RESUMO.- No presente estudo objetivou-se avaliar a influência das fases de lactação sobre o proteinograma do soro lácteo de ovelhas da raça Santa Inês. Foram acompanhadas ovelhas em sistema de criação semi-intensivo com o mesmo manejo higiênico, sanitário e nutricional avaliadas aos 15, 30, 60 e 90 dias após o parto (final da lactação e desmame). Procedeu-se ao exame clínico da glândula mamária e triagem e cultivo bacteriológico. A triagem do material resultou em 44 amostras de leite de glândulas sadias baseadas no exame negativo simultâneo do CMT e do bacteriológico. Para a obtenção do soro lácteo utilizou-se solução de renina. O soro lácteo foi fracionado em alíquotas e mantido em freezer a -80°C para posterior separação das frações protéicas. Para determinação da proteína total do soro lácteo empregou-se o *biureto*. A separação das frações protéicas foi realizada utilizando-se eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Foram observadas oito proteínas entre elas lactoferrina, albumina sérica, IgA, IgG (IgG de cadeia pesada - IgG CP e IgG de cadeia leve - IgG CL), β -lactoglobulina, α -lactoalbumina e as proteínas identificadas como PM 15.000 Da e PM 29.000 Da. Não foi observada diferença significativa nas diferentes fases de lactação nas seguintes proteínas: IgA ($P>0,3895$), lactoferrina ($P>0,1611$), PM 29000 ($P>0,4879$), α -lactoalbumina ($P>0,0799$) e PM 15000 ($P>0,4494$). Na proteína total ($P<0,0022$) e nas proteínas albumina ($P<0,0377$), IgG ($P<0,0354$) verificou-se variação significativa nos primeiros momentos de observação, na proteína β - lactoglobulina ($P<0,0005$) verificou-se variação significativa com diminuição dos 15 até 30 dias pós parto com elevação progressiva até a última fase de lactação (90 dias pós parto). A técnica de SDS-PAGE permitiu a quantificação de oito proteínas no soro lácteo de ovelhas sadias. As proteínas identificadas refletem o perfil do soro lácteo para a espécie ovina, havendo influência das fases da lactação na concentração albumina, IgG e β -lactoglobulina.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: pós parto, lactação, pequenos ruminantes, leite, SDS-PAGE.

INTRODUÇÃO

As proteínas do leite, na sua grande maioria, são sintetizadas na própria glândula mamária, pelas células secretoras alveolares ou tem origem plasmática. A caseína responde por mais de 80% da constituição das proteínas totais do leite e a proporção relativa das proteínas do soro lácteo frente à caseína variam segundo o estágio de lactação. Geralmente o leite produzido nos primeiros dias depois do parto e no final da lactação tem um conteúdo de proteínas do soro superior ao leite da fase intermediária da lactação. Este incremento está acompanhado de níveis elevados de proteínas oriundas do soro sanguíneo (Varnam & Sutherland 1995).

A exata composição das proteínas lácteas varia entre as espécies animais, sendo que a maioria (80% a 95%) é sintetizada nas células epiteliais da glândula mamária incluindo a caseína, α -lactoalbumina, β -lactoglobulina e lactoferrina, enquanto que as imunoglobulinas e a albumina sérica são proteínas derivadas do sangue e incorporadas às células epiteliais da glândula mamária (Burgoyne & Duncan, 1998). Geralmente durante as fases de lactação, os principais componentes do leite de ovelha variam seguindo uma curva inversa a da produção de leite, as concentrações de gordura, sólidos totais (caseína e proteínas do soro lácteo) se elevam no início e final da lactação e se encontram em baixos níveis no meio da lactação, quando a produção de leite é máxima (Bencini 2001, Velasco et al. 2001).

A concentração das proteínas e peptídeos presentes no leite pode ser influenciada por vários fatores, dentre os quais a raça, o estado de saúde, as fases da lactação, o sistema de alimentação, bem como o sistema e frequência de ordenha (Gopal & Gill, 2000).

Na secreção láctea da ovelha e da cabra, as principais proteínas presentes no leite são similares àquelas encontradas no leite da vaca. A caracterização das proteínas ocorre em duas fases distintas, uma na fase micelar composta pela caseína, a outra nas proteínas do soro lácteo (α -lactoalbumina, β -lactoglobulinas, imunoglobulinas e albumina sérica (Borková & Snaselová 2005, Park et al. 2007).

O período após o parto é caracterizado por mudanças significativas na glândula mamária, entre as quais a produção do colostro, que apresenta composição diferente da secreção láctea obtida quando o animal está em plena lactação; esta situação ocorre como decorrência de alterações na concentração das proteínas do sangue para o colostro e do colostro ao leite durante o pós parto (Schalm et al. 197, Levieux & Ollier 1999).

A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) é uma técnica também empregada na separação das proteínas do leite, permitindo a identificação de várias frações protéicas, bem como sua quantificação, propiciando a visualização de 20 a 30 proteínas com pesos moleculares que variam entre 24.000 a 340.000 dáltons (Da) (Fagliari & Silva 2002, Patel et al. 2007).

A caracterização, tanto sob o ponto de vista qualitativo, como quantitativo das proteínas do soro lácteo, está documentada na vaca (Sant'ana 2004, Raimondo et al. 2009, Rocha et al. 2009) e na cabra (Raimondo et al. 2011), no entanto em ovelhas a literatura é bastante escassa, particularmente se tratando do acompanhamento em diferentes estágios da lactação.

Diante do exposto, este estudo tem por objetivo avaliar a influência das fases de lactação sobre o proteinograma do soro lácteo de ovelhas da raça Santa Inês híginas.

MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente foram avaliadas ovelhas da raça Santa Inês, oriundas de rebanho comercial da região, criadas em sistema de manejo semi-intensivo sob as mesmas condições higiênicas, sanitárias e nutricionais, acompanhadas em diferentes fases de lactação (15 dias, 30 dias, 60 dias e 90 dias após o parto, período em que era estabelecido o desmame na região).

O exame clínico dos animais e das respectivas glândulas mamárias foi realizado em todos os momentos experimentais e seguiu as recomendações de Diffay et al. (2005). Os resultados do *California Mastitis Test* (CMT) foram interpretados de acordo com Shalm et al. (1971).

As ovelhas selecionadas para este estudo (n = 11) e as respectivas glândulas acompanhadas ao longo das fases de lactação (n = 44), foram triadas após resultado simultâneo negativo no CMT e no cultivo bacteriológico do leite, bem como no exame clínico das glândulas, caracterizando a higidez da glândula mamária.

Inicialmente foram colhidos dez mL de leite para realização do proteinograma e posteriormente, após rigorosa antisepsia do óstio do teto com álcool a 70%, aproximadamente três mL de leite em tubos esterilizados para realização do exame bacteriológico.

As amostras foram acondicionadas sob refrigeração, em caixa de material isotérmico e transportadas ao laboratório para processamento. O cultivo bacteriológico foi realizado seguindo as recomendações do *National Mastitis Council* (1990) e a caracterização bioquímica de acordo com Quinn et al. (1994).

As amostras de leite empregadas no perfil eletroforético foram estocadas e mantidas em ultrafreezer²⁰ a -80°C.

Para a realização do proteinograma obteve-se inicialmente o soro lácteo empregando-se a técnica descrita por Schalm et al. (1971) adotando-se algumas adaptações em decorrência da menor quantidade de leite produzido pela ovelha, quando comparado à vaca, conforme descrito a seguir. Inicialmente, as amostras de leite após o descongelamento em banho-maria a 37°C foram homogeneizadas em vortex²¹; para cada 1.000 µL de leite foram adicionados 75 µL de solução de renina²² mantidos em banho maria a 37°C por aproximadamente 20 minutos e centrifugadas a 21.000G durante dez minutos em centrífuga refrigerada²³.

Posteriormente a fração intermediária, resultante da solução trifásica, correspondente ao soro lácteo, foi fracionada em tubos tipo eppendorf e mantidas em ultrafreezer¹⁸ a -80°C para posterior separação das frações protéicas. A determinação da proteína total do soro lácteo foi realizada empregando-se reagente comercial²⁴, observando-se a linearidade do teste para este espécime clínico.

A separação das proteínas lácteas foi realizada utilizando-se a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme descrito por Laemmli (1970) e Fagliari & Silva (2002). Para a identificação das proteínas do soro lácteo foi empregada como

²⁰ Ultralow freezer NuAire Inc., 2100 Fernbrook Lane N. Plymouth, MN 55447, USA.

²¹ Quimis Aparelhos Científicos Ltda. Rua Gema 278, Diadema, São Paulo.

²² Coalho Estrella®, Chr. Hansen Brasil Ind. e Com. LTDA, Valinhos, São Paulo, Brasil.

²³ Mikro 200R Hettich-Zentrifugern, Föhrenstr. 12 D 78532 Tuttlingen, Germany.

²⁴ Proteína Total, Labtest Diagnóstica S.A., Av. Paulo Ferreira da Costa 600, Lagoa Santa, 33400-000, Minas Gerais, MG, Brasil.

referência solução marcadora²⁵ com diversos pesos moleculares (6.500 – 200.000 Da) e as proteínas purificadas lactoferrina, β -lactoglobulina e a α -lactoalbumina bovinas. A determinação das concentrações protéicas foi obtida por meio de densitômetro computadorizado²⁶. Em função do protocolo utilizado, a imunoglobulina G (IgG) foi separada em duas cadeias, cadeia leve (IgG CL) e cadeia pesada (IgG CP), decorrentes do uso do 2-mercaptoetanol na solução tampão, empregada na preparação das amostras para a corrida eletroforética em gel poliácridamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

Os resultados, que não atenderam as premissas de normalidade foram submetidos à transformação logarítmica de base dez e posteriormente a análise de variância (ANOVA), utilizando-se o procedimento GLM do SAS²⁷. As médias foram comparadas pela diferença mínima significativa (d.m.s.) do teste de *Student Newman Keuls* (SNK) ao nível de significância de 5%.

As concentrações das imunoglobulinas IgA e IgG CL, bem como as proteínas de PM 15.000 Da e PM 29.000 Da não apresentaram distribuição normal, no entanto os resultados foram expressos em médias e desvios-padrão. A análise de regressão das proteínas identificadas no soro lácteo, que tiveram significância no teste F da ANOVA foi realizada em função dos momentos de avaliação correspondendo as fases de lactação, adotando o nível de 5% de significância. A análise de correlação de Pearson foi realizada adotando o nível de 5% de significância, sendo considerada alta quando $r > 0,60$; média quando $r > 0,30$ e $< 0,60$; e baixa quando $r < 0,30$ (Little & Hill 1978).

O trabalho obteve parecer favorável da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal Rural de Pernambuco com a licença n. 017/2010 (6029/2010 D08) CEPE/UFRPE de acordo com as normas do COBEA e *National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fracionamento eletroforético do soro lácteo de glândulas mamárias sadias em diferentes fases de lactação, permitiu a observação de 11 a 22 proteínas com pesos moleculares variando entre 11.000 a 251.000 Da, propiciando a identificação/quantificação de oito proteínas de interesse, submetidas à análise estatística, entre elas: IgA, lactoferrina, albumina, IgG (IgG de cadeia pesada - IgG CP e IgG de cadeia leve - IgG CL), PM 29.000 Da, β -lactoglobulina, PM 15.000 Da e α -lactoalbumina (Quadro 1).

A técnica de eletroforese em gel de poliácridamida se revelou bastante satisfatória na identificação e quantificação das proteínas presentes no soro lácteo das ovelhas, permitindo a detecção de concentrações mínimas protéicas, assim como realizado anteriormente na vaca (Sant'ana 2004; Raimondo et al. 2009, Rocha et al. 2009) e na cabra (Raimondo et al. 2011).

Proteína total (PT) - No que diz respeito à concentração da proteína total do soro lácteo, foi observada diferença ($P < 0,0022$) entre os estágios da lactação. As maiores concentrações foram verificadas na fase inicial (1,91 g/dL) e final da lactação (1,91g/dL), apresentandoos menores valores aos 30 dias da lactação (1,64 g/dL) (Quadro 1, Fig.1). As maiores concentrações de proteína total nas fases inicial e final da lactação corroboram os achados de Bencini et al. (2001) e Velasco et al. (2001), que observaram variação na concentração dos principais componentes do leite de ovelhas, que apresentaram um perfil inverso ao da produção de leite (início e final da lactação). Resultados semelhantes foram relatados em vacas por Auldish et al. (1995) que encontraram aumento das concentrações de proteína total do soro lácteo no início e no terço final da lactação, assim como na fase inicial aos citados por Sant'ana (2004) e Raimondo et al. (2009). Valores superiores de proteína total no soro lácteo de ovelhas foram relatados por Cozma (2,33 g/dL), independente da fase de lactação, provavelmente por empregarem outra metodologia de determinação.

Albumina sérica - As maiores concentrações de albumina foram observadas na fase inicial da lactação 140,41 mg/dL, diminuindo significativamente ($P < 0,0377$) até o 30º dia e permanecendo estável até a fase final (90 dias pós parto), quando apresentou discreto aumento (Quadro 1, Fig.1).

²⁵ Sigma- Aldrich Corporation 3050 Spruce Streer, St. Louis MO 63103, Missouri, USA.

²⁶ Shimadzu CS 9301, 1Nishinokyo-Kuwabara-cho, Nakagyo-ku, Kyoto 604-8511, Japan.

²⁷ Institute, Statistical Analysis Systems Institute, Inc. Cary, 2000.

Confrontando estes achados com a literatura pesquisada, verificou-se que os valores obtidos neste estudo foram superiores aos descritos por Nudda et al. (2003) 61,0 mg/dL, também em ovelhas, no entanto, empregando outro protocolo na técnica SDS PAGE.

Sant'ana (2004) avaliando o soro lácteo de vacas, não observou influência das fases de lactação na concentração de albumina, no entanto Raimondo et al. (2009), também trabalhando com a mesma espécie animal, verificaram diminuição nos valores desta variável na fase final de lactação.

As maiores concentrações de albumina encontradas neste trabalho na fase inicial da lactação, possivelmente foi reflexo da fase colostrar, pois proteínas oriundas do sangue como a albumina, imunoglobulinas e transferrina apresentam concentrações mais elevadas no colostro (Leviex & Ollier 1999). Por outro lado, Leviex & Ollier (1999) observaram diminuição significativa na concentração de albumina nos primeiros 30 dias de lactação.

Imunoglobulinas -IgA - Não foi observado influência das fases de lactação sobre a concentração da IgA ($P>0,3895$), e os valores médios encontrados foram de 2,72 mg/dL (Quadro 1). No entanto, verificou-se um discreto decréscimo ao longo da lactação, conforme pode ser visualizado na Fig.2. Os achados do presente estudo assemelham-se aos verificados por Schalm et al. (1971), Sant'ana (2004) e Raimondo et al. (2009), que também relataram diminuição dos valores de IgA durante a lactação. Segundo Guidry et al. (1980) a IgA apresenta diminuição logo após o parto e durante a lactação em virtude de alterações no gradiente de concentração resultante do aumento da síntese do leite.

IgG CL - Não foi observada diferença ($P>0,3333$) na concentração de IgG CL sendo encontrado valores médios de 45,01 mg/dL, conforme fig.2.

IgG CP e IgG total - Quanto a IgG de cadeia pesada, verificou-se diminuição significativa ($P<0,0005$) desta variável nos primeiros 30 dias da lactação, sendo observado o mesmo comportamento para as concentrações de IgG total ($P<0,0354$) (Quadro 1, Fig.3), com alta correlação entre ambas ($r = 0,82$; $P<0,0001$), caracterizando a determinante participação de IgG de cadeia pesada na concentração final da imunoglobulina G. Portanto pode-se afirmar haver influência das fases da lactação na concentração da IgG do soro lácteo, onde verificou-se decréscimo desta classe de imunoglobulina nos primeiros 30 dias da lactação, provavelmente ainda resíduo da fase colostrar, momento em que se observa maior concentração desta imunoglobulina, predominante no colostro de ruminantes, após serem transferidas do plasma sangüíneo para a glândula mamária (Guidry et al. 1980, Caffin & Poutrel 1988, Quiles et al. 1992, Leviex & Ollier 1999, Sant'ana 2004, Raimondo et al. 2009).

Os valores observados da concentração de IgG foram inferiores aos relatados por Nudda et al. (2003) 383,0 mg/dL, também trabalhando com ovelhas sadias, no entanto ressalta-se que os protocolos empregados foram distintos, apesar de ambos empregarem a técnica SDS-PAGE.

Foi observada média correlação positiva entre a IgG e a proteína total ($r = 0,41$; $P<0,0085$), que pode ser justificada pela alta concentração de IgG na fase inicial da lactação como consequência da transudação das imunoglobulinas do plasma sangüíneo para o interior da glândula mamária (Schalm 1971).

Lactoferrina - Não foi constatada diferença ($P>0,1611$) na concentração de lactoferrina ao longo da lactação, observando-se valores médios de 24,18 mg/dL (Quadro 1, Fig.4), corroborando os relatos de Nudda et al. (2003) que descreveram concentrações de 28,0 mg/dL desta proteína no soro lácteo de ovelhas da raça Sarda. Resultados semelhantes também foram descritos em vacas por Hagiwara et al. (2003) e Sant'ana (2004), que não observaram influência das fases de lactação na concentração de lactoferrina.

No último momento de observação, aos 90 dias, verifica-se valores de lactoferrina superiores aos da fase intermediária, apesar de não significativo ($P>0,1611$), o que poderia estar relacionado ao início do processo de secagem, conseqüentemente diminuição da produção de leite, que segundo Welty et al. (1975) seria um indicador do processo de involução da glândula mamária, funcionando como um mecanismo de defesa da glândula, tendo em vista a capacidade desta proteína de ligação ao ferro.

Concentrações de lactoferrina mais elevadas no final de lactação foi relatado em cabras por Hiss et al. (2008), diferentemente do observado em vacas por Raimondo et al. (2009) e Rocha et al. (2009), que obtiveram menores valores desta proteína na fase final lactação.

Proteínas de PM 15.000 Da e PM 29.000 Da – Em ambas as proteínas identificadas pelo peso molecular não foi observada influência das fases de lactação ($P > 0,4494$; $P > 0,4879$, respectivamente). A proteína de PM 15.000 Da apresentou valores médios de 12,10 mg/dL e a de P.M. 29.000 Da valores de 71,61 mg/dL. Em pesquisa compulsada não encontrou-se citações das respectivas proteínas no soro lácteo de ovelhas para confronto dos resultados, necessitando ampliar os estudos.

β -Lactoglobulina - Em relação aos valores de β -lactoglobulina observou-se influência das diferentes fases de lactação ($P < 0,0005$). As menores concentrações foram observadas aos 30 dias (1.022,43 mg/dL) e as maiores (1.300,01 mg/dL) (Quadro 1) identificadas na fase final da lactação (90 dias pós parto), conforme pode ser observado na fig.9. Dentre as proteínas identificadas no soro lácteo, foi a observada em maior concentração, conforme relatado por Schalm et al. (1971). Valores inferiores desta proteína foram citados por Nudda et al. (2003) 478,0 mg/dL, em ovelhas, no entanto utilizando protocolo distinto do empregado neste estudo. Em vacas, Sant'ana (2004) relatou resultados semelhantes, nos quais verifica-se maiores concentrações na fases inicial e final de lactação e Raimondo et al. (2009) apenas na fase inicial no soro lácteo.

α -Lactoalbumina – Não foi observada diferença ($P > 0,0799$) na concentração da α -lactoalbumina durante a lactação, apresentando valores médios de 280,25 mg/dL, no entanto verifica-se um decréscimo gradativo desta variável a partir dos 30 dias até o momento final de avaliação (Quadro 1, Fig.6). A concentração média observada desta variável foi superior a relatada por Nudda et al. (2003) de 137,0 mg/dL no soro lácteo de ovelhas, que também verificaram diminuição da concentração de α -lactoalbumina na fase final da lactação. Pesquisas com vacas demonstraram que a concentração de α -lactoalbumina tende a decrescer durante a lactação, sendo esta redução atribuída à diminuição da síntese de lactose (Prosser & McLaren 1997). A diminuição do teor da lactose na fase final da lactação também foi relatada no leite de glândulas mamárias sádisas de ovelhas da raça Santa Inês (Guaraná, 2011). Por outro lado, maiores concentrações desta proteína no final da lactação foram relatados em cabras por Quiles et al. (1992) empregando o fracionamento eletroforético e em vacas por Sant'ana (2004) e Raimondo et al. (2009), estes últimos autores também na fase colostrada.

CONCLUSÃO

O perfil eletroforético do soro lácteo de ovelhas da raça Santa Inês permitiu a identificação de oito proteínas, podendo-se constatar a influência das fases de lactação sobre as concentrações de albumina, imunoglobulina G e β -lactoglobulina.

Agradecimentos.- Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (MCT CNPQ- Edital Universal – 14/2011) pelo auxílio financeiro e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Ensino Superior (CAPES) pela concessão da Bolsa de Demanda Social.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adlerova L., Bartoskovai A., Faldyna M. 2008. Lactoferrin: a review. Veterinarni Medicina. Czech Republic 53(9):457-468.
- Auldist M. J. et al. Changes in the composition of milk from healthy and mastitic dairy cows during the lactation cycle. Australian Journal of Experimental Agriculture 35(4):427-436.
- Bencini R. 2001. Factors affecting the quality of Ewes milk. In: Dairy Sheep Symposium. Wisconsin. Anais....Wisconsin: Wisconsin Sheep Dairy Cooperative, p. 61-92.
- Borkova M. & Snaselová J. 2005. Possibilities of different animal milk detection in milk and dairy products – a Review. Czech J. Food Sci. 23(2):41-50.
- Burgoyne R. D. & Duncan J. 1998. Secretion of milk proteins. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia 3(3):275-286.

- Caffin, J. P. & Poutrel B. 1988. Physiological and pathological factors influencing bovine immunoglobulin G2 concentration in milk. *Journal of Dairy Science* 71:2035-2043.
- Cozma A. et al. 2011. Proteins profile in milk three species of ruminants. *Notulae Scientia Biologicae* 3:26-29.
- Diffay B. C. 2005. Abordagem e exame de ovinos e caprinos. In: PUGH, D.G. Clínica de ovinos e caprinos. Roca, São Paulo, p. 1-19.
- Fagliari J. J. & Silva S. L. 2002. Hemograma e proteinograma plasmático de eqüinos hípidos e de eqüinos acometidos por abdômem agudo antes e após laparotomia. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 54(6): 559-586.
- Guaraná E.L.S. 2011. Dinâmica da infecção intramamária em ovelhas da raça Santa Inês acompanhadas durante a lactação e seu impacto sobre a composição físico-química do leite. Dissertação Mestrado em Ciência Veterinária - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 76p.
- Guidry A. J. et al. 1980. IgA, IgG1, IgG2, IgM in BSA serum and mammary secretion throughout lactation. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1:329-341.
- Gopal P. K. & Gill H. S. 2000. Oligosaccharides and glycoconjugates in bovine milk and colostrum. *British Journal of Nutrition* 84:69-74.
- Hagiwara S. et al. 2003. Lactoferrin concentrations in milk from normal and subclinical mastitic cows. *Journal of Veterinary Medical Science* 65:319-323.
- Hiss S., Meyer T., Sauerwein H. 2008. Lactoferrin concentrations in goat milk throughout lactation. *Small Ruminant Research* 80:87-90.
- Kato K., Mori K., Katoh N. 1989. Different proteins patterns in normal and mastitic milks by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamida gel electrophoresis. *Japanese Journal Veterinary Science* 51(6):1275-1278.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Levieux D. & Ollier A. 1999. Bovine immunoglobulins G, β -lactoglobulin, α -lactoalbumin and serum albumin in colostrums and milk during the early post partum period. *Journal of Dairy Research* 66(3):421-430.
- Little T. M. & Hill F. J. 1978. *Agricultural experimentation - Design and Analysis*. John Wiley & Sons, New York, 350p.
- National Mastitis Council. 1990. *Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection*. 3ed. NMC, Arlington, 34p.
- Nudda A. et al. 2003. Effects of lactation stage, parity, α -lactoglobulin genotype and milk SCC on whey protein composition in Sarda dairy ewes. *Ital. J. Anim. Sci.* 2:29-39.
- Park, Y. W. et al. 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* 68:88-113.
- Patel H. A. et al. 2007. Methods to determine denaturation and aggregation of proteins in low, medium and high heat skim milk powders. *Lait* 87:251-268.

- Prosser C. G. & McLaren R. D. 1997. Effect of atropine on milk protein yield by dairy cows with different β -lactoglobulin phenotypes. *Journal Dairy Science* 80:1281- 1287.
- Qian Z. Y., Samour J. P., AM, F. 1995. Isolation and characterization of sheep lactoferrin, an inhibitor of platelet aggregation and comparison with human lactoferrin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1234:25-32.
- Quinn P. J. et al. 1994. *Clinical Veterinary Microbiology*, Mosby, Philadelphia, 648p.
- Quiles A. et al. 1992. Fraccionamiento eletroforético de las proteínas de leche de cabra de raza Murciano-Granadina. *Na Vet.* 8:7-13.
- Raimondo R. F. S. et al. 2009. Influência da fase de lactação nas proteínas do soro lácteo de vacas jersey. In: Congresso Brasileiro de Buiatria, 8. Anais... Belo Horizonte: Ciência Animal Brasileira, Suplemento 1, p. 732.
- Rocha T. G. et al. 2009. Eletroforetograma das proteínas do soro lácteo de vacas canchim primíparas e pluríparas. In: Congresso Brasileiro de Buiatria, 8. Anais... Belo Horizonte: Ciência Animal Brasileira, Suplemento 1.
- Sant'ana V. A. C. 2004. Proteinograma do leite de vacas: padrões e variabilidade. Tese Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 161p.
- Sas Institute Inc. 2000. SAS user's guide: Statistical Analysis Systems Institute. Inc. Cary.
- Schalm O. W., Carrol E. J., Jain N. C. 1971. In: *Bovine mastitis*. Lea & Febiger, Philadelphia, 360 p.
- Velasco S. et al. 2001. Producción lechera y composición lipídica de la leche de ovejas Talaveranas durante el período de lactancia. *Invest. Ag.: Prod. Sanid. Anim.* 16(1):181-192.
- Welty F. K., Larry Smith, K., Schanbacher L.F. 1975. Lactoferrin concentration during involution of the bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science* 59(2):224-231.

LEGENDA DAS FIGURAS

Fig.1- Valores médios da concentração da proteína total (g/dL) e da albumina (mg/dL), obtidos por SDS-PAGE, no soro lácteo de glândulas mamárias sadias de ovelhas Santa Inês em diferentes fases de lactação.

Fig.2- Valores médios da concentração da imunoglobulina IgA e IgG CL (mg/dL), obtidos por SDS-PAGE, no soro lácteo de glândulas mamárias sadias, de ovelhas Santa Inês em diferentes fases de lactação.

Fig.3- Valores médios da concentração da IgG CP (mg/dL) e IgG Total (mg/dL), obtidos por SDS-PAGE, no soro lácteo de glândulas mamárias sadias, de ovelhas Santa Inês em diferentes fases de lactação.

Fig.4- Valores médios da concentração de lactoferrina (mg/dL), obtidos por SDS-PAGE, no soro lácteo de glândulas mamárias sadias de ovelhas Santa Inês em diferentes fases de lactação.

Fig.5- Valores médios da concentração das proteínas de PM 15.000 Da e PM. 29.000 Da (mg/dL), obtidos por SDS-PAGE, no soro lácteo de glândulas mamárias sadias de ovelhas Santa Inês em diferentes fases de lactação.

Fig.6- Valores médios da concentração da β -lactoglobulina e α -lactalbumina (mg/dL), obtidos por SDS-PAGE, no soro lácteo de glândulas mamárias sadias de ovelhas Santa Inês em diferentes fases de lactação.

QUADROS

Quadro 1 – Valores médios, desvios-padrão, média geral e níveis de significância da concentração das proteínas (mg/dL) identificadas no soro lácteo de ovelhas Santa Inês (n=44) em diferentes fases de lactação.

Proteínas	FASES DA LACTAÇÃO				Média Geral	Pr > F
	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias		
<i>PT (g/dL)</i>	1,91±0,20 ^A	1,64±0,16 ^B	1,82±0,14 ^A	1,91±0,17 ^A	1,82	0,0022
<i>Albumina</i>	140,40±49,21 ^A	89,76±39,48 ^B	89,46±44,51 ^B	99,05±48,89 ^B	104,64	0,0377
<i>IgA</i>	3,69±2,57	2,16±1,57	2,93±1,98	2,10±1,13	2,72	0,3895
<i>IgGCP</i>	117,77±56,29 ^A	57,90±32,59 ^B	62,46±21,95 ^B	96,46±44,47 ^B	83,65	0,0005
<i>IgG CL</i>	45,04±27,11	35,76±18,06	48,66±30,51	51,78±22,08	45,01	0,3333
<i>IgG Total</i>	162,81±76,802 ^A	93,66±42,05 ^B	111,13±44,11 ^{AB}	148,24±44,16 ^{AB}	128,96	0,0354
<i>Lactoferrina</i>	30,10±14,41	19,88±9,20	21,77±11,13	25,12±7,46	24,18	0,1611
<i>PM 15.000 Da</i>	5,97±5,36	12,15±10,39	12,71±3,68	17,24±4,92	12,10	0,4494
<i>PM 29.000 Da</i>	82,43±56,01	57,36±32,94	68,30±36,89	82,23±41,07	71,61	0,4879
<i>β lactoglobulina</i>	1137,05±154,98 ^{BC}	1022,43±104,65 ^C	1215,38±123,19 ^{AB}	1300,01±162,83 ^A	168,72	0,0005
<i>α lactoalbumina</i>	311,44±116,80	318,06±136,93	271,77±70,61	206,29±55,03	280,25	0,0799

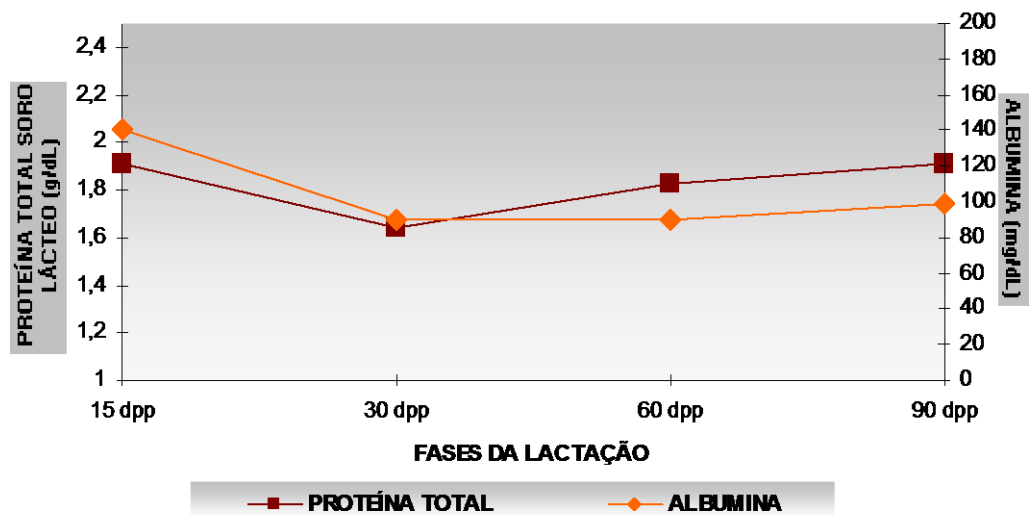


Figura 01

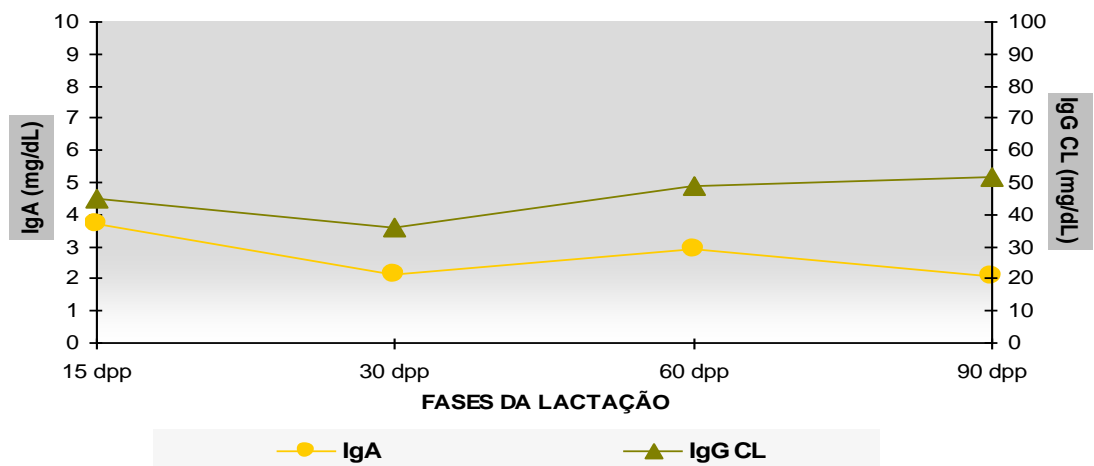


Figura 02

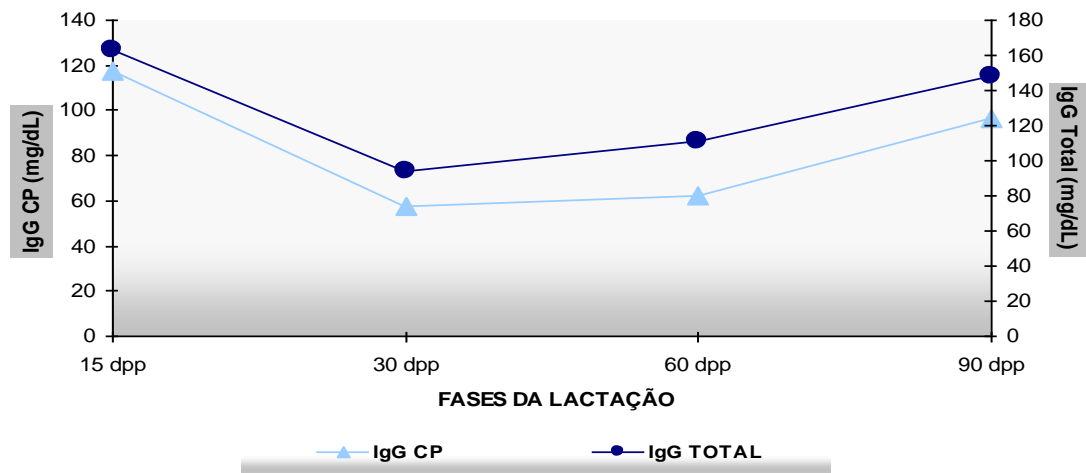


Figura 03

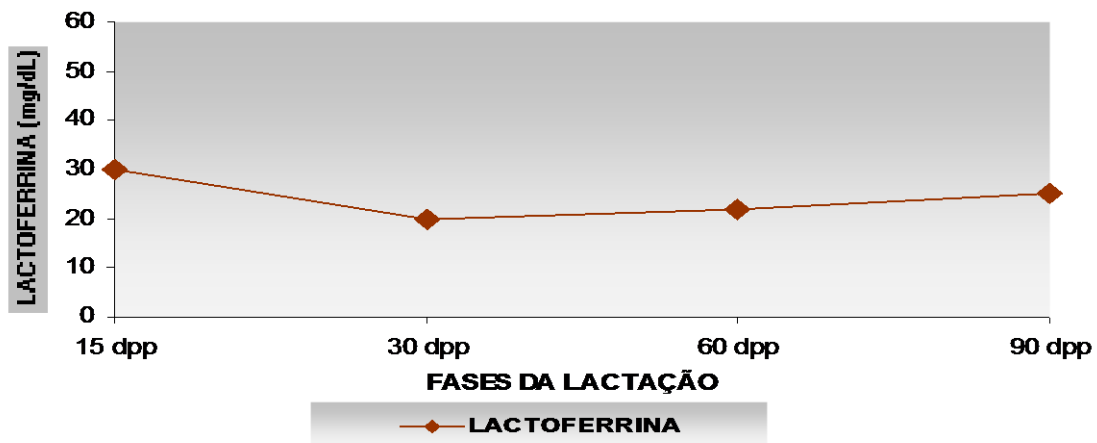


Figura 04

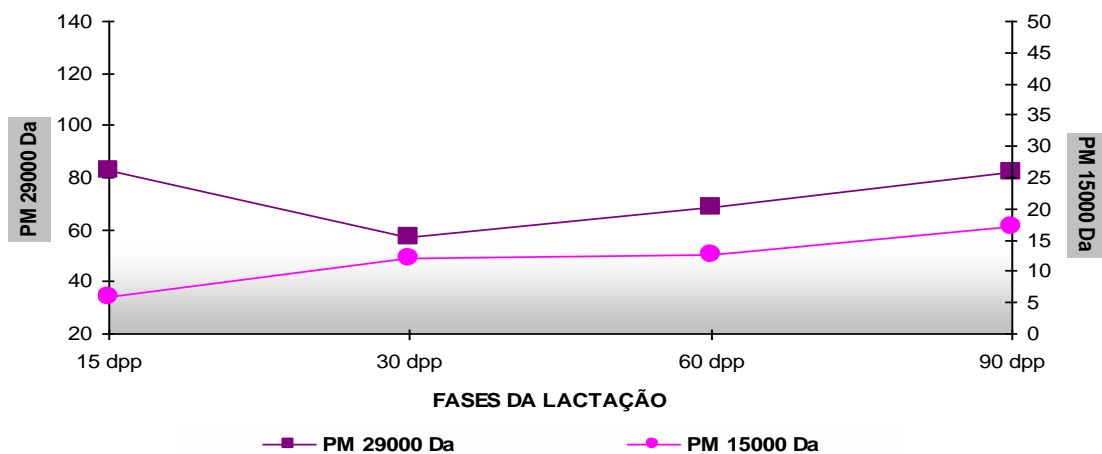


Figura 05

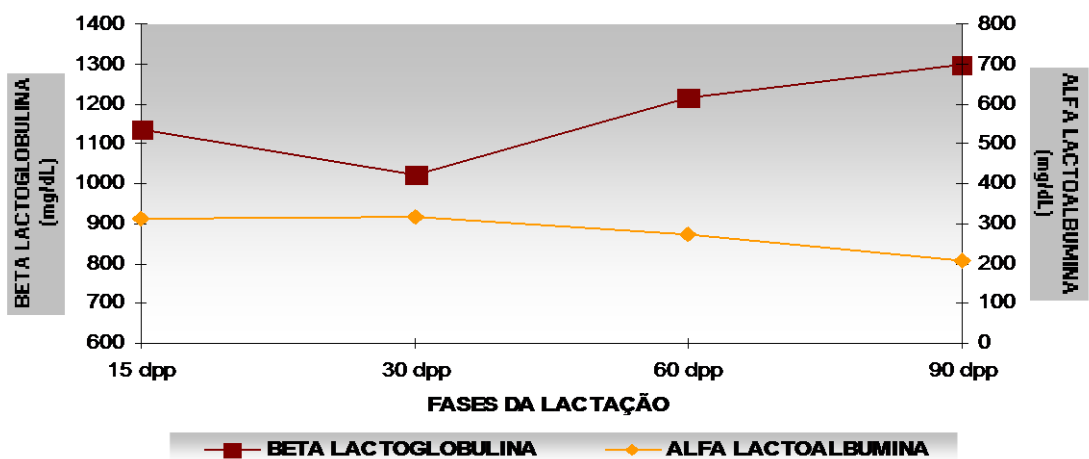


Figura 06

5.3 Artigo 3

PROTEINOGRAMA DO SORO LÁCTEO DE GLÂNDULAS MAMÁRIAS DE OVELHAS SADIAS E INFECTADAS EM DIFERENTES FASES DE LACTAÇÃO²⁸

Vânia F. Lemos^{29*}, Eduardo L. S. Guaraná³⁰, José A. B. Afonso³¹, José J. Fagliari³², Paulo C. Silva³², Pierre C. Soares³³, Carla Lopes de Mendonça³¹

ABSTRACT.- Lemos V.L., Guaraná E.L.S., Afonso J.A.B., Fagliari J.J., Silva P.C., Soares P.C., Mendonça C.L. [Proteinogram whey of healthy and infected sheep at different stages of lactation] Proteinograma do soro lácteo de glândulas mamárias de ovelhas sadias e infectadas em diferentes fases de lactação. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Clínica de Bovinos, Campus Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Bom Pastor s/n, Cx. Postal 152, Mundaú, Garanhuns, PE 55292-901, Brazil. E-mail: vanialemos91@gmail.com

Corporal answers occur in initial periods of infection, between which the proteins of acute phase, whose whey proteins concentrations can increase or reduction front to inflammatory process. The purpose of this work was to assess the whey proteinogram dynamics of mammary glands from healthy and infected Santa Inês sheep in different moments of lactation. It was followed sheep submitted to same health and nutritional management, in a semi-intensive system during the stage of lactation, evaluated at 15, 30, 60 and 90 days after birth (end of weaning and lactation). Clinical examination was carried out of the mammary gland through and California Mastitis test (CMT). Milk was collected and submitted to bacteriological and proteinogram exam. Bacteriological culture and biochemistry characterization of samples was held. In each moment were evaluated 42 milk samples from healthy glands (CMT and bacteriological negative) and 43 samples of milk from infected glands (CMT and bacteriological positive). For obtaining the whey protein, Renin solution was used. Total protein whey was obtained by the biuret method and the proteinogram was carried out by the technique of polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) that enabled quantification of nine proteins in whey of healthy glands: serum albumin, lactoferrin, IgA, heavy chain IgG (IgG CP), light chain IgG (IgG CL), IgG Total (IgG CP + IgG CL), α -lactalbumin, β -lactoglobulin, PM 15.000, PM 29.000. Comparing healthy and infected glands it was found a significant increases in all protein and total protein, excepted of IgGCL and α -lactalbumin. Among those we underline the increased magnitude of protein α -1 acid glycoprotein, lactoferrin and hatptoglobin, approximately tree, five and seven times respectively. It is concluded that the hatptoglobin and α -1 acid glycoprotein, lactoferrin, albumin and immunoglobulins IgA and IgG in whey protein act as potentials biomarkers of infection in mammary gland in the ovine species.

INDEX TERMS: Subclinical mastitis, ovine, milk, SDS-PAGE, acute phase proteins.

²⁸ Recebido em

Aceito para publicação em

Parte da Dissertação do primeiro autor no Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

²⁹ Programa de Pós-graduação em Sanidade e Reprodução em Ruminantes/UFRPE. Av.: Bom Pastor, s/n. Caixa postal 152 - Boa Vista. CEP 55292-270. Garanhuns-PE. *Autor para correspondência: vanialemos91@gmail.com

³⁰ Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária/ UFRPE. Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife- PE. CEP 52171-030.

³¹ Clínica de Bovinos, Campus Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco Av.: Bom Pastor, s/n. Caixa postal 152 - Boa Vista. CEP 55292-270. Garanhuns-PE. carlalopes.mendonca@gmail.com

³² Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, UNESP, Campus Jaboticabal, Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellani s/n, Jaboticabal- SP. CEP 14884-900.

³³ Departamento de Medicina Veterinária/ UFRPE. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife-PE. CEP 52171-030.

RESUMO.- Respostas sistêmicas ocorrem nos estágios iniciais da infecção, entre as quais as proteínas de fase aguda, cujas concentrações lácteas podem aumentar ou diminuir frente ao processo inflamatório. Objetivou-se neste estudo identificar os potenciais biomarcadores de infecção da glândula mamária de ovelhas da raça Santa Inês. Acompanhou-se ovelhas submetidas ao mesmo manejo higiênico, sanitário e nutricional em sistema de criação semi-intensivo, durante a fase de lactação, avaliadas em 15, 30, 60 e 90 dias após o parto (final da lactação e desmame). Realizou-se o exame clínico da glândula mamária California Mastitis test (CMT). Coletou-se leite para o exame bacteriológico e para o proteinograma. Foi realizado o cultivo bacteriológico e a caracterização bioquímica das amostras. Nos respectivos momentos foram avaliadas 42 amostras de leite de glândulas sadias (CMT e bacteriológico negativos) e 43 amostras de leite de glândulas infectadas (CMT e bacteriológico positivos). Para a obtenção do soro lácteo utilizou-se solução de renina. A proteína total do soro lácteo foi obtida pelo método do biureto e o proteinograma realizado pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) que possibilitou a quantificação de nove proteínas no soro lácteo de glândulas sadias: albumina sérica, lactoferrina, IgA, IgG de cadeia pesada (IgG CP), IgG de cadeia leve (IgG CL), IgG Total (IgG CP + IgG CL), α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, PM 15.000, PM 29.000. Comparando as glândulas sadias e infectadas verificou-se aumentos significativos em todas as proteínas e na proteína total, com exceção da IgG CL e α -lactoalbumina. Dentre estes aumentos salientamos os de maior magnitude nas proteínas α -1 glicoproteína ácida, lactoferrina e hatptoglobina aproximadamente três, cinco e sete vezes respectivamente. Conclui-se que a hatptoglobina e α -1 glicoproteína ácida, lactoferrina, albumina e as imunoglobulinas IgA e IgG presentes no soro lácteo atuam como potenciais biomarcadores de infecção na glândula mamária na espécie ovina.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Mastite subclínica, ovino, leite, soro lácteo, proteína de fase aguda.

INTRODUÇÃO

A mastite é considerada uma das enfermidades de grande impacto econômico na ovinocultura, sendo responsável por prejuízos significativos causando morte de cordeiros por inanição, descarte precoce de ovelhas e, ocasionalmente, morte de animais (Kirk & Glenn 1996, Radostitis et al. 2007).

Em ovelhas da raça Santa Inês nas situações de manejo semi-intensivo e intensivo, como consequência de uma alimentação mais rica, observa-se maior predisposição à infecção da glândula mamária, pois o leite excedente não é consumido pelo borrego (Oliveira 2006).

Na mastite subclínica normalmente não se observa alterações macroscópicas no úbere e na secreção láctea, porém observa-se diminuição na produção de leite, alterações na composição físico-química, aumento do número de células somáticas e isolamento de microrganismos, representando perda de produtividade dos rebanhos e comprometendo a alimentação dos borregos (Naccari et al. 2003, Anderson et al. 2005, Santos et al. 2007). A mastite subclínica geralmente é precursora da mastite clínica causada pelo mesmo agente etiológico, sendo uma das razões mais frequentes do descarte de matrizes, comprometendo assim a produtividade dos rebanhos (Menzies 2000, Oliveira 2006).

Várias respostas sistêmicas ocorrem nos estágios iniciais da infecção, entre as quais as denominadas de fase aguda (Eckersall 2008), originando as proteínas de fase aguda, cujas concentrações lácteas podem aumentar ou diminuir frente ao processo inflamatório, sendo assim reconhecidas como biomarcadores de inflamação/infecção (Eckersall & Bell 2010).

O diagnóstico da mastite em ovelhas está fundamentado no exame clínico, contagem de células somáticas e análise bacteriológica do leite; quanto mais rápido e seguro for o diagnóstico mais rápido será o tratamento e menor o tempo de recuperação. Com a implantação de sistemas de mecanização de produção, a demanda por marcadores rápidos e precisos tem aumentado significativamente, desta forma tem-se sugerido que as proteínas de fase aguda poderiam ser indicadores confiáveis de um processo inflamatório na glândula mamária (Hirvonen et al. 1996, Eckersall et al. 2001).

A adoção de ferramentas voltadas para a vigilância da hígidez dos rebanhos pode ser útil em programas sanitários, havendo previamente a necessidade de se conhecer os biomarcadores em potencial de saúde e de doença (Ganhein et al. 2007).

O aumento da concentração de proteína total e de algumas proteínas presentes no soro lácteo, como a albumina e imunoglobulinas associado à diminuição da concentração de caseína representam achados de alteração na glândula mamária (Schalm et al. 1971). As concentrações das proteínas

presentes no soro lácteo podem apresentar variação considerada nos casos de inflamação da glândula mamária, mesmo quando as alterações na concentração da proteína total do leite não são detectadas de forma mais expressiva (Schalm et al. 1971, Audist et al. 1995).

Confirmando a influência do processo inflamatório sobre as proteínas do soro lácteo, Sant'ana (2004) observou em vacas com mastite, alterações na concentração de algumas proteínas de fase aguda.

Dentre os vários métodos reconhecidos de separação protéica, destaca-se a eletroforese em gel de poliácridamida, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS), como uma técnica importante para a separação das PFA do sangue e particularmente no leite, pois permite a identificação de várias frações protéicas, bem como sua quantificação, utilizando pequenas quantidades de fluídos orgânicos (Kato et al. 1989).

Em virtude da escassa ou mesmo inexistente, literatura na espécie ovina a cerca do proteinograma do soro lácteo de glândulas sadias e infectadas, portadoras de mastite subclínica, este estudo teve por objetivo identificar os potenciais biomarcadores de infecção da glândula mamária de ovelhas da raça Santa Inês.

MATERIAL E MÉTODOS

De um rebanho comercial, foram acompanhadas ovelhas da raça Santa Inês, criadas sob sistema semi-intensivo e submetidas ao mesmo manejo higiênico, sanitário e nutricional, observadas em diferentes estágios de lactação (início, meio e final aos 90 dias, estabelecido como período de desmame na região). O exame clínico dos animais e da glândula mamária seguiu as recomendações de Diffay et al. (2005). Os resultados do *California Mastitis Test* (CMT) foram classificados em escores negativo (reação negativa ou traços) e positivo (1+, 2+ e 3+) (Schalm et al. 1971).

O acompanhamento das ovelhas nas diferentes fases da lactação resultou na triagem de glândulas mamárias consideradas sadias e infectadas, de acordo com o resultado concomitante do CMT e do exame bacteriológico.

Avaliou-se 42 amostras provenientes de glândulas sadias (CMT negativo/bacteriológico negativo) e 43 de glândulas infectadas (CMT positivo /bacteriológico positivo).

Foram colhidos 10 mL de leite para realização do proteinograma e logo em seguida, após prévia higienização do óstio do teto com álcool a 70%, aproximadamente três mL de leite em tubos esterilizados para realização do exame bacteriológico. As amostras foram acondicionadas sob refrigeração, em caixa de material isotérmico e transportadas ao laboratório.

O cultivo bacteriológico foi realizado seguindo as recomendações do *National Mastitis Council* (1990) e a caracterização bioquímica de acordo com Quinn et al. (1994). As amostras de leite empregadas no proteinograma foram mantidas em ultrafreezer³⁴ a -80°C.

Para a realização do proteinograma obteve-se inicialmente o soro lácteo empregando-se a técnica descrita por Schalm et al. (1971) adotando-se algumas adaptações em decorrência do menor volume de leite produzido pela ovelha, quando comparado à vaca conforme descrito a seguir. As amostras de leite após o descongelamento em banho maria a 37°C, foram homogeneizadas em vortex³⁵ e para cada 1.000 µL de leite foram adicionados 75 µL de solução de renina³⁶ mantidos em banho maria a 37°C por aproximadamente 20 minutos até a formação do coágulo.

Posteriormente, foram centrifugadas a 21.000G durante dez minutos em centrífuga refrigerada³⁷. Após a centrifugação, aspirou-se a amostra de soro lácteo correspondente a fração intermediária da solução trifásica, que foi mantida em ultrafreezer a -80°C para posterior processamento laboratorial.

A determinação da proteína total do soro lácteo foi realizada pelo método do biureto³⁸, observando-se a linearidade do mesmo, tendo em vista as menores concentrações da proteína total do soro lácteo, quando comparada ao soro sanguíneo.

³⁴ Ultralow freezer NuAire Inc., 2100 Fernbrook Lane N. Plymouth, MN 55447, USA.

³⁵ Quimis Aparelhos Científicos Ltda, rua Gema, 278, Diadema, São Paulo, Brasil.

³⁶ Coalho Estrella®, Chr. Hansen Brasil Ind. e Com. Ltda, Valinhos, São Paulo, Brasil.

³⁷ Centrífuga Mikro 200R Hettich-Zentrifugern, Föhrenstr. 12 D-78532 Tuttlingen, Germany.

³⁸ Proteína Total, Labtest Diagnóstica S.A., Av. Paulo Ferreira da Costa 600, Lagoa Santa, 33400-000, Minas Gerais, MG, Brasil.

A separação das frações protéicas foi realizada utilizando-se eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme técnica descrita por Laemmli (1970) e Fagliari & Silva (2002).

Após o fracionamento o gel foi corado durante dez minutos em solução de azul de coomassie, constituída de metanol (50%), água (40%), ácido acético glacial (9,75%) e azul de coomassie (0,25%).

Em seguida foi colocado em solução de ácido acético a 7% para retirada do excesso de corante, até que as frações protéicas se apresentassem nítidas. As concentrações das proteínas foram determinadas em densitômetro computadorizado³⁹.

Para a identificação das frações protéicas do soro lácteo foi empregada como referência solução marcadora com diferentes pesos moleculares (6.500-200.000 Da) e as proteínas purificadas lactoferrina, β -lactoglobulina e a α -lactoalbumina bovinas⁴⁰.

Os resultados que não atenderam as premissas de normalidade empregando o teste de Kolmogorov-Smirnov foram submetidos à transformação logarítmica de base dez e análise de variância (ANOVA), utilizando-se o procedimento GLM do *Statistical Analysis System* (SAS, 2002). As médias foram comparadas pela diferença mínima significativa (d.m.s.) do teste de *Student Newman Keuls* (SNK) ao nível de significância de 5%. As proteínas albumina, IgG CP (cadeia pesada), IgG CL (cadeia leve), IgG total, PM 29.000 Da e lactoferrina foram submetidas à transformação logarítmica, enquanto a haptoglobina, GPA (glicoproteína ácida) e PM 15.000 Da submetidas ao teste não paramétrico de Wilcoxon, com dados expressos pelas medianas e percentis (P₂₅ e P₇₅) (Sampaio 2007).

O trabalho obteve parecer favorável da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal Rural de Pernambuco com a licença n.017/2010 (6029/2010 D08) CEPE/UFRPE estando de acordo com as normas sugeridas pelo COBEA e com as normas internacionais estabelecidas pelo *National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fracionamento eletroforético permitiu identificar/quantificar nas glândulas mamárias sadias as proteínas lactoferrina, albumina, IgA, IgG de cadeia pesada (IgG CP), IgG de cadeia leve (IgG CL), β -lactoglobulina, α -lactoalbumina e outras duas proteínas identificadas como de PM 15.000 Da, PM 29.000 Da.

Quanto às proteínas presentes no soro lácteo das glândulas infectadas, pode-se observar além das descritas acima, a haptoglobina e α_1 glicoproteína ácida. Vale salientar que todas as amostras de leite consideradas infectadas, ou seja, amostras reagentes simultaneamente no CMT e positivas no exame bacteriológico, foram provenientes de casos subclínicos de mastite.

A técnica de eletroforese SDS-PAGE se mostrou exequível e sensível para identificar e quantificar as concentrações protéicas em quantidades mínimas presentes no soro lácteo de ovelhas, conforme evidenciado anteriormente nas espécies bovina (Kato et al. 1989, Sant'ana 2004) e caprina (Raimondo et al. 2011).

Proteína total - Foi observada diferença na concentração da proteína total do soro lácteo, quando comparadas as glândulas sadias e infectadas (P<0,0001), que apresentaram valores médios de 1,81 mg/dL e 2,56 mg/dL, respectivamente (Quadro 1, Fig.1). O aumento do teor de proteína no soro lácteo, resultante do processo inflamatório da glândula, pode ser atribuído a maior transudação das proteínas presentes no sangue, como consequência do aumento da permeabilidade vascular (Paape et al. 1995). A mastite, subclínica ou clínica, acarreta o aumento da concentração da proteína total do leite, como consequência da passagem de imunoglobulinas e particularmente a albumina, em bem maior concentração, do sangue para o leite (Paape et al. 1995). A elevação na concentração protéica do soro lácteo de vacas acometidas com mastite foi relatado por Sant'ana (2004), no entanto na espécie caprina, Raimondo et al. (2011) não observou alteração na concentração da proteína láctea, afirmando não haver influência da infecção bacteriana sobre esta variável.

Albumina- Os teores de albumina foram significativamente superiores (P<0,0001) nas glândulas infectadas quando comparados aos das glândulas sadias (Quadro 1, Fig.2), ratificando o aumento da

³⁹ Shimadzu CS 9301, 1Nishinokyo-Kuwabara-cho, Nakagyo-Ku, Kyoto 604-8511, Japan.

³⁷ Sigma Marker™, Sigma, St. Louis, Missouri, USA.

permeabilidade vascular, havendo a passagem da albumina sanguínea para a glândula mamária (Paape et al. 1995). Outra possibilidade poderia estar relacionada à síntese da albumina pela própria glândula, conforme verificado por Shamay et al. (2005), sugerindo ser a secreção da albumina pela glândula mamária parte de um sistema de defesa não específico.

Imunoglobulinas - Verificou-se diferença ($P < 0,0001$) na concentração de IgA IgG total (IgG CP/IgG CL) ($P < 0,0006$) e IgG de cadeia pesada ($P < 0,0002$), onde estas apresentaram-se em maior concentração nas glândulas infectadas, não sendo significativa a diferença para as concentrações de IgG de cadeia leve ($P > 0,5350$). (Quadro 1).

A concentração média de IgA da secreção das glândulas com mastite subclínica (2,72 mg/dL) foi quase três vezes superior as da glândula sadias (6,07 mg/dL). Quanto a IgG ressalta-se que a concentração desta classe de imunoglobulina quase que dobrou nas glândulas infectadas. Estes resultados sugerem que durante o processo inflamatório da glândula mamária as imunoglobulinas, sintetizadas em resposta à estímulos antigênicos, migram do sangue para o leite, com a finalidade de auxiliar na defesa da glândula comprometida, conforme observado em vacas (Urech et al. 1999, Mehra et al. 2006, Eckersall 2008).

Lactoferrina - A concentração média da lactoferrina nas glândulas infectadas apresentou valores 4,8 vezes superior ao observado nas glândulas sadias ($P < 0,0001$) (Quadro 1), demonstrando também na espécie ovina, assim como na bovina, o seu papel no mecanismo natural de defesa, nos processos inflamatórios da glândula mamária, tendo em vista ser a primeira barreira contra agentes infecciosos, particularmente as bactérias, em razão da sua habilidade em sequestrar íons ferro, indisponibilizando-o como nutriente para o crescimento e expressão de virulência de alguns agentes bacterianos (Harmon et al. 1976, Smith & Schanbacher 1977, Hagiwara et al. 2002).

Resultados semelhantes foram relatados por Nudda et al. (2003), que verificaram concentrações duas vezes superior de lactoferrina em amostras de soro lácteo de ovelhas que apresentavam contagem de células somáticas superior a um milhão; Sant'ana (2004) relatou o dobro da concentração de lactoferrina em vacas com mastite, quando comparadas às sadias; Raimondo et al. (2011) relataram aumento significativo na concentração de lactoferrina em cabras com mastite salientando a precocidade do seu aparecimento, quando comparado a outras proteínas presentes no soro lácteo.

Para Hagiwara et al. (2002) a concentração de lactoferrina estaria relacionada a patogenicidade da espécie bacteriana envolvida, sendo mais elevada, quanto mais patogênica a bactéria.

A lactoferrina poderia também alterar a permeabilidade da membrana celular de algumas bactérias, impedindo o seu crescimento sendo esta proteína liberada durante a inflamação pelos grânulos secundários de neutrófilos (Harmon et al. 1976, Smith & Schanbacher 1977, Rainard et al. 1986, Farrel 2004, Komine et al. 2006, Conesa et al. 2008).

α - Lactoalbumina - Ao analisar os teores de α - lactoalbumina não se observou diferença significativa nas concentrações entre glândulas sadias e infectadas, que apresentou valores de 280,25 mg/dL e 321,07 mg/dL, respectivamente, conforme Quadro 1. Apesar de não significativo estatisticamente ($P > 0,1252$), ressalta-se que nas glândulas infectadas houve aumento na concentração de α - lactoalbumina, corroborando os achados de Sant'ana (2004) em amostras de soro lácteo de vacas. Nudda et al. (2003) também observaram aumento significativo desta fração protéica relacionado ao aumento da contagem de células somáticas em ovelhas com mastite. No entanto, estes resultados contradizem Raimondo et al. (2011), que verificaram diminuição nos valores de α - lactoalbumina em casos de mastite em cabras, e também por Bortree et al. (1962); Schalm et al. (1971); Harmon et al. (1976) e Prosser e McLaren, (1997), que relacionam a diminuição da α - lactoalbumina com a diminuição da lactose observada nos casos de mastite, porém destaca-se que esta relação entre a diminuição da α - lactoalbumina com casos de mastites foram objetos de estudo em vacas e a metodologia utilizada para as análises não foram as mesmas utilizadas no presente estudo.

β - Lactoglobulina - Com relação à β - lactoglobulina verificou-se aumento significativo ($P < 0,0001$) na concentração de glândulas infectadas em comparação com as sadias (Quadro 1), concordando com os resultados de Nudda et al. (2003), que observaram aumentos significativos de β - lactoglobulina no

soro lácteo de ovelhas com mastite com CCS superior a 1.000.000 células. Entretanto estes resultados diferem do observado por outros autores em ruminantes; Sant'ana (2004) não observou influência significativa da mastite sobre o proteínograma do soro lácteo de vacas e Raimondo et al. (2011), que observaram diminuição de β -lactoglobulina no soro lácteo de cabras com mastite. Acredita-se que o aumento de β -lactoglobulina nas amostras de glândulas mamárias infectadas de ovelhas possa ser atribuído, mais ao efeito da concentração destas proteínas do que a sua própria síntese nas células da glândula mamária, isto porque no leite mastítico verifica-se redução na produção de leite (Nudda et al. 2003).

PM 15.000 Da e PM 29.000 Da – As proteínas moleculares PM 15.000 Da e PM 29.000 Da (proteínas identificadas pelo seu peso molecular em virtude de ainda não estarem nomeadas na literatura), sendo observada diferença significativa ($P < 0,0001$ e $P < 0,0002$, respectivamente) nas concentrações protéicas, podendo ser observadas na Quadro 1.

Neste estudo estas proteínas foram consideradas de interesse devido ao significativo aumento das suas concentrações nas glândulas infectadas, com magnitude de 1,6 e 2,4 vezes na PM 29.000 e na PM 15.000, respectivamente. Faz-se necessário mais estudo sobre estas proteínas para a identificação de suas funções bem como sua atuação.

α -1 glicoproteína ácida / haptoglobina - Deve-se ressaltar a identificação de duas outras proteínas, consideradas de fase aguda no soro lácteo, a α -1 glicoproteína ácida e a haptoglobina, que foram detectadas exclusivamente nas glândulas infectadas ($P < 0,0001$), expressando aumentos de aproximadamente quatro e sete vezes, respectivamente (Quadro 1).

A α -1-glicoproteína ácida é uma importante proteína de fase aguda na clínica de ovinos, sendo utilizada no monitoramento de processos inflamatórios e infecções em geral (Eckersall et al. 2001). É considerada uma proteína de fase aguda moderada, aumentando seus níveis mais lentamente, porém permanecendo elevada por muito mais tempo que outras proteínas de fase aguda (Eckersall 2008). Esta proteína normalmente é identificada no soro sanguíneo e na literatura compulsada não evidenciamos a presença desta proteína de fase aguda no soro lácteo de ovelhas para estudo de comparação de resultados, no entanto acreditamos que esteja relacionada ao processo inflamatório da glândula mamária, em virtude de ter sido verificada somente nas glândulas infectadas, tendo em vista já ter sido relatado a síntese extra-hepática desta proteína em células epiteliais da glândula mamária de humanos e bovinos (Ceciliani et al. 2005, Rainard & Riollot 2006, Ceciliani & Pocacqua 2007).

Embora o papel preciso da α -1 glicoproteína ácida não seja totalmente conhecido, sabe-se que ela se liga a uma série de metabólitos endógenos e atua na imunidade inata contra infecções, liga e transporta moléculas no local da inflamação, modulando a reação imune por meio da inibição da fagocitose, da ativação de neutrófilos e da agregação plaquetária (Ceciliani & Pocacqua 2007, Eckersall 2008). Sabe-se também que leucócitos ativados podem atuar como fonte local de α -1 glicoproteína ácida, útil para desenvolver uma barreira de defesa imunológica rápida frente ao dano causado pela inflamação (Ceciliani & Pocacqua 2007).

A haptoglobina também foi detectada no soro lácteo das glândulas infectadas. As concentrações de haptoglobina geralmente são muito baixas ou indetectáveis, porém em casos de inflamação ou infecção em ruminantes suas concentrações podem aumentar significativamente (Eckersall et al. 2001). A haptoglobina normalmente aparece no plasma, mas pode estar presente também no leite, urina e saliva (González et al. 2007).

Alguns pesquisadores tem relatado elevações na concentração de haptoglobina, tanto no plasma sanguíneo como no leite, em vacas com mastite clínica e suclínica (Eckersall et al. 2001, Gronlund et al. 2005, González et al. 2007) indicando um alto potencial desta proteína como biomarcador de processos inflamatórios na glândula mamária, entretanto, deve-se ressaltar a inexistência de literatura da presença desta proteína no soro lácteo de ovelhas.

A detecção da haptoglobina em maiores concentrações na glândula infectada, provavelmente esteja relacionada à capacidade de se ligar às moléculas produzidas no dano tecidual, como a hemoglobina, tornando o ferro inacessível para as bactérias limitando a multiplicação bacteriana (Suojala et al. 2008), assim como a síntese extra-hepática nas células do tecido mamário (Akerstedt et al. 2007).

CONCLUSÃO

As proteínas haptoglobina, α_1 glicoproteína ácida, lactoferrina, albumina e as imunoglobulinas IgA e IgG presentes no soro lácteo são potenciais biomarcadores do processo inflamatório da glândula mamária de ovelhas da raça Santa Inês.

Agradecimentos.- Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (MCT CNPQ- Edital Universal – 14/2011) pelo auxílio financeiro e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Ensino Superior (CAPES) pela concessão da Bolsa de Demanda Social.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akerstedt M., Waller K. P., Sternesjo A. 2007. Haptoglobin and serum amyloid A in relation to the somatic cell count in quarter, cow composite and bulk tank milk samples. *Journal of Dairy Research* 74: 198-203.
- Auldust M. J. et al. 1995. Changes in the composition of milk from healthy and mastitic dairy cows during the lactation cycle. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 35(4):427-36.
- Bortree A. L., Carroll E. J., Schalm O. 1962. Whey protein patterns of milk from cows with experimentally produced mastitis. *Journal of Dairy Science* 45:1465.
- Ceciliani F. et al. 2005. Identification of the bovine α_1 -acid glycoprotein in colostrum and milk. *Veterinary Research*, 36: 735-746.
- Ceciliani F. & Pocacqua V. 2007. The acute phase protein α_1 glycoprotein: a model for altered glycosylation. *Current Protein and Peptide Science* 8:91-108.
- Conesa C. et al. 2008. Isolation of lactoferrin from milk of different species: calorimetric and antimicrobial studies. *Comparative Biochemistry and Physiology* 150:131-139.
- Diffay B. C. 2005. Abordagem e exame de ovinos e caprinos. In: PUGH, D.G. Clínica de ovinos e caprinos. Roca, São Paulo, p. 1-19.
- Eckersall P. D. et al. 2001. Acute phase protein in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. *Veterinary Record* 148:35-41.
- Eckersall P. D. 2008. Proteins, proteomics, and the dysproteinemia, 117-155. In: Kaneko J. J., Harvey J.W., Bruss M.L. (Eds), *Clinical biochemistry of domestic animals*, 6.ed. Academic Press, San Diego.
- Eckersall P. D. & Bell R. 2010. Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *The Veterinary Journal* 185:23-27.
- Fagliari J. J. & Silva S. L. 2002. Hemograma e proteinograma plasmático de equinos hígidos e de equinos acometidos por abdômem agudo antes e após laparotomia. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 54(6):559-586.
- Farrell Jr, H. M. et al. 2004. Nomenclature of the proteins of cows' milk—Sixth revision. *Journal of Dairy Science* 87:1641–1674.
- Fthenakis G. C. & Jones, J. E. 1990. The effect of inoculation of coagulase-negative *staphylococci* into the ovine mammary gland. *Journal of Comparative Pathology* 102(2):211-219.

- Ganheim C., Alenius S., Waller, K. P. 2007. Acute phase proteins as indicators of calf herd health. *The Veterinary Journal* 173:645-651.
- González F. H. D., Martínez-Subiela S. Cerón J. J. 2007. Haptoglobina em ruminantes: generalidades y posibles aplicaciones clínicas. *Anales de Veterinaria Murcia* 23:5-17.
- Grönlund U., Sandgren C.H., Maller K.P. 2005. Haptoglobin and serum amyloid a in milk from dairy cows with chronic sub-clinical mastitis. *Veterinary Research, Les Ulis* 36:191-198.
- Hagiwara S. et al. 2003. Lactoferrin concentrations in milk from normal and subclinical mastitic cows. *Journal of Veterinary Medical Science* 65:319-323.
- Harmon R. J. et al. 1976. Changes in lactoferrin, immunoglobulin G, bovine serum albumin, and alpha-lactalbumin during acute experimental and natural coliform mastitis in cows. *Infect Immunology* 13:533-542.
- Hiller R. M. 1976. The quantitative measurement of whey proteins using polyacrylamide-gel electrophoresis. *Journal of Dairy Research* 43(2):259-265.
- Kato K., Mori K., Katoh N. 1989. Different proteins patterns in normal and mastitic milks by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamida gel electrophoresis. *Japanese Journal Veterinary Science* 51(6):1275-1278.
- Komine Y. et al. 2006. Effect of combination therapy with lactoferrin and antibiotics against *Staphylococcal* mastitis on drying cows. *The Journal of Veterinary Medical Science* 68(3):205-211.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Langoni H. et al. 1999. Aspectos microbiológicos e perfis de sensibilidade de patógenos na mastite ovina. In: ENCONTRO DE PESQUISADORRES EM MASTITES, 3. Botucatu _ SP: FMVZ/UNESP, p. 135.
- Little T. M. & Hill F. J. 1978. *Agricultural experimentation – Design and Analysis*. John Wiley & Sons, New York, 350p.
- Mehra R., Marnila P., Korhonen H. 2006. Milk immunoglobulins for health promotion. *International Dairy Journal* 16:1261-1271.
- Menzies P. I. & Ramanoon S. Z. 2001. Mastitis of sheep and goats. *The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice* 1:333-358.
- Naidu A. S. et al. 1991. Bovine lactoferrin receptors in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Journal of Dairy Science* 74(4):1218-1226.
- National Mastitis Council. 1990. *Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection*. 3ed. NMC, Arlington, 34p.
- Nudda A. et al. 2003. Effects of lactation stage, parity, α -lactoglobulin genotype and milk SCC on whey protein composition in Sarda dairy ewes. *Ital. J. Anim. Sci.* 2:29-39.
- Oliveira V. L. M. 2006. Aspectos do leite e mastite em ovinos da raça Santa Inês em Sergipe. *Dissertação Mestrado em Agroecossistemas – Núcleo de Pesquisa e Pós-Graduação e Estudos em Recursos Naturais, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 70f.*

- Paape M. J., Capuco A. V., Guidry A. J. 1995. Morfology, function and adaptation of mammary cells in normal and disease states. *Journal Animal Science* 73(2):1-17.
- Prosser C. G. & McLaren R. D. 1997. Effect of atropine on milk protein yield by dairy cows with different β -lactoglobulin phenotypes. *Journal Dairy Science* 80:1281- 1287.
- Qian Z. Y., Samour J. P., AM, F. 1995. Isolation and characterization of sheep lactoferrin, an inhibitor of platelet aggregation and comparison with human lactoferrin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1234:25-32.
- Quinn P. J. et al. 1994. *Clinical Veterinary Microbiology*, Mosby, Philadelphia, 648p.
- Raimondo R. F. S. et al. 2011. Efeito da infecção intramamária no proteinograma do leite de cabras. 2011 In: IX CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, Anais....Botucatu: Veterinária e Zootecnia, Suplemento 3, p. 1048.
- Rainard P. 1986. Bacteriostasis of *Escherichia coli* by bovine lactoferrin, transferrin and immunoglobulins (IgG1, IgG2, IgGM) acting alone or in combination. *Veterinary Microbiology* 11(1):103-115.
- Rainard P. & Riollet C. 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet. Res.* 37:369-400.
- Rocha T. G. et al. 2009. Eletroforetograma das proteínas do soro lácteo de vacas canchim primíparas e pluríparas. In: Congresso Brasileiro de Buiatria, 8. Anais... Belo Horizonte: Ciência Animal Brasileira, Suplemento 1.
- Sant'ana V. A. C. 2004. Proteinograma do leite de vacas: padrões e variabilidade. Tese Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 161p.
- Sampaio I. B. M. 2007. Estatística aplicada à experimentação animal. 3 ed. FEP MVZ Editora. Belo Horizonte, 265p.
- Sas Institute Inc. 2000. SAS user's guide: Statistical Analysis Systems Institute. Inc. Cary.
- Schalm O. W., Carrol E. J., Jain N. C. 1971. In: *Bovine mastitis*. Lea & Febiger, Philadelphia, 360 p.
- Shamay A. et al. 2005. Expression of albumin in nonhepatic tissues and its synthesis by the bovine mammary gland, *Journal Dairy Science* 88(2):569-576.
- Simplicio K. M. M. G. 2011. Leucograma e proteínas de fase aguda de ruminantes domésticos sadios e enfermos. Dissertação Mestrado - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 118f.
- Smith K. L. & Schanbacher, F. L. 1977. Lactoferrin as a factor of resistance to infection of the bovine mammary gland. *Journal of American Veterinary Medical Association* 170:1224-1227.
- Suolaja L. et al. 2008. Acute phase response in two consecutive experimental E. Coli intramammary infections in dairy cows. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 50:18.
- Tizard I. R. 2002. *Imunologia veterinária: uma introdução*. 6 ed.: Roca, São Paulo, 532p.
- Urech E. & Puhán Z. 1999. Changes in milk protein fraction as affected by subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science* 82(11):2402-2411.

LEGENDA DE FIGURAS

- Fig. 1- Valores médios da concentração da proteína total (g/dL) do soro lácteo de glândulas mamárias sadias e infectadas de ovelhas Santa Inês durante a lactação.
- Fig. 2- Valores médios da concentração da albumina (mg/dL) do soro lácteo de glândulas mamárias sadias e infectadas de ovelhas Santa Inês durante a lactação.
- Fig. 3- Valores médios da concentração da concentração (mg/dL) de IgG total, IgG de cadeia pesada e IgG de cadeia leve do soro lácteo de glândulas mamárias sadias e infectadas de ovelhas Santa Inês durante a lactação.
- Fig. 4- Valores médios da concentração de concentração lactoferrina (mg/dL) do soro lácteo de glândulas mamárias sadias e infectadas de ovelhas Santa Inês durante a lactação.
- Fig. 5- Valores médios da concentração de concentração α - lactoalbumina (mg/dL) do soro lácteo de glândulas mamárias sadias e infectadas de ovelhas Santa Inês durante a lactação.
- Fig. 6- Valores médios da concentração de concentração β lactoglobulina (mg/dL) do soro lácteo de glândulas mamárias sadias e infectadas de ovelhas Santa Inês durante a lactação.
- Fig. 7- Valores médios da concentração da proteína de PM 15.000 Da (mg/dL) do soro lácteo de glândulas mamárias sadias e infectadas de ovelhas Santa Inês durante a lactação.
- Fig. 8- Valores médios da concentração da proteína de PM 29.000 Da (mg/dL) do soro lácteo de glândulas mamárias sadias e infectadas de ovelhas Santa Inês durante a lactação.
- Fig. 9- Valores da mediana da concentração de haptoglobina (mg/dL) e glicoproteína ácida (mg/dL) do soro lácteo de glândulas mamárias sadias e infectadas de ovelhas Santa Inês durante a lactação.

QUADRO

Quadro 1 – Valores médios, desvios-padrão, medianas, percentis (P25.,P75) e níveis de significância da concentração das proteínas (mg/dL) identificadas no soro lácteo de ovelhas Santa Inês em sadias e infectadas.

<i>Proteínas</i>	<i>Glândula Mamária</i>		<i>Pr > F</i>
	<i>Sadias</i>	<i>Infectadas</i>	
PT (g/dL)	1,81±0,20 ^b	2,56±1,01 ^a	0,0001
IgA	2,72±1,87 ^b	6,07±2,98 ^a	0,0001
Albumina	104,94± 48,90 ^b	193,57± 190,11 ^a	0,0001
IgG CP	83,04±46,71 ^b	156,69±139,32 ^a	0,0002
IgG CL	45,00±24,79 ^a	59,48±69,28 ^a	0,5350
IgG Total	126,56± 59,19 ^b	222,85± 154,68 ^a	0,0006
Lactoferrina	24,18± 11,33 ^b	117,09 ±115,56 ^a	0,0001
α - lactoalbumina	280,25±107,57 ^a	321,07±133,67 ^a	0,1252
β - lactoglobulina	1162,47± 166,56 ^b	1310,96± 228,48 ^a	0,0010
PM 15000	12,10 (8,46;15,07) ^b	28,65 (14,79;73,16) ^a	0,0091
PM 29000	71,61±42,04 ^b	115,93±79,96 ^a	0,0002
Haptoglobulina	0,00 (0,0;0,0) ^b	7,04 (4,12;12,50) ^a	0,0001
α -1 GPA	0,00 (0,0;0,0) ^b	3,99 (3,26;7,24) ^a	0,0001

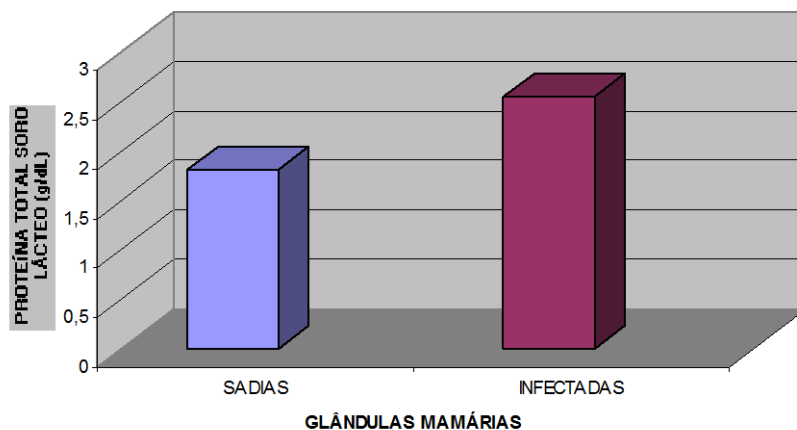


Figura 01

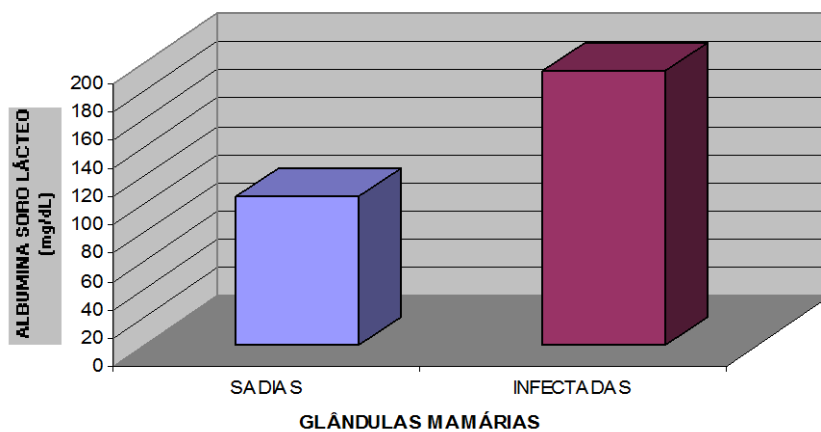


Figura 02

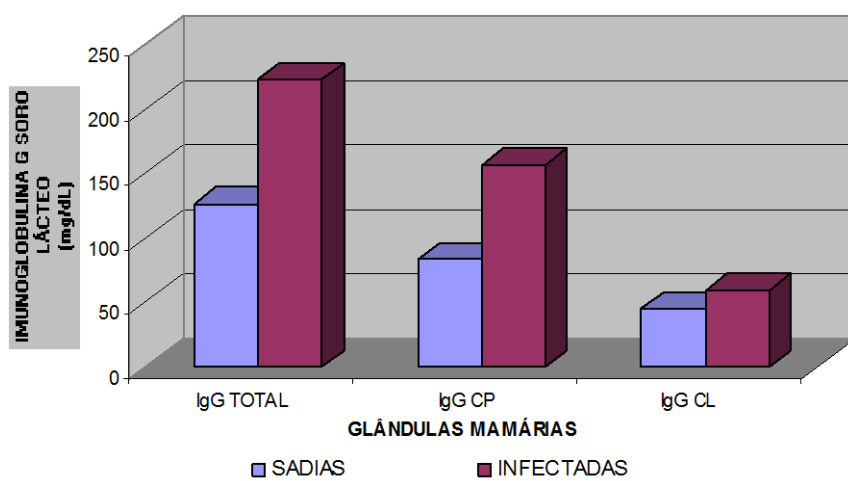


Figura 03

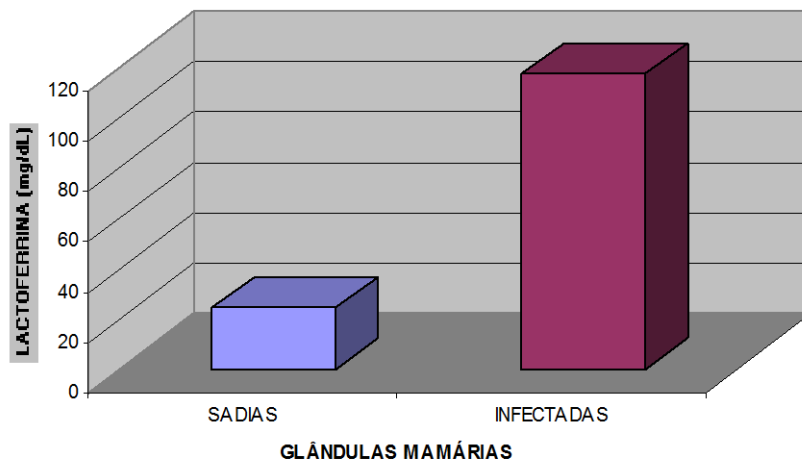


Figura 04

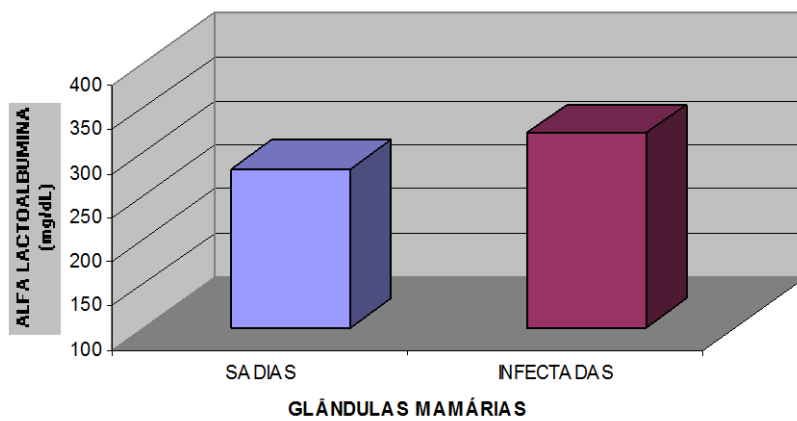


Figura 05

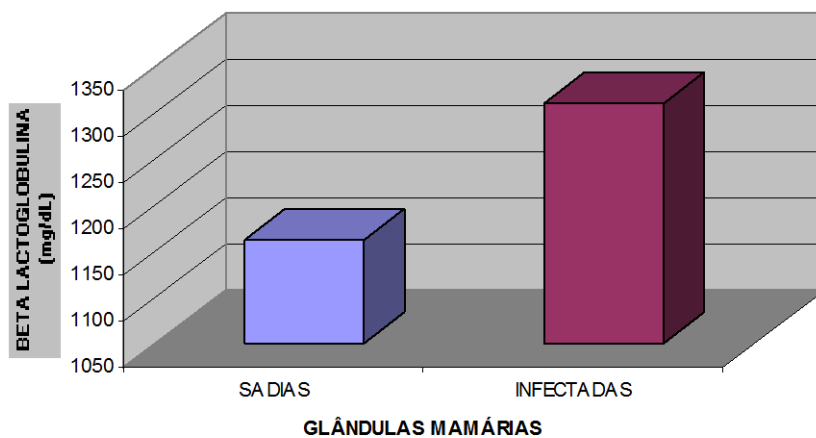


Figura 06

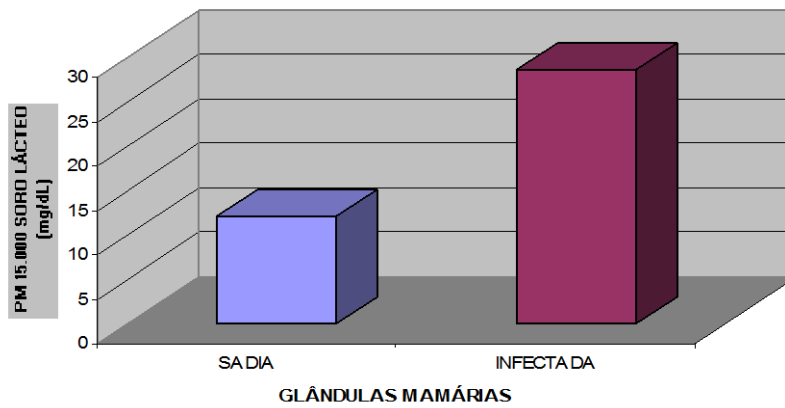


Figura 07

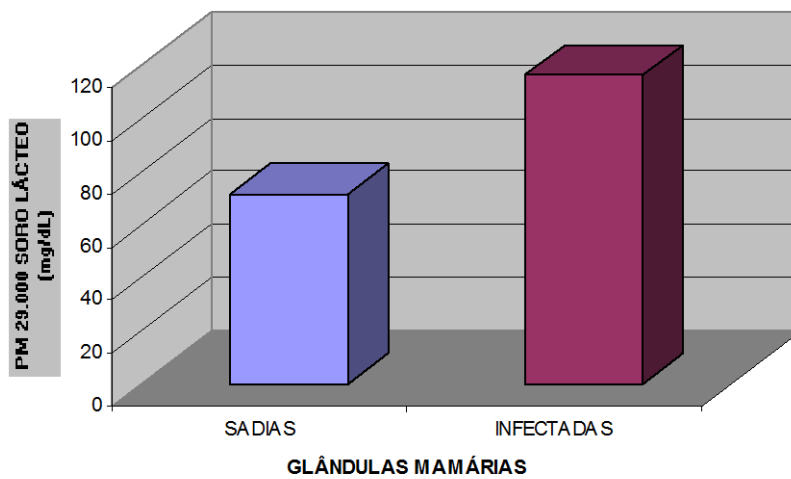


Figura 08

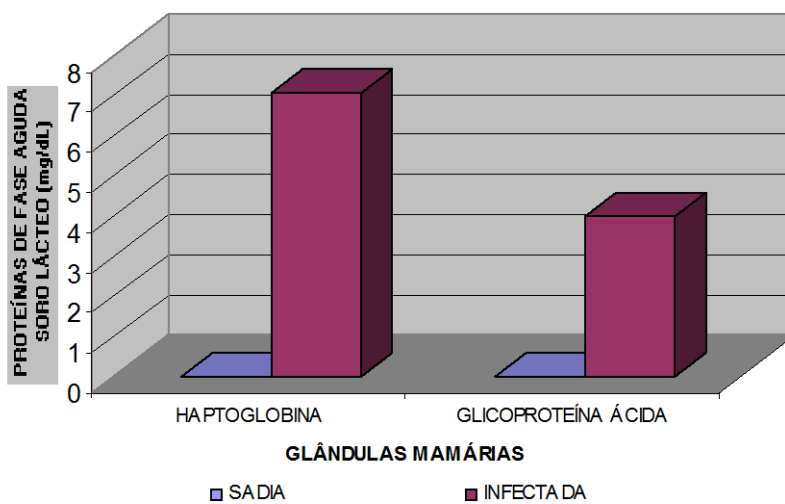


Figura 09

6- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sob condições fisiológicas, houve influência das fases da lactação sobre a concentração do soro sanguíneo da imunoglobulina G (IgG), bem como sobre a proteína total, albumina, β -lactoglobulina e IgG do soro do leite.

Ao comparar o soro do leite de glândulas mamárias sadias à glândulas infectadas (mastite subclínica), as proteínas haptoglobina e a α -1 glicoproteína ácida se mostraram importantes biomarcadores de processos inflamatórios da mama em ovelhas, sendo caracterizadas somente nas glândulas portadoras de mastite, enquanto que a albumina, a lactoferrina e as imunoglobulinas IgA e IgG aumentaram também suas concentrações quando da comparação das glândulas sadias frente às infectadas.

Diante destes achados vislumbra-se num futuro próximo a utilização destes biomarcadores como potenciais proteínas indicadoras de processos inflamatórios da glândula mamária de ovelhas, podendo ser empregadas como ferramenta rápida e precisa na rotina clínica, evitando prejuízos ao produtor rural e proporcionando melhor bem estar aos animais e, acima de tudo maior segurança alimentar para o consumidor.

7- ANEXOS

Anexo A – Fórmulas e prepare dos reagentes utilizados na execução da eletroforese em gel de poliacrilamida

Para a realização da eletroforese, tanto no soro sanguíneo quanto do soro lácteo, foram utilizados vários reativos que deveriam ser adrede preparados. A relação e preparo destes foram descritos a seguir:

1) Solução triz HCL- 2.0 M - pH 8.9 (Gel de Corrida)

Triz Base (PM:121,1)	121,1g
Água deionizada	500 mL

2) Solução triz HCL- 0,617 M - pH 6.8 (Gel Empilhador)

Triz Base (PM:121,1)	7,475 g
Água deionizada	100 mL

3) Solução Acrilamida/Bis (30% T / 2,67% C) para soro lácteo

Acrilamida para eletroforese Sigma (PM:71,08)	73,00 g
N,N-metileno-bis-acrilamida para eletroforese Sigma	2,00 g
Água deionizada	250 mL

4) Solução Acrilamida/Bis (30% T / 1,866% C) para soro sanguíneo

Acrilamida para eletroforese Sigma (PM:71,08)	73,60 g
N,N-metileno-bis-acrilamida para eletroforese Sigma	1,40 g
Água deionizada	250 mL

5) Solução EDTA 0,5M pH 8.3

(Etilenodinitrilo) ácido tetracético tetrassódico (PM:380,20)	19.01 g
Água deionizada	100 mL

6) Solução Lauril Sulfato de Sódio (SDS) 10%

Lauril Sulfato de Sódio Sigma (PM:288,4)	10,00 g
Água deionizada	100 mL

7) Solução Coomassie Blue 0,2% (Brilliant Blue R-250)

Metanol	500 mL
Ácido acético	100 mL
Água bidestilada	400 mL
Coomassie Blue (Brilliant Blue R)	2 g

8) Solução Gel Mix (Tampão da amostra para proteínas desnaturadas)

Lauril Sulfato de Sódio 10%	10,0 mL
EDTA 0,5M	4,0 mL
Triz-fosfato 0,617M pH 6.8	5,0 mL
2-Mercaptoetanol	3,0 mL
Glicerol	10,0 mL
Água deionizada	18,0 mL
Azul de bromofenol (Bromphenol Blue)	5,0 mg

9) Solução de Persulfato de Amônia 10%

Persulfato de amônia	0,1 g
Água deionizada	1,0 mL

10) Solução de PBS – Cálcio Free (Tampão Fosfato Salina) pH 7.2

NaCl	2,00 g
KCl	0,0625 g
Na ₂ HPO ₄ 12 H ₂ O	0,2875 g
Na ₂ HPO ₄	0,050 g
Água deionizada	250 mL

11) Solução Descorante

Metanol	250 mL
Ácido acético	100 mL
Água deionizada	650 mL

12) Solução Tampão de Corrida Concentrado

Trizma Base	30 g
Glicina	144 g
SDS	10 g
Água destilada	1000 mL

13) Solução Tampão de Corrida Diluído

Tampão de Corrida Concentrado	100 mL
Água destilada	900 mL

Anexo B – Procedimentos preliminares para realização da Eletroforese SDS- PAGE

Para a realização da Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE) utilizaram-se dois tipos de gel, um gel de aplicação e outro gel de separação. As suas preoperações são detalhadas à seguir:

1) Preparação do gel de Separação a 10%

Água deionizada	11,8 mL
Tris HCL 2M, pH 8.8 ±0,1	5,9 mL
Acrilamida/Bis	10,5 mL
Glicerol.	1,7 mL
EDTA 0,5M, pH 8.3±0,1	0,63 mL
Lauril Sulfato de Sódio (SDS) a 10%	0,63 mL
Persulfato de Amônio a 10%	242 µL
TEMED	27 µL

2) Preparação do gel de Empilhamento a 4%

Água deionizada	3,95 mL
Tris HCL 0,617M, pH 6.8 ±0,1	0,60 mL
Acrilamida/Bis	1,0 mL
Glicerol	300 µL
EDTA 0,5M, pH 8.3	123 µL
Lauril Sulfato de Sódio (SDS) a 10%	123 µL
Persulfato de Amônio a 10%	60 µL
TEMED	13 µL

3) Preenchimento das Placas

As Placas de vidro, previamente limpas, desengorduradas e montadas em posição vertical, foram preenchidas com o gel de separação até a altura correspondente ao tamanho do pente, adicionou-se $\pm 0,6 \mu\text{L}$ de etanol, esperou por até 60 minutos para polimerização do gel, removeu o etanol da placa e deixou secar. Adicionou-se o gel de empilhamento e a colocação do pente. Decorridos cerca de uma hora para polimerização do gel, retirou-se o pente, fixou a placa na cuba e adicionou a solução de corrida na parte superior da cuba até cobrir totalmente o gel e por fim adicionou-se a amostra.

4) Preparação das amostras e corrida eletroforética

As amostras foram preparadas adicionando-se $30 \mu\text{L}$ de PBS, $10 \mu\text{L}$ de amostra de soro sanguíneo, ou no caso de soro lácteo utilizou-se $20 \mu\text{L}$ de amostra e $20 \mu\text{L}$ de gel mix. Após aquecimento sobre água em ebulição, adicionou-se $5 \mu\text{L}$ de amostra do soro sanguíneo e $6 \mu\text{L}$ de amostra do soro lácteo, na placa contendo o gel de empilhamento e a solução tampão de corrida. Depois se procedeu com a conexão da cuba à fonte de energia, regulando para 20 miliampères por gel, após 90 minutos, em 25%. Coloração do gel adicionando-o na solução de Coomassie Blue por 30 a 120 minutos, em seguida a descoloração com ácido acético até anitidez das proteínas e finalmente sua determinação em densitômetro computadorizado Shimadzu CS 9301.

5) Padrões de Proteína Purificada e de peso Molecular

Para se realizar a identificação das frações protéicas no soro sanguíneo foi empregada solução da marca Sigma com pesos moleculares 29.000, 45.000, 66.000, 97.400, 116.000 e 205.000 daltons (Da), além das proteínas purificadas (Albumina, IgG, haptoglobina, α_1 -antitripsina e transferrina). No soro lácteo, para a identificação das frações protéicas, foi empregada como referência solução marcadora com diversos pesos moleculares (6.500 – 200.000 Da) e as proteínas purificadas lactoferrina, β -lactoglobulina e a α -lactoalbumina bovinas.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <jurgen.dobereiner@terra.com.br>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word. Havendo necessidade (por causa de figuras “pesadas”), podem ser enviados em CD pelo correio, com uma via impressa, ao Dr. Jürgen Döbereiner, Revista PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, Caixa Postal 74.591, Seropédica, RJ 23890-000. Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados não considerados para publicação em outra revista.

Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br) e o modelo em Word (PDF no site). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.

Apesar de não serem aceitas comunicações (*Short communications*) sob forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia serão recebidos para submissão somente os da área de Animais Selvagens.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (*peer review*).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impressa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (page charge) no valor de R\$ 120,00 por página editorada e impressa, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o Título do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.;
Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.;
Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S.,
ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso,
Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto,
Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso,
Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação,
recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o ABSTRACT deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de “INDEX TERMS” ou “TERMOS DE INDEXAÇÃO”, respectivamente;

d) o RESUMO deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a INTRODUÇÃO deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em MATERIAL E MÉTODOS devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em RESULTADOS deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na DISCUSSÃO devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as CONCLUSÕES devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) Agradecimentos devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de REFERÊNCIAS, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do “Style

o “Bibliographic Guide for Editors and Authors” (American Chemical Society, Manual for Biological Journals” (American Institute for Biological Sciences), Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser submetidos seguindo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob “Instruções aos Autores” (www.pvb.com.br). A digitalização deve ser na fonte Cambria, corpo 10, entrelinha simples; a página deve ser no formato A4, com 2cm de margens (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta “Inserir” do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corriqueiramente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails dos demais autores (para eventualidades e confirmação de endereço para envio do fascículo impresso);

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. **Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”;** a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et al. 2007);

f) a Lista das REFERÊNCIAS deverá ser apresentada isenta do uso de caixa alta, com os nomes científicos em itálico (grifo), e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse caso, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra “pé”. Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos (“slides”). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, com independência do texto) e serão apresentadas no final do trabalho.

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e colocados no final do texto. Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com “a” em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.