

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO COLOSTRAL EM NEONATOS OVINOS DA
RAÇA BERGAMÁCIA

CARLA MARIA VELA ULIAN

BOTUCATU – SP

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO COLOSTRAL EM NEONATOS OVINOS DA
RAÇA BERGAMÁCIA

CARLA MARIA VELA ULIAN

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção
do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Ass. Simone
Biagio Chiacchio

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Ulian, Carla Maria Vela.

Avaliação da absorção colostrar em neonatos ovinos da raça Bergamácia /
Carla Maria Vela Ulian. – Botucatu : [102p.], 2011

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista; Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Simone Biagio Chiacchio.

Capes: 50501062

1. Ovino. 2. Neonatologia veterinária. 3. Imunidade materna adquirida.

Palavras-chave: Neonatos; Ovinos; Colostro; Imunidade passiva.

Nome do Autor: Carla Maria Vela Ulian

Título: AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO COLOSTRAL EM NEONATOS OVINOS
DA RAÇA BERGAMÁCIA

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.Dr.Ass. Simone Biagio Chiacchio
Presidente e Orientador
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

ProfªDrª Simone Fernandes
Membro
Departamento de Produção Animal
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof.Dr. Paulo Roberto Rodrigues Ramos
Membro
Departamento de Física e Biofísica
IB – UNESP – Botucatu

Data da Defesa: 19 de agosto de 2011.

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a meus pais, Angela e Olivio, pelas “gotas de suor”
derramadas e rugas na testa para que eu pudesse realizar meu sonho de ser
Veterinária!*

Obrigada pelas suas palavras e seu amor!

*“Algumas vezes, tudo o que precisamos é de uma mão para segurar e um coração
para nos entender.” (Anônimo).*

AGRADECIMENTOS

Á Nossa Senhora Aparecida e São Francisco, pois foi a eles que muitas vezes recorri e obtive paz de espírito.

Agradeço, mais uma vez, aos meus pais Angela e Olivio, por todos os dias ao meu lado, por todas as palavras de carinho, conselhos e broncas, pois foram estas que me fizeram crescer e me moldaram para a vida “fora do ninho”.

Á minha irmã, Carina, pelos desabafos, risos e choros nos piores e melhores momentos, afinal de contas, ser gêmea tem que ter alguma vantagem!

Ao meu irmão, Érico, pela ajuda técnica com o computador.

A minha cachorra Mayla e meu cordeiro Talismã, pois são eles o foco do meu trabalho e dedicação.

Aos meus avós, Cecília e Vincenzo, que sempre habitarão meu coração e meus pensamentos, com sua força e zelo.

Ao meu orientador, Prof. Simone Biagio Chiacchio, por confiar na minha capacidade e responsabilidade, mesmo quando eu duvidava. Obrigada por me orientar e aguentar meus momentos de desespero.

Á Profa Simone Fernandes, por toda a amizade e disponibilidade antes, durante e depois do experimento.

Ao Prof. Paulo Roberto Rodrigues Ramos, pelos dias a fio atrás de uma boa eletroforese, banhada a muito pão e música.

Ao Prof. Adriano Dias, pelos “gritos” na estatística.

Ao Prof. Roberto Calderón Gonçalves, por me resgatar nos acidentes de percurso, quando não podia recorrer ao meu orientador.

A Profa. Maria Lúcia Gomes Lourenço, que deixou seus problemas de lado para me ajudar.

Ao veterinário que me inspirou esta jornada de amor aos animais, Fortunato Santoro.

À minha grande amiga Andreza Amaral da Silva, pois foi sua sabedoria e experiências me fizeram crescer como veterinária e pessoa. Gostaria que soubesse o quanto sou grata pela sua amizade e companhia.

Á Selene Babboni, Nicole Ruas, Ana Carolina Zoccal, Quézia Pereira, Guilherme Pilan, Aline Oliveira, amigos que vou guardar pra sempre.

Aos residentes, Juliana, Rodrigo e Giovanne, e os funcionários César e Marquinhos da Clínica de Grandes, obrigada pela paciência.

Ao funcionário, Edivaldo, do Setor de Ovinos da Fazenda Edgárdia, você fez a diferença.

A assistente de suporte acadêmico, Cilene Federici Padilha, por toda a ajuda e colaboração no mundo infinito da eletroforese.

Ao pós-graduando Hugo Shisei Toma, pelo compartilhamento do projeto e do sono.

A todos os alunos de zootecnia que me auxiliaram no andamento do projeto, obrigada pelas madrugadas mal dormidas.

A todos do Departamento de Clínica Veterinária, professores e funcionários, obrigada pela disposição e auxílio.

Aos novos colegas do Departamento de Física e Biofísica do Instituto de Biociências deste campus, mesmo não entendendo pra que serve o cromatógrafo.

Ao Laboratório VidaVet, pelas análises laboratoriais.

Ao meu time de Rugby “Sanguenuzóio”, pois foi com elas que aprendi o que é equipe e como precisamos de apoio em nossas vidas. Obrigada pelos tackles!

Aos donos e moradores da pensão “JR”, obrigada pelo teto e pela amizade.

As minha amigas distantes, Mabel Cordeiro e Juliana Baldin, obrigada pelas cartas e todos os conselhos de quem já passou pela mesma experiência.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado e do auxílio pesquisa, permitindo que pudesse desenvolver a pesquisa.

Por fim, a todos que não foram mencionados, mas me auxiliaram de alguma forma, direta ou indiretamente, obrigada por tudo!

*“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita.”
(Mahatma Gandhi).*

EPÍGRAFE

“Eu acredito, eu luto até o fim: não há como perder, não há como não vencer.”
(Oleg Taktarov).

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Estatística descritiva e medida de tendência central e posição dos valores do Rf a zero hora (M0) das proteínas séricas de cordeiros fracionadas em eletroforese Nativa a 7% de concentração no gel separador em um sistema descontínuo de tampões alcalinos..... 41
- Tabela 2 - Estatística descritiva e medida de tendência central e posição dos valores do Rf às 6 horas (M6) das proteínas séricas de cordeiros fracionadas em eletroforese Nativa a 7% de concentração no gel separador em um sistema descontínuo de tampões alcalinos..... 42
- Tabela 3 - Estatística descritiva e medida de tendência central e posição dos valores do Rf às 12 horas (M12) das proteínas séricas de cordeiros fracionadas em eletroforese Nativa a 7% de concentração no gel separador em um sistema descontínuo de tampões alcalinos..... 43
- Tabela 4 - Estatística descritiva e medida de tendência central e posição dos valores do Rf às 24 horas (M24) das proteínas séricas de cordeiros fracionadas em eletroforese Nativa a 7% de concentração no gel separador em um sistema descontínuo de tampões alcalinos..... 44
- Tabela 5 - Estatística descritiva e medida de tendência central e posição dos valores do Rf às 36 horas (M36) das proteínas séricas de cordeiros fracionadas em eletroforese Nativa a 7% de concentração no gel separador em um sistema descontínuo de tampões alcalinos..... 45
- Tabela 6 - Estatística descritiva e medida de tendência central e posição dos valores do Rf as 48 horas (M48) das proteínas séricas de cordeiros fracionadas em eletroforese Nativa a 7% de concentração no gel separador em um sistema descontínuo de tampões alcalinos..... 46
- Tabela 7 - Estatística descritiva e medida de tendência central e posição dos valores em % a zero hora (M0) das proteínas séricas de cordeiros fracionadas em eletroforese Nativa a 7% de concentração no gel separador em um sistema descontínuo de tampões alcalinos..... 47

Tabela 8 - Estatística descritiva e medida de tendência central e posição dos valores em % às 6 horas (M6) das proteínas séricas de cordeiros fracionadas em eletroforese Nativa a 7% de concentração no gel separador em um sistema descontínuo de tampões alcalinos.....	48
Tabela 9 - Estatística descritiva e medida de tendência central e posição dos valores em % às 12 horas (M12) das proteínas séricas de cordeiros fracionadas em eletroforese Nativa a 7% de concentração no gel separador em um sistema descontínuo de tampões alcalinos.....	49
Tabela 10 - Estatística descritiva e medida de tendência central e posição dos valores em % às 24 horas (M24) das proteínas séricas de cordeiros fracionadas em eletroforese Nativa a 7% de concentração no gel separador em um sistema descontínuo de tampões alcalinos.....	50
Tabela 11 - Estatística descritiva e medida de tendência central e posição dos valores em % às 36 horas (M36) das proteínas séricas de cordeiros fracionadas em eletroforese Nativa a 7% de concentração no gel separador em um sistema descontínuo de tampões alcalinos.....	51
Tabela 12 - Estatística descritiva e medida de tendência central e posição dos valores em % as 48 horas (M48) das proteínas séricas de cordeiros fracionadas em eletroforese Nativa a 7% de concentração no gel separador em um sistema descontínuo de tampões alcalinos.....	52
Tabela 13 - Estatística descritiva e medida de tendência central e posição dos valores de Rf a zero hora (M0) da fração gama do colostro fracionadas em eletroforese SDS-PAGE a 10% de concentração no gel separador em um sistema descontínuo de tampões alcalinos.....	53
Tabela 14 - Estatística descritiva e medida de tendência central e posição dos valores de Rf às 12 horas (M12) da fração gama do colostro fracionadas em eletroforese SDS-PAGE a 10% de concentração no gel separador em um sistema descontínuo de tampões alcalinos.....	53

Tabela 15 - Estatística descritiva e medida de tendência central e posição dos valores em % a 0 hora (M0) das proteínas séricas de cordeiros fracionadas em eletroforese Nativa a 7% de concentração no gel separador em um sistema descontínuo de tampões alcalinos.....	54
Tabela 16 - Estatística descritiva e medida de tendência central e posição dos valores em % às 12 horas (M12) das proteínas séricas de cordeiros fracionadas em eletroforese Nativa a 7% de concentração no gel separador em um sistema descontínuo de tampões alcalinos.....	54
Tabela 17 - Estatística descritiva e medida de tendência central e posição dos valores de proteína total (PT) do colostro (g/dL) das ovelhas, dosada por método espectrofotométrico e reagente de Biureto.....	55
Tabela 18 - Estatística descritiva e medida de tendência central e posição dos valores de proteína total sérica (PT, g/dL) dos cordeiros, obtida por refratometria.....	56
Tabela 19 - Estatística descritiva e medida de tendência central e posição dos valores de densidade (g/mL) do colostro das ovelhas nos períodos zero (M0) e 12 horas (M12) pós-parto, calculado pela fórmula ($d=m/v$).....	57
Tabela 20 - Estatística descritiva e medida de tendência central e posição dos valores de γ -globulina sérica dos cordeiros a partir da PT sérica (g/dL) e da % de globulinas obtida na eletroforese Nativa 7%, de acordo com os momentos de colheita.....	58
Tabela 21 - Estatística descritiva e medida de tendência central e posição dos valores de γ -globulina colostrar calculada a partir da PT colostrar (g/dL) e da % de globulinas obtida na eletroforese SDS-PAGE 10%, de acordo com os momentos de colheita	58
Tabela 22 - Correlação entre PT sérica e gamaglobulina dos cordeiros nos momentos M0, M6, M12, M24, M36 e M48.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Setor de Ovinos, Fazenda Edgárdia, Botucatu – SP.....	28
Figura 2 -	Ovelhas da raça Bergamácia usadas no projeto.....	29
Figura 3 -	Instalação com baias coletivas.....	30
Figura 4 -	Copo coletor de colostro com identificação.....	32
Figura 5 -	Cuba para eletroforese SDS-PAGE 10% pronta para receber amostra de soro colostrado ovino.....	34
Figura 6 -	Análise densitométrica do soro do colostro no momento zero hora. Relação entre corrida eletroforética SDS-PAGE 10% e análise no Image Master VDS.....	34
Figura 7 -	Cordeiro após cura do umbigo com iodo 10%.....	36
Figura 8 -	Cuba de eletroforese Nativa 7% com amostras dos soros dos cordeiros, conectada a fonte.....	38
Figura 9 -	Gel Nativa 7% com amostra de soro sanguíneo após corrida eletroforética.....	40
Figura 10 -	Análise densitométrica do soro de cordeiros nos momentos de colheita. Relação entre corrida eletroforética Nativa 7% e análise no Image Master VDS.....	41

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Teste t em relação ao Rf (mobilidade relativa) das frações proteicas do soro de cordeiros nos momentos de coleta (0 a 48 horas).....	60
Gráfico 2 -	Teste t em relação ao Rf (mobilidade relativa) da fração gama do soro do colostro no momentos de coleta zero e 12 horas pós-parto.....	60
Gráfico 3 -	Teste t em relação à porcentagem (%) das frações eletroforéticas do soro de cordeiros de acordo com os momentos (horas) de coleta.....	62
Gráfico 4 -	Teste t em relação a porcentagem (%) da fração eletroforética gama do soro colostrado de acordo com os momentos zero e 12 horas, dentro da PT do colostro.....	62
Gráfico 5 -	Concentração de gamaglobulina sérica (g/dL) em relação aos momentos de coleta. Teste inteiramente casualizado.....	63
Gráfico 6 -	PT sérica (g/dL) nos momentos experimentais.....	65
Gráfico 7 -	Concentração de gamaglobulina colostrado (g/dL) em relação ao período de coleta. Teste inteiramente casualizado.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IBGE	Instituto Brasileiro de Geoprocessamento e Estatística
Ig	Imunoglobulina
IgA	Imunoglobulina A
IgD	Imunoglobulina D
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgG	Imunoglobulina G1
IgG2	Imunoglobulina G2
IgM	Imunoglobulina M
TIP	Transferência de Imunidade Passiva
FTIP	Falha na Transferência de Imunidade Passiva
α – globulina	Alfa – Globulina
β – globulina	Beta – Globulina
γ – globulina	Gama – Globulina
IR	Imunodifusão Radial
ECC	Escore de Condição Corporal
US	Ultrassonografia
OPG	Ovos por Grama
PT	Proteína Total
Abs	Absorbância
SDS – PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
Rf	Mobilidade relativa

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	16
ABSTRACT	17
1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	
2.1. Características Reprodutivas dos Ovinos	20
2.2. Colostro e Imunidade Passiva	21
2.3. Falha na Transferência de Imunidade Passiva	23
2.4. Eletroforese	
2.4.1. Nativa.....	25
2.4.2. SDS-PAGE.....	25
3. OBJETIVOS	
3.1. Objetivo Geral	27
3.2. Objetivos Específicos	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	
4.1. Local de Experimentação	28
4.2. Animais	28
4.3. Alimentação	30
4.4. Exame Clínico	30
4.5. Ovelhas	31
4.5.1. Momentos Experimentais.....	31
4.5.2. Exame Clínico e Pesagem.....	31
4.5.3. Colheita do Colostro.....	31
4.5.3.1. Análises.....	32
4.5.3.2. Soro Lácteo.....	32
4.5.3.3. Proteína Total (PT)	33
4.5.3.4. Concentração de Gamaglobulina.....	33
4.5.3.5. Densidade.....	35
4.6. Cordeiros	35
4.6.1. Momentos Experimentais.....	36
4.6.2. Exame Clínico e Pesagem.....	36
4.6.3. Colheita de Sangue.....	37
4.6.3.1. Proteína Total (PT)	37
4.6.3.2. Concentração de Gamaglobulina.....	37

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
6. RESULTADOS	
6.1. Eletroforese Nativa 7%.....	40
6.2. Eletroforese SDS-PAGE 10%.....	53
6.3. Método de Biureto e Espectrofotometria.....	55
6.4. Refratometria.....	56
6.5. Densidade Colostral.....	57
6.6. Gamaglobulina.....	57
7. DISCUSSÃO.....	59
8. CONCLUSÃO.....	69
9. REFERÊNCIAS.....	70
10. ANEXOS.....	79
11. ARTIGO CIENTÍFICO.....	97

ULIAN, C.M.V. **Avaliação da absorção colostrar em neonatos ovinos da raça Bergamácia.** Botucatu, 2011. 102p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

RESUMO

O trabalho teve por objetivo determinar o período de absorção das macromoléculas colostrais em cordeiros da raça Bergamácia para avaliar a transferência de imunidade passiva. Foram feitas determinações eletroforéticas do soro sanguíneo antes da primeira mamada até 48 horas de vida em gel de poliacrilamida Nativa 7%, e das frações colostrais entre zero e 12 horas pós-parto por eletroforese SDS-PAGE 10%. Também a determinação da PT sérica, por refratometria, e sua relação com densidade e quantidade de gamaglobulinas no colostro da mãe. Foram utilizadas 25 ovelhas e 29 cordeiros oriundos das gestações destas fêmeas. Os momentos experimentais foram M0, M6, M12, M24, M36 e M48 para colheita sanguínea nos cordeiros. Nos momentos zero e 12 horas também foram realizadas as colheitas de colostro das fêmeas. A concentração sérica de gamaglobulina variou de $0,111 \pm 0,07 \text{ g.dL}^{-1}$ antes da primeira mamada (M0) a $1,609 \pm 0,72 \text{ g.dL}^{-1}$ às 48 horas. A concentração no colostro variou de $3,125 \pm 1,27 \text{ g.dL}^{-1}$ no momento zero hora para $1,378 \pm 0,82 \text{ g.dL}^{-1}$ às 12 horas pós-parto. A concentração de PT sérica teve acréscimo de $4,46 \pm 0,58 \text{ g.dL}^{-1}$ para $5,61 \pm 0,75 \text{ g.dL}^{-1}$ entre as zero e 48 horas de vida tendo correlação positiva com a densidade e proteína total colostrar. A absorção colostrar pelo cordeiro foi ascendente até o M24 quando iniciou-se a estabilização. A quantificação da PT sérica, com uso de refratômetro, pode ser usada como método para avaliar a transferência de imunidade passiva, pois está diretamente relacionada com a absorção de gamaglobulina colostrar. Foi possível estabelecer uma equação preditora para a quantidade de gamaglobulina absorvida em relação ao tempo decorrido ($0,0171x^3 - 0,3138x^2 + 1,7598x - 1,3697$, $R^2 = 0,9945$).

Palavras – chave: Cordeiros, Eletroforese, Gamaglobulina, Transferência de imunidade passiva.

ULIAN, C.M.V. **Evaluation of colostral absorption in neonates of Bergamacia breed.** Botucatu, 2011. 102p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

ABSTRACT

The purpose was determining the absorption period of the colostral globulins in Bergamasca lambs to evaluate the passive immune transfer. Determinations were made of the electrophoretic serum before the first feeding up to 48 hours of life in polyacrylamide electrophoresis gel Native 7%, and the colostrum fractions between zero and 12 hours after birth by SDS-PAGE electrophoresis 10%. Serum protein was determinate by refractometry and correlate to density and colostral gammaglobulins of the sheep. Were used 25 sheep and 29 lambs. The blood samples was collected from lambs after birth prior to suckling (M0), and on the 6, 12, 24, 36 and 48 hours of birth. On the M0 and M12, was collected colostrum samples from sheep. The serum gammaglobulin concentrations before suckling were $0,111 \pm 0,07 \text{g.dL}^{-1}$ and rise until $1,609 \pm 0,72 \text{g.dL}^{-1}$ to 48 hours. In colostrum was $3,125 \pm 1,27 \text{g.dL}^{-1}$ in M0 and $1,378 \pm 0,82 \text{g.dL}^{-1}$ to M12. The serum protein increase of $4,46 \pm 0,58 \text{g.dL}^{-1}$ to $5,61 \pm 0,75 \text{g.dL}^{-1}$ between zero and 48 hours having positive correlation with the gravity and colostral protein. The absorption by the lamb raised until 24 hours when stabilizes. Serum protein quantification by the refractometry could be used as a method to evaluate immune passive transfer because was directly related with the gammaglobulin colostral absorption. The concentration could be estimated using the predictive formula $0,0171x^3 - 0,3138x^2 + 1,7598x - 1,3697$, ($R^2 = 0,9945$) for the time expend.

Key words: Electrophoresis, Immune passive transfer, Gammaglobulin, Lamb.

1. INTRODUÇÃO

A ovinocultura no Brasil apresenta-se em expansão, pois de acordo com dados do IBGE o efetivo de ovinos em 2009 foi de 16.812.105 de cabeças, com variação positiva de 1,1% sobre o registro feito em 2008 (16.628.571 de cabeças). O crescimento do rebanho foi de aproximadamente 13% em oito anos (2001 a 2009), e isso se deve a uma série de técnicas que auxiliam a eficiência produtiva e reprodutiva do rebanho, como a adoção de boas medidas de manejo sanitário e nutricional durante o período de reprodução. A região Sul tem participação significativa na formação deste rebanho, sendo o maior produtor (BARREIROS et al., 2007; IBGE, 2009; IBGE, 2011).

Umas das grandes preocupações na criação de ovinos no Brasil e no mundo é a elevada taxa de mortalidade em cordeiros nos primeiros dias de vida, diminuindo os ganhos produtivos (ROOK et al., 1990).

Em rebanhos ovinos, caprinos, bovinos, equinos e suínos, o período neonatal exige grandes cuidados, pois a taxa de mortalidade associada a infecções e falha na transferência passiva de imunidade é alta. Devido à gestação com forte barreira placentária, não há passagem de proteínas de alto peso molecular, os anticorpos, tornando os fetos agamaglobulinêmicos ou severamente hipogamaglobulinêmicos. Para que estes estejam devidamente protegidos fora do ambiente estéril do útero, é preciso que ocorra a ingestão o quanto antes e, se necessário, forçada do colostro (BARRINGTON; PARISH, 2006; TIZARD, 2009). Com essa manobra a transferência de imunidade passiva, passagem de anticorpos da mãe para o filhote, protegerá momentaneamente contra infecções ambientais as pequenas crias desprovidas de imunidade. A falta de uma primeira amamentação adequada torna o neonato susceptível a infecções consideradas de baixa gravidade, mas que podem levá-lo a óbito (TIZARD, 2009).

Ao nascer, o cordeiro deve estar preparado para controlar todos seus sistemas e órgãos, e rapidamente se adaptar ao meio extra-uterino para que tenha chance de sobreviver (PRESTES; LANDIM-ALVARENGA, 2006).

Fatores como baixo peso ao nascimento, não ingestão do colostro, partos múltiplos, idade da ovelha, e fatores relacionados ao ambiente como temperatura e clima, afetam diretamente a sobrevivência dos cordeiros

(CHRISTLEY et al., 2003). Em países como a Turquia, foram descritas taxas de mortalidade neonatal entre 3,2 e 63%, sendo as principais causas as doenças não infecciosas como estresse, trauma do parto e a imaturidade de vários sistemas ocasionando a tríade neonatal ou complexo hipotermia – inanição (GOKCE; ERDOGAN, 2009). Cerca de 10% dentre todas as causas de morte nos primeiros dias de vida nos cordeiros, refere-se à hipotermia por inabilidade de manter a temperatura corpórea dentro dos valores normais (38,5° - 39,5°C) quando exposto a baixa temperatura ambiente, e inanição advinda da alteração de comportamento e declínio das reservas energéticas (RADOSTITS et al., 2002).

Pouco se sabe do período ideal de absorção colostrar pelo intestino de neonatos ovinos, têm – se relatos de aumento dos níveis de imunoglobulinas séricas quando a ingestão ocorre nas primeiras horas de vida e grande decréscimo após 24 horas (TIZARD, 2009).

Desta maneira, a mudança no manejo de animais próximos ao parto deve ser assumida para que os recém-nascidos sejam capazes de ficar em pé, procurar o úbere e sugar, vigorosamente, o colostro, que é fonte de nutrição, hidratação, proteção imunológica e energia (DWYER & MORGAN, 2006; DWYER, 2008).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Características Reprodutivas dos Ovinos

Os ovinos são reprodutores de dia curtos, ou seja, a menor duração do dia altera a ciclicidade da ovelha. Seu ciclo estral tem duração média de 17 dias (14 a 19 dias) e sua gestação por volta de 147 dias (145 a 150 dias) (HAFEZ; HAFEZ, 2004; THOMPSON, 2006).

Nesta espécie, o tipo de placenta apresentada é sinepiteliocorial (ou sindesmocorial), constituída de endotélio, tecido conjuntivo e epitélio maternos, trofoblasto, tecido conjuntivo e endotélio embrionários. Estão presentes também, nesse tipo de placentação os chamados placentomas, que são a união das carúnculas do útero com os cotilédones da placenta. São 90 a 100 placentomas distribuídos pelo útero, e somente nestes pontos que ocorrem as trocas materno-fetais que suprimem as necessidades de oxigênio, nutrientes, hormônios e fatores de crescimento do feto, além de remover catabólitos e regular o ambiente uterino (PUGH, 2004; HAFEZ; HAFEZ, 2004; PRESTES; LANDIM-ALVARENGA, 2006).

Por difusão ocorre às trocas gasosas, passagem de água e elementos essenciais (cálcio, ferro, fósforo e iodo). A glicose é convertida em frutose e os lipídeos são parcialmente fragmentados para que ocorra a transferência. Os aminoácidos passam livremente, enquanto que as proteínas dependem de seu peso molecular. Já as imunoglobulinas (glicoproteínas formadoras de anticorpos) são impermeáveis, devido seu alto peso molecular, e só serão repassadas nas primeiras horas de vida do neonato, através da ingestão do colostro. Estas serão integralmente absorvidas pelo intestino (PRESTES; LANDIM-ALVARENGA, 2006).

Após o parto, a fêmea deve limpar e estimular o recém – nascido, com lambidas vigorosas, fazendo com que este se levante e procure o úbere o mais rápido possível (entre 15 minutos e 2 horas), isso também evita que outras fêmeas tentem roubar o cordeiro, pois forma-se uma estreita ligação entre mãe e filhote (JAINUDEEN et al., 2004).

2.2. Colostro e Imunidade Passiva

No manejo do período neonatal, a ingestão do colostro representa uma das mais importantes recomendações dentro do conjunto de medidas sanitárias do rebanho (SIMOES et al., 2005).

O colostro é produzido e armazenado nas glândulas mamárias nas últimas semanas de gestação a partir da mistura de secreções locais e de elementos oriundos do soro sanguíneo transportado através do epitélio alveolar, e tem grande importância na sobrevivência do neonato, pois é a principal fonte de nutrição e imunização (NORDI, 2010). Nele estão presentes sólidos totais (carboidratos, lipídeos, sais minerais, lactose), proteínas (caseína, albumina, globulinas), vitaminas (A, B, D, E), hormônios, fatores de crescimento, enzimas e elementos celulares (linfócitos, monócitos) (GEROV et al., 1987; MEDVEZKI, 1989; ODLE et al., 1996; BLUM; HAMMON, 2000; ONTSOUKA et al., 2003; BLUM, 2006).

As proteínas mais importantes são as globulinas, mais especificamente as γ – globulinas (gamaglobulinas). Destas, as principais são as imunoglobulinas (Ig) produzidas pelos linfócitos e plasmócitos presentes em baço e linfonodos, e são conhecidas como anticorpos e classificadas em cinco tipos: IgA, IgG, IgM, IgD e IgE. Entre estas estão presentes no colostro apenas IgA, IgG e IgM, que fornecerão imunidade passiva sistêmica ao cordeiro (PUGH, 2004; PARK; LINDBERG, 2006; TIZARD, 2009).

Do total de imunoglobulinas presentes no colostro, 88% são IgG (IgG1 e IgG2), 7% IgM e 5% IgA (PAHUD; MACH, 1970; MICUSAN; BORDUAS, 1976; HALLIDAY, 1978; LARSON et al., 1980; RADOSTITS et al., 2002; YANG et al., 2009). Das IgG, a maior porção é de IgG1, devido à presença de sítios de ligação específicos entre o primeiro e terceiro dia que antecedem o parto (SASAKI et al., 1976).

O colostro ingerido nas primeiras horas de vida passa direto para o trato gastrointestinal, que durante as primeiras 48 horas possui condições especiais como alta permeabilidade às macromoléculas, pequena produção de ácido clorídrico no abomaso, presença do fator de inibição da tripsina gástrica no colostro e baixa atividade enzimática na mucosa intestinal (KRUSE, 1983; NORDI, 2010).

As imunoglobulinas sofrem processo de pinocitose pelas células epiteliais intestinais, que possuem baixa seletividade, e são transportadas para o sistema linfático e, assim, para o sistema circulatório. Com isso, tornam o jovem animal imune temporariamente (KRUSE, 1983; BESSI et al, 2002ab).

Pouco se sabe do período ideal de absorção colostrar pelo intestino de neonatos ovinos, têm-se relatos de aumento dos níveis de imunoglobulinas séricas quando a ingestão ocorre nas primeiras horas de vida e grande decréscimo de absorção após 24 horas. Isso se deve ao amadurecimento das células intestinais, ou melhor, pela troca por uma primeira geração de células adultas, maduras, caracterizadas pela impermeabilidade a macromoléculas (SMEATON, SIMPSON-MORGAN, 1985; XU, 1996; BESSI et al., 2002ab; KINDLEIN et al., 2008).

O colostro também sofre alterações na quantidade de imunoglobulinas, que diminuem gradativamente com o avançar da lactação (MCCARTHY; MCDUGALL, 1953; HUNTER et al., 1977; TIZARD, 2009). De acordo com Mellor e Murray (1986), essa mudança ocorre a partir das 18 horas da primeira mamada em ovelhas Scottish Blackface e Suffolk.

Levieux (1999), trabalharam com vacas holandesas, e observou que as concentrações de IgG1 (60mg.mL^{-1}) decaem pela metade a cada sucção subsequente e no sétimo dia, está por volta de 1mg.mL^{-1} , alcançando os valores normais do leite no 2º - 3º mês: $0,25\pm 0,5\text{mg.mL}^{-1}$. No colostro IgG₂ varia de $1,6\text{mg.mL}^{-1}$ até $6,4\text{mg.mL}^{-1}$, entretanto no leite normal suas concentrações estão em torno de $0,05\text{mg.mL}^{-1}$; a classe de IgM varia entre 5 e $8,7\text{mg.mL}^{-1}$ enquanto no leite está em $0,04\pm 0,05\text{mg.mL}^{-1}$. Os níveis de IgA no colostro e leite são 1,7 e 4mg.mL^{-1} respectivamente.

A qualidade do colostro também pode ser demonstrada a partir de sua densidade, como relatado por Fleenor e Stott (1980) num estudo com bovinos. Existe correlação positiva entre a quantidade de imunoglobulina, a proteína total e a densidade colostrar. Sabendo que no colostro, sólidos totais e densidade estão diretamente ligadas e que, 64% destes sólidos são representados pelas proteínas totais, pode – se afirmar que quanto maior concentração de proteínas maior é a densidade. Destas proteínas, 47% fazem parte da fração gamaglobulina, onde se encontram as imunoglobulinas; mais uma vez observa – se uma associação entre densidade e imunidade passiva.

Quanto maior a quantidade de proteínas totais, maior é a concentração de imunoglobulinas sendo, conseqüentemente, maior a densidade colostrar. Em números, o colostro de qualidade excelente tem densidade entre 1,076 a 1,046, com concentração de globulinas entre 126,62 a 49,82mg.mL⁻¹. Os de qualidade moderada ou intermediária são os que variam entre 1,045 a 1,035, com 47,27 a 21,80mg.mL⁻¹ de globulinas colostrais. Os considerados pobres ou de baixa qualidade possuem concentração entre 19,25 e 1,42mg.mL⁻¹, e densidade de 1,034 a 1,027, ou menos. O estudo foi realizado utilizando um hidrômetro calibrado, e de acordo com os autores, temperatura e quantidade de água podem subestimar os resultados.

2.3. Falha na Transferência de Imunidade Passiva

Os neonatos possuem linfócitos funcionais a partir de 80 dias de gestação, mas como não entram em contato com antígenos, devido à barreira placentária com alta seletividade, essas células não conseguem produzir anticorpos adequados. Os cordeiros nascerão agamaglobulinêmicos e somente após seis meses de idade estarão aptos a debelarem infecções agudas por conta própria (PUGH, 2004).

A falta de uma primeira amamentação adequada torna o neonato susceptível a infecções consideradas de baixa gravidade, mas que podem levá-lo a óbito. Sua proteção depende, exclusivamente, de altos níveis de imunoglobulinas no soro. Essa baixa concentração constitui a chamada falha na transferência de imunidade passiva (FTIP) (TIZARD, 2009).

A FTIP pode ocorrer por diversos fatores como falha na produção pelas glândulas mamárias maternas (má qualidade ou insuficiência), falha na ingestão pelo neonato (atraso, não ingestão ou ingestão de pequenas quantidades), falha de absorção intestinal ou tamanho de ninhada em relação à quantidade produzida de colostro. Qualquer que seja o motivo deve ser evitado para que os jovens estejam imunizados para iniciarem sua vida fora do ambiente uterino. Caso seja necessário, deve-se usar a ingestão forçada deste primeiro leite (HUNTER et al., 1977; BARRINGTON; PARISH, 2006; TIZARD, 2009).

Nóbrega et al. (2005) revisaram as principais causas de mortalidade em cordeiros recém nascidos no Brasil, demonstraram que 41,1% dessas mortes

deveram-se a infecções neonatais. As causas mais prováveis para uma taxa tão elevada podem ser atribuídas à ingestão inadequada de colostro, ausência de cuidados primários após o parto e falta de manejo sanitário nas instalações. Pode-se contornar essa situação adquirindo o hábito de auxiliar a mãe e o filhote desde o momento pré-parto até 24 ou 48 horas após, impedindo que ultrapasse o período de colostragem adequada (2 a 6 horas), de desinfecção do umbigo e limpeza do local de parição.

De acordo com Nunes (2006), em cordeiros mestiços da raça Santa Inês, considera-se falha de transferência quando a quantidade de Ig presente no soro está abaixo de 500mg.dL^{-1} , falha parcial quando entre 500 e 1500mg.dL^{-1} e completa quando maior que 1500mg.dL^{-1} . Em relação à quantidade IgG no colostro, a falha na transmissão constata-se quando a concentração está abaixo de 670mg.dL^{-1} , enquanto que uma boa transmissão apresenta valores de IgG superiores a 900mg.dL^{-1} .

Inúmeros pesquisadores têm usado o valor da proteína sérica total como um método indireto para estimar a concentração de imunoglobulinas no soro de bezerros. O método é baseado no simples fato de que valores baixos de proteína total refletem uma falha na transferência de anticorpos maternos. Como no recém-nascido o nível de albumina é pouco variável, as diferenças nas concentrações proteicas devem-se, quase que exclusivamente, à absorção de imunoglobulinas após a ingestão de colostro. Observou-se, no soro sanguíneo de bezerros com 24 horas de vida, uma correlação positiva entre a proteína total e em relação às frações beta e gamaglobulinas e imunoglobulina G, obtida através da turbidez pelo sulfato de zinco, e de IgG e IgM, obtidas pela imunodifusão radial (FEITOSA et al., 2001).

A determinação da proteína total por refratometria pode ser empregada com confiabilidade para identificar os indivíduos portadores de FTIP. O método é barato e simples, e pode ser realizado no campo com resultados rápidos, bastando aguardar a retração do coágulo para a obtenção de um pequeno volume de soro. Seria possível considerar o valor de $5,1$ a $6,0\text{g.dL}^{-1}$ de proteína total como indicativo de falha parcial da transferência de imunidade passiva, e o valor inferior ou igual a $5,0\text{g.dL}^{-1}$ como indicativo de falha total da transferência de imunidade passiva nos cordeiros (TURQUINO et al., 2011).

2.4. Eletroforese

2.4.1. Nativa

A separação das várias frações proteicas presente no soro sanguíneo pode ser feita por um método rápido e simples, a eletroforese de proteínas séricas. Este consiste em submeter uma amostra a um campo elétrico, forçando as diferentes proteínas a se separarem em bandas distintas, de acordo com seus pesos moleculares, configuração espacial e carga elétrica. O soro, então, é dividido em albumina (fração mais abundante, por volta de 60% das PT), α -globulinas 1 e 2, β -globulina e γ -globulina (composta pelas imunoglobulinas). A separação ocorre à medida que as proteínas correm do pólo negativo (cátodo) para o positivo (ânodo). Com a coloração adequada, é possível revelar onde há maior concentração das frações, ou seja, visualizam-se as bandas (SILVA et al., 2008).

Durante a eletroforese nativa, deve-se manter constante o pH do meio com uso de soluções tampão, pois as proteínas possuem característica anfótera, ou seja, alteram sua carga dependendo do pH em que se encontram (BRAMMER, 2001).

Diferentes meios podem ser utilizados para conduzir essa análise, entre eles estão o gel de poliacrilamida, agarose e celulose. Quaisquer que sejam os constituintes do meio de corrida precisam ser inertes para que não haja interferência na mobilidade das frações. Para análises mais minuciosas e com alta resolução, no caso de proteínas, o gel de escolha é a poliacrilamida. Formam-se dois géis para que ocorra a corrida, um de empilhamento que permite a entrada uniforme da amostra no gel, e o de separação, onde ocorrerá à separação elétrica das moléculas propriamente dita. A velocidade e o grau de fracionamento dependem dos poros do gel, da voltagem aplicada e do grau de ionização molecular, que por sua vez estão relacionadas ao peso e conformação da molécula que se quer identificar (SOUZA, 2010).

2.4.2. SDS-PAGE

Quando uma amostra apresenta grande quantidade de proteínas e estas possuem cargas elétricas muito próximas, faz-se uso de detergentes aniônicos, ou seja, substâncias que mascaram a carga das proteínas, tornando-as negativas, permitindo que corram livremente dentro do gel. A formação das

bandas ficará a cargo de seus pesos e conformações moleculares. O agente mais utilizado para este propósito é o SDS (sódio dodecil sulfato) (RAIMONDO, 2011).

Em 1985, Basch e colaboradores modificaram a técnica descrita por Laemmli (1970) para ser usada no fracionamento das proteínas do soro lácteo. Visam detectar a adulteração dos produtos derivados do leite a partir da relação caseína:proteínas. Também foi possível entender a patogenia da mastite a partir da identificação e isolamento das enzimas do leite (RAIMONDO, 2011).

A separação de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) é uma das técnicas mais utilizadas. A quantidade de SDS que se liga a proteína é proporcional ao tamanho da mesma, compondo a carga do complexo. O SDS proporciona maior solubilização da proteína, resultando em melhor resolução das bandas eletroforéticas. Antes que as proteínas da amostra iniciem sua separação dentro do gel, devem passar por outro gel de empilhamento, para garantir corrida uniforme e igualitária entre todas as frações. Este gel é confeccionado acima do de separação, e é onde as amostras serão aplicadas. As diferenças entre os géis são o pH do tampão e a quantidade de bis-acrilamida. A vantagem dessa técnica é a comparação, num mesmo gel, de variadas amostras (SMITH, 1984).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a transferência de imunidade passiva através da absorção colostrar das imunoglobulinas pelo cordeiro, analisando a qualidade e quantidade de anticorpos disponíveis no colostro das mães.

3.2. Objetivos Específicos

Aferir a quantidade de imunoglobulinas no colostro das ovelhas entre 0 e 12 horas após o parto, e no soro dos cordeiros recém - nascidos antes da primeira mamada até 48 horas de vida.

Classificar a qualidade do colostro pela medida de sua densidade e correlação com a quantidade de proteínas, ao nascimento e 12 horas após.

Relacionar a quantidade de imunoglobulinas do colostro e do soro dos neonatos nos mesmos momentos.

Avaliar a absorção colostrar pelo cordeiro.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local de Experimentação

O referido trabalho foi realizada na área de Produção e Pesquisa de Leite Ovino na Fazenda Edgárdia pertencente à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, no município de Botucatu, no Estado de São Paulo (Figura 1).



Figura 1 - Setor de ovinos - Fazenda Edgárdia. Fonte: ULIAN, 2010.

4.2. Animais

Foram colocadas em estação de monta 56 ovelhas da raça Bergamácia (Figura 4), em idade reprodutiva e menor que seis anos, multíparas, com escore de condição corporal (ECC) entre 3,0 e 4,0 (considerando 1,0 para animal caquético e 5,0 para obeso).



Figura 2 - Ovelhas da raça Bergamácia usadas no projeto. Fonte: ULIAN, 2010.

Foram realizados exames ultrassonográficos, num total de dois por fêmea, distribuídos por toda gestação para garantir um número mínimo de fêmeas gestantes.

Ao final do período gestacional, nasceram 29 cordeiros, em sua maioria únicos, das 25 mães confirmadas como prenhes.

A partir do terço final de gestação, para facilitar o acompanhamento dos partos, as fêmeas foram confinadas em instalação coberta e com cortinas móveis, separadas em baias para dois ($2,0 \times 2,0 \text{ m}^2$) ou quatro animais ($3,0 \times 2,0 \text{ m}^2$), forradas com cama de bagaço de cana com cocho de alimentação e suplementação mineral, e bebedouro automático (Figura 3).

Todos os partos foram assistidos por um veterinário de plantão.



Figura 3 – Instalação com baias coletivas. Fonte: ULIAN, 2010.

4.3. Alimentação

As ovelhas, durante a gestação, foram mantidas em pastagem de *Panicum maximum* cv Tanzânia durante o dia, a noite receberam suplementação de silagem de milho. Após o parto e dentro do barracão, passaram a receber ração para período de lactação, silagem de milho de fabricação própria, feno de braquiária triturado, sal mineral para ovinos e água *ad libitum*. Os recém-nascidos permaneceram com suas mães durante todo o período experimental.

4.4. Exame Clínico

Durante o experimento foram feitos exames clínicos periódicos nas fêmeas, controle de endoparasitas por meio de vermifugação dependente do OPG realizado mensalmente. Também foi feita vacinação contra clostridiose.

Os cordeiros receberam atenção especial, para que fosse possível a condução do experimento sem perdas de cordeiros. Após o nascimento, foram observados de perto analisando respiração, vigor, atitude, tentativa e sucesso de ficar em estação, atenção em procurar o úbere, formação da ligação materno-fetal através de balidos, evitando apenas que mamassem antes da colheita.

4.5. Ovelhas

4.5.1. Momentos Experimentais

Todas as colheitas foram realizadas em dois momentos: M0, sendo imediatamente após o parto, mãe na 0h, e M12 que equivale à condição da mãe às 12 horas após o parto.

4.5.2. Exame Clínico e Pesagem

Logo após o parto, aguardando o período de retirada dos envoltórios fetais, limpeza e formação de vínculo entre mãe e filhote, cada fêmea passou por uma rápida sequência de exames: aferição de temperatura retal, frequência cardíaca e respiratória, movimentos ruminais e pesagem. Utilizou-se balança digital (Tru-Test® Eziweigh 2¹). Durante todo o tempo, o filhote foi mantido próximo a sua mãe, mas sem mamar o colostro. Esses procedimentos não ultrapassaram mais que 10 minutos e tiveram finalidade de acompanhamento clínico.

4.5.3. Colheita do Colostro

Foi feita uma rápida limpeza do úbere com papel toalha para que, através de ordenha manual, fosse colhido colostro antes da primeira mamada do neonato (M0) e após 12 horas (M12) do parto. Foi feito um *pool* com jatos dos dois tetos, não excedendo o volume de 50 – 60mL por colheita em cada fêmea, utilizando copos coletores de tampa vermelha com volume máximo de 80mL (Figura 4).

¹ Tru-Test® Eziweigh 2, Tru-Test Limited, 2001. All rights reserved. EziWeigh is a trademark of Tru-Test Corporation Limited, Auckland, New Zealand.



Figura 4 - Copo coletor de colostro com identificação. Fonte: ULIAN, 2011.

Os recipientes foram identificados com o número de cada fêmea e a hora da colheita. Os mesmos foram colocados em geladeira para que ao final do dia, juntamente com todos os outros recipientes, fossem levados ao freezer de -20°C no Serviço da Clínica de Grandes Animais do Hospital Veterinário da FMVZ – Unesp Botucatu, para posteriores análises.

4.5.3.1. Análises

As amostras de colostro armazenadas em copo coletor foram descongeladas em banho-maria, 37°C, até completa solubilização. Logo após foram divididos em duas alíquotas, uma com o colostro puro para análise de densidade e outra para obtenção do soro lácteo, utilizado para proteína total (PT) e concentração de imunoglobulinas.

4.5.3.2. Soro Lácteo

O soro lácteo foi obtido a partir da adição de 5% de solução renina (Coagulante Líquido Estrella®²) ao colostro puro (SANT'ANA; BIRGEL, 2003). Após, foi adicionado 50% de N-Hexano para solubilização da gordura e, então, centrifugado por 15 minutos à 8000rpm em centrífuga refrigerada para completa retração do coágulo e separação dos lipídeos. Ao término, obteve-se uma solução trifásica composta por sobrenadante lipídico, soro lácteo na fase

² Coagulante Líquido Estrella®, Empresa Chr. Hansen Brasil, Valinhos – SP.

intermediária e coágulo de coalho na fase inferior. Pipetou – se a porção intermediária em novo tubo identificado para, por fim, ser utilizado nas análises.

4.5.3.3. Proteína Total (PT)

A concentração de proteína total do soro lácteo foi determinada pela técnica de biureto. Foram adicionados, em cubetas de plástico, 2,5mL do reativo de biureto e 50uL de amostra para leitura da absorbância em espectrofotômetro. O comprimento de onda utilizado foi 545nm. Para obter os valores da PT (Anexo 3), os resultados foram colocados na seguinte fórmula (FRAGA et al., 2009):

$$PT \text{ soro lácteo (g.dL}^{-1}\text{)} = \frac{(\text{absorbância} - 0,005)}{0,05}$$

4.5.3.4. Concentração de Gamaglobulina

O fracionamento das proteínas foi realizado através da eletroforese em gel de poliacrilamida 10% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme técnica descrita por Laemmli (1970) e as recomendações de Baroza (2007).

Devido à alta concentração de proteínas no soro lácteo, este foi diluído na relação 1:100 em solução tampão de amostra com SDS (detergente aniônico). Foram aplicados 9µL desta diluição, de cada amostra, nos géis para a corrida eletroforética (Figura 5).

Ajustes na corrida eletroforética também foram adaptados para soro colostrar ovinos (Anexo 1). Os géis foram digitalizados no Image Master® VDS³ para análise densitométrica (Figura 6).

³ Image Capture Board, Image Master® VDS System, Pharmacia Biotech Inc.

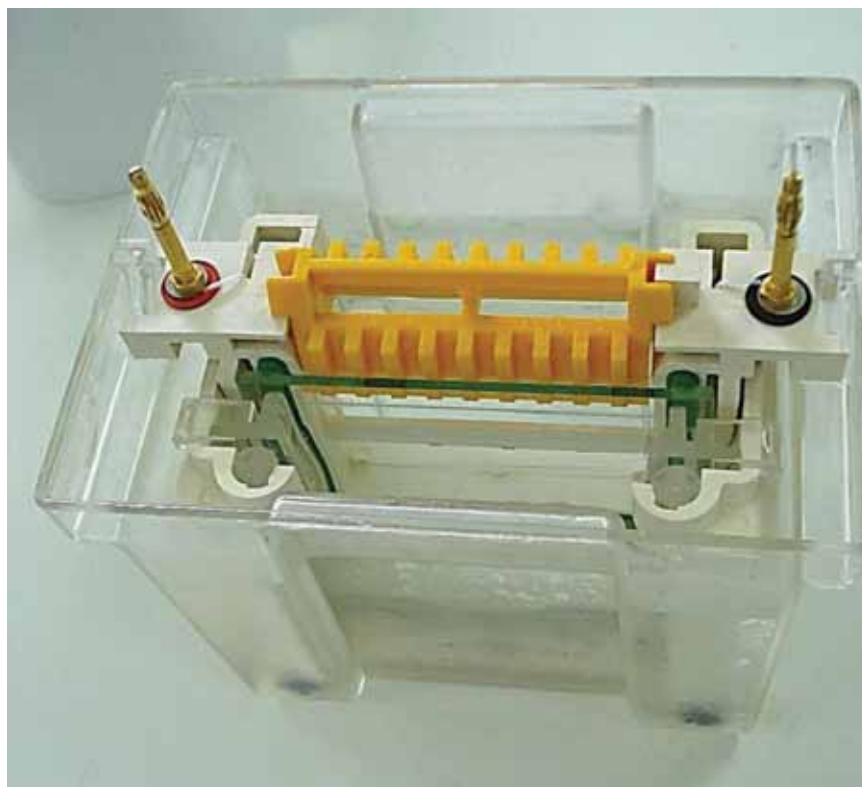


Figura 5 – Cuba para eletroforese SDS-PAGE 10% pronta para receber amostra de soro colostrar de ovinos. Fonte: ULIAN, 2011.

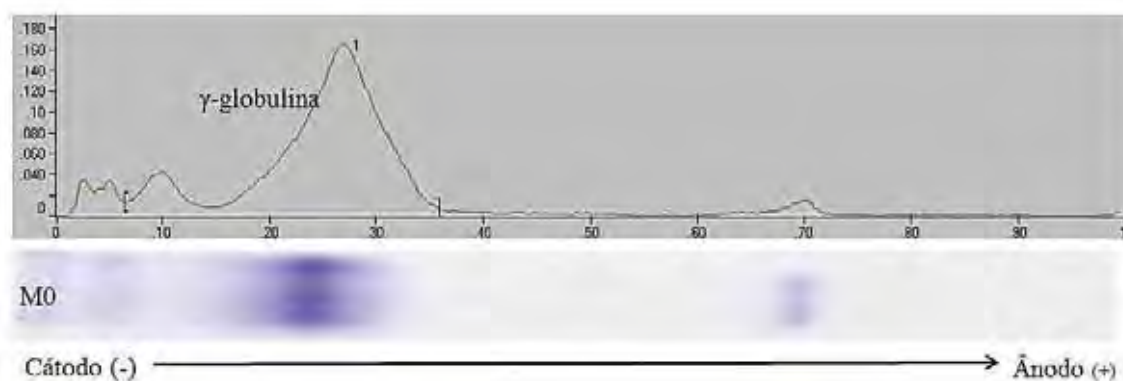


Figura 6 - Análise Densitométrica do soro do colostro no momento 0h. Relação entre corrida eletroforética SDS-PAGE 10% e análise no Image Master® VDS⁴. Fonte: ULIAN, 2011.

Os valores encontrados foram expressos numericamente de acordo com seus valores de mobilidade relativa (Rf), ou seja, a distância que a molécula

⁴ Image Capture Board, Image Master® VDS System, Pharmacia Biotech Inc.

proteica percorreu em relação à distância da linha frontal (azul de bromofenol utilizado no tampão):

$$R_f = \frac{\text{distância percorrida pela molécula}}{\text{distância percorrida pela linha frontal}}$$

As bandas formadas tem gradiente de cor variando com a quantidade de moléculas com mesmo peso que se depositam sobre o poro da rede de bis-acrilamida.

4.5.3.5. Densidade

A densidade do colostro das ovelhas foi obtida através da fórmula (Anexo 2):

$$\text{densidade (g.mL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{massa}}{\text{volume}}$$

Devido a grande viscosidade do líquido puro, não foi possível utilizar métodos comuns como, por exemplo, o refratômetro. Também não se pode usar o colostrômetro, pois a quantidade era muito pequena.

Comparações entre densidade do colostro e absorção colostrál também foram verificados.

4.6. Cordeiros

Após o nascimento, evitou – se que o cordeiro mamasse o colostro para não alterar os resultados da pesquisa. Foi respeitado o período de limpeza e ligação entre mãe e filhote, só sendo retirado para os exames e colheitas necessárias, quando este estivesse em estação por pelo menos cinco minutos. Logo após, o animal era devolvido a sua mãe e observado até que mamasse, caso houvesse rejeição, mesmo que momentânea, era forçada a ingestão do colostro.

4.6.1. Momentos Experimentais

As colheitas foram realizadas em seis momentos: M0, sendo imediatamente após o parto (0h), M6 (6h), M12 (12h), M24 (24h), M36 (36h) e M48 (48h).

4.6.2. Exame Clínico e Pesagem

Os recém – nascidos foram pesados em balança digital (Tru-Test® Eziweigh 2⁵). Foram aferidas temperatura retal, frequência cardíaca e respiratória afim de acompanhamento clínico e prevenção de intercorrências.

A cura do umbigo, com tintura de iodo a 10% (FIGUEIREDO, 1999), era realizada uma a 2 horas após o M0, permitindo a formação de uma forte ligação materno-fetal, para evitar que o cheiro do iodo associado à separação momentânea da mãe levasse a rejeição (Figura 7). Juntamente, era feita a identificação de cada animal.



Figura 7 - Cordeiro após cura do umbigo com Iodo 10%. Fonte: ULIAN, 2010.

⁵ Tru-Test® Eziweigh 2, Tru-Test Limited, 2001. All rights reserved. EziWeigh is a trademark of Tru-Test Corporation Limited, Auckland, New Zealand.

4.6.3. Colheita de Sangue

A colheita sanguínea nos neonatos foi feita através de punção da veia jugular, em tubos a vácuo (*Vacutainer*⁶) após assepsia e tricotomia local. Foram colhidos 3mL em tubos de colheita a vácuo sem anticoagulante, em cada um dos momentos já descritos. O sangue foi centrifugado por 10 minutos em 3500rpm (*CELM*⁷). O soro foi mantido sob refrigeração a 4°C até ser levado ao Serviço de Clínica de Grandes Animais do Hospital Veterinário da FMVZ-Unesp Botucatu, colocados em freezer à -20°C para posterior análise.

4.6.3.1. Proteína Total

Parte do sangue colhido em tubo sem anticoagulante foi passado para capilar não heparinizado, fechado com massa selante, centrifugado em microcentrifuga por 10 minutos à 3500rpm. Após, o capilar foi rompido na porção com soro e uma gota foi depositada sobre o visor de refratômetro para análise da proteína total sanguínea (PT) (Anexo 4).

Os procedimentos foram realizados no local de colheita e em todos os momentos experimentais.

4.6.3.2. Concentração de Gamaglobulina

As análises de concentração de imunoglobulinas totais e frações foram obtidas por eletroforese em gel de poliacrilamida Nativa 7% (Figura 8).

Para visualização satisfatória das bandas proteicas, foram necessários alguns ajustes até a padronização da técnica de solubilização das proteínas e corrida eletroforética. Após obtenção dos soros sanguíneos, foi feita a diluição deste em tampão carreador da amostra na razão de 1:6 (v:v). Ajustes na corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 7% também foram adaptados para soro sanguíneo de neonatos ovinos (Anexo 1). Os géis foram digitalizados no Image Master® VDS⁸ para análise densitométrica (Figura 10).

Os valores encontrados foram expressos numericamente de acordo com seus valores de mobilidade relativa (Rf), ou seja, a distância que a molécula

⁶ *Vacutainer*®, BD Diagnostic, São Paulo.

⁷ *CELM Combate*, CELM, São Paulo.

⁸ *Image Capture Board*, *Image Master*® VDS System, Pharmacia Biotech Inc.

proteica percorreu em relação à distância da linha frontal (azul de bromofenol utilizado no tampão):

$$R_f = \frac{\text{distância percorrida pela molécula}}{\text{distância percorrida pela linha frontal}}$$

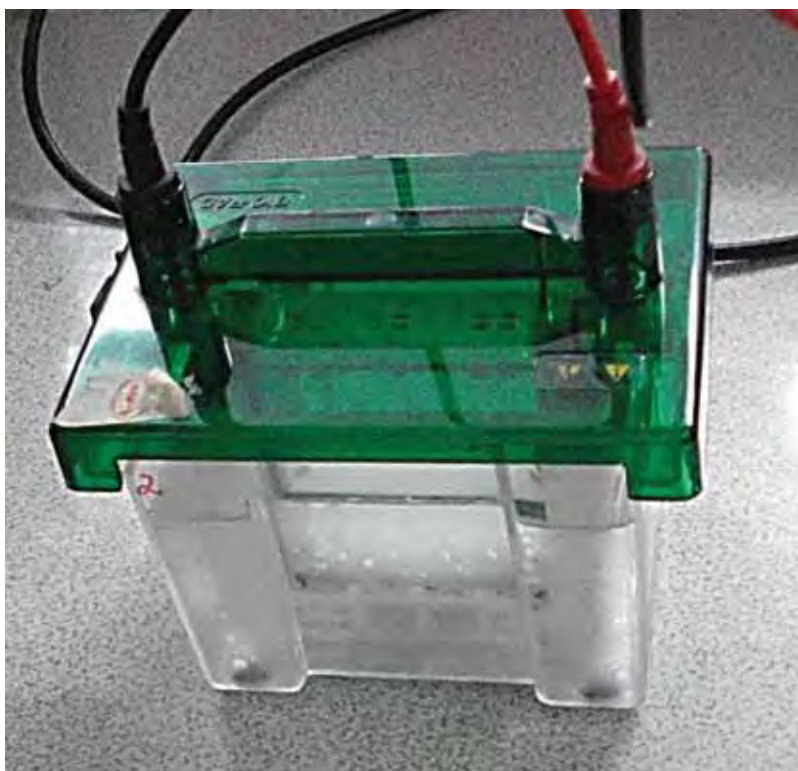


Figura 8 – Cuba de eletroforese Nativa 7% com amostras dos soros dos cordeiros, conectada a fonte. Fonte: ULIAN, 2011.

As bandas formadas tem gradiente de cor variando com a quantidade de moléculas com mesmo peso que se depositam sobre o poro da rede de bis-acrilamida.

Para a quantificação das γ -globulinas séricas dos cordeiros e colostrais, fez-se a multiplicação do valor total de proteínas (PT) pela porcentagem da fração gama encontrada na corrida eletroforética, resultando em valor numérico dessa concentração com unidade em g.dL^{-1} .

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as variáveis ligadas a eletroforese como mobilidade relativa (R_f), porcentagem (%) e dosagem das proteínas séricas, proteínas colostrais e densidade colostrais, foi utilizado o programa Assistat Statistical (SILVA; AZEVEDO, 2009) que reproduz a estatística descritiva dos dados calculando a média ($\bar{X}$), limites de confiança inferior e superior da média (95%), desvio padrão (s) e variância (s^2) para amostra.

Para a interação entre as variáveis, foi utilizada a análise de variância do programa Assistat Statistical (SILVA; AZEVEDO, 2009), com comparação entre os momentos de colheita e as frações eletroforéticas obtidas para proteínas sanguíneas, colostrais e densidade. Utilizou-se Teste t ao nível de 5% de probabilidade.

Nos dados referentes à densitometria de gamaglobulinas séricas, aplicou-se o Teste de Bartlett para a homogeneidade das variâncias. Para as médias, empregou-se o teste de Experimento Inteiramente Casualizado com probabilidades ao nível de 1% e 5%, pois a interação se deu dentro do tratamento (momentos). Foi aplicado o Teste t para o soro sanguíneo e Teste de Duncan para soro colostrais, ambos com probabilidade 5%.

A correlação de PT e gamaglobulina sérica dos cordeiros foi feita através do Teste de Spearman do programa IBM/SPSS Statistics v.19.0.

6. RESULTADOS

6.1. Eletroforese Nativa 7%

A corrida eletroforética dos soros dos cordeiros resultou no gel representado pela figura 9, após coloração com Comassie Blue 250R.

Foram encontradas sete bandas ou frações eletroforéticas nas amostras de soro sanguíneo de neonatos ovinos. Os Rf's condizem com as frações proteicas de γ -globulina, β -globulina, α -globulina e albumina sérica (Figura 10).

Na tabela 1 encontram-se as frações séricas e seus respectivos Rf's, obtidas na eletroforese Nativa 7% do soro sanguíneo ao nascimento, ou seja, à zero hora (M0). As frações 1, 2 e 3 representam as γ -globulinas, frações 4 e 5 correspondem a β -globulina, α -globulina e albumina sérica são indicadas pelas frações 6 e 7, respectivamente.

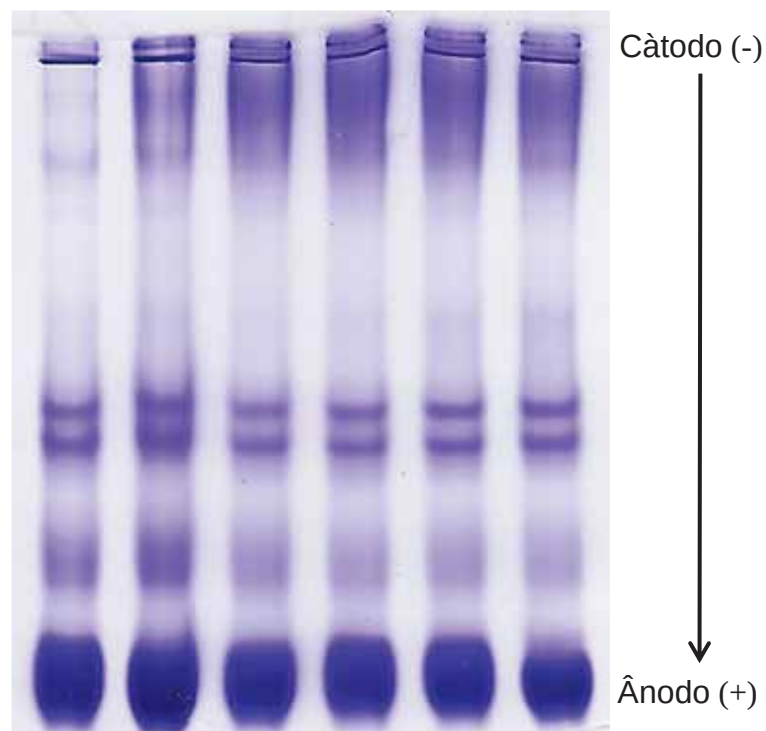


Figura 9 – Gel Nativa 7% do soro sanguíneo após corrida eletroforética.

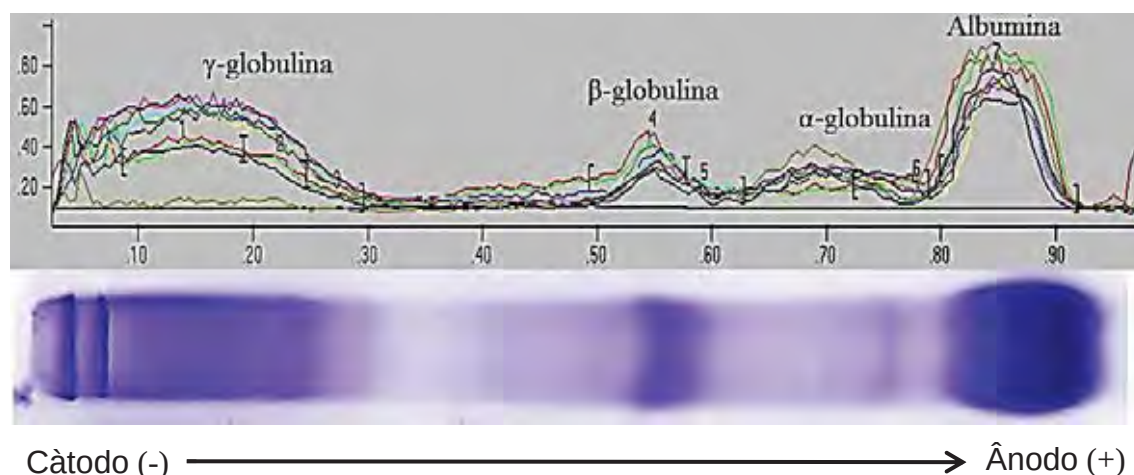


Figura 10 - Análise Densitométrica do soro de cordeiros nos momentos de colheita. Relação entre corrida eletroforética Nativa 7% e análise no Image Master® VDS⁹. Fonte: ULIAN, 2011.

Tabela 1 – Estatística descritiva e medidas de tendência central e posição dos valores do Rf a 0 hora (M0) das proteínas séricas de cordeiros, fracionadas em eletroforese Nativa a 7% de concentração no gel separador em um sistema descontínuo de tampões alcalinos.

Frações	γ-globulina			β-globulina		α-globulina	Albumina
	1	2	3	4	5	6	7
Média (X)	0,003	0,21	0,01	0,52	0,54	0,68	0,85
Lim. Conf. Inf.*	0,003	0,20	0,01	0,51	0,49	0,64	0,83
Lim. Conf. Sup.**	0,01	0,22	0,04	0,53	0,59	0,73	0,86
Desvio padrão (s)	0,02	0,03	0,09	0,03	0,15	0,13	0,03
Variância (s ²)	0,0004	0,0009	0,008	0,001	0,02	0,01	0,001

*Lim. Conf. Inf. – Limite de confiança inferior da média (95%); **Lim.Conf. Sup. – Limite de confiança superior da média (95%);

⁹ Image Capture Board, Image Master® VDS System, Pharmacia Biotech Inc.

Na tabela 2 que corresponde ao momento de colheita 6 horas M(6), as Rf's encontradas para cada banda proteica.

Tabela 2 – Estatística descritiva em medidas de tendência central e posição dos valores do Rf às 6 horas (M6) das proteínas séricas de cordeiros, fracionadas em eletroforese Nativa a 7% de concentração no gel separador, num sistema descontínuo de tampões alcalinos.

Frações	γ-globulinas			β-globulina		α-globulina	Albumina
	1	2	3	4	5	6	7
Média (X)	0,11	0,07	0,01	0,52	0,56	0,68	0,85
Lim. Conf. Inf.*	0,10	0,03	0,01	0,51	0,52	0,64	0,83
Lim. Conf. Sup.**	0,12	0,10	0,04	0,53	0,60	0,73	0,86
Desvio padrão (s)	0,02	0,10	0,09	0,03	0,11	0,13	0,03
Variância (s ²)	0,0007	0,01	0,008	0,001	0,01	0,01	0,001

*Lim. Conf. Inf. – Limite de confiança inferior da média (95%); **Lim.Conf. Sup. – Limite de confiança superior da média (95%).

Na tabela 3, foram dispostos os resultados obtidos na eletroforese do soro sanguíneo de cordeiros às 12h de vida (M12), de acordo com as frações proteicas obtidas. Os valores referem-se à mobilidade no gel (Rf).

Tabela 3 – Estatística descritiva em medidas de tendência central e posição dos valores do Rf às 12 horas (M12) das proteínas séricas de cordeiros, fracionadas em eletroforese Nativa a 7% de concentração no gel separador, num sistema descontínuo de tampões alcalinos.

Frações	γ-globulinas			β-globulina		α-globulina	Albumina
	1	2	3	4	5	6	7
Média (X)	0,11	0,04	0,01	0,52	0,56	0,68	0,85
Lim. Conf. Inf.*	0,10	0,01	0,01	0,51	0,46	0,64	0,83
Lim. Conf. Sup.**	0,12	0,07	0,04	0,53	0,58	0,73	0,86
Desvio padrão (s)	0,02	0,08	0,09	0,03	0,17	0,13	0,03
Variância (s ²)	0,0007	0,007	0,008	0,001	0,03	0,01	0,001

*Lim. Conf. Inf. – Limite de confiança inferior da média (95%); **Lim. Conf. Sup. – Limite de confiança superior da média (95%).

No momento 24 (M24), o soro sanguíneo utilizado na eletroforese Nativa 7%, produziu 7 bandas, demonstradas na tabela 4, com suas respectivas características de Rf.

Tabela 4 – Estatística descritiva em medidas de tendência central e posição dos valores do Rf às 24 horas (M24) das proteínas séricas de cordeiros, fracionadas em eletroforese Nativa a 7% de concentração no gel separador, num sistema descontínuo de tampões alcalinos.

Frações	γ-globulinas			β-globulina		α-globulina	Albumina
	1	2	3	4	5	6	7
Média (X)	0,10	0,21	0,42	0,47	0,50	0,61	0,77
Lim. Conf. Inf.*	0,08	0,20	0,38	0,41	0,43	0,53	0,68
Lim. Conf. Sup.**	0,11	0,22	0,46	0,52	0,57	0,70	0,85
Desvio padrão (s)	0,04	0,008	0,05	0,15	0,19	0,24	0,25
Variância (s ²)	0,001	0,00008	0,003	0,02	0,03	0,05	0,06

*Lim. Conf. Inf. – Limite de confiança inferior da média (95%); **Lim. Conf. Sup. – Limite de confiança superior da média (95%).

Na tabela 5 que corresponde ao momento de colheita 36 horas M(36), as Rf's encontradas para cada banda proteica.

Tabela 5 – Estatística descritiva em medidas de tendência central e posição dos valores do Rf às 36 horas (M36) das proteínas séricas de cordeiros, fracionadas em eletroforese Nativa a 7% de concentração no gel separador, num sistema descontínuo de tampões alcalinos.

Frações	γ-globulinas			β-globulina		α-globulina	Albumina
	1	2	3	4	5	6	7
Média (X)	0,10	0,22	0,41	0,48	0,52	0,63	0,79
Lim. Conf. Inf.*	0,09	0,20	0,39	0,44	0,46	0,56	0,72
Lim. Conf. Sup.**	0,11	0,23	0,44	0,53	0,58	0,71	0,86
Desvio padrão (s)	0,03	0,01	0,04	0,13	0,17	0,21	0,21
Variância (s ²)	0,001	0,0003	0,002	0,01	0,03	0,04	0,04

*Lim. Conf. Inf. – Limite de confiança inferior da média (95%); **Lim.Conf. Sup. – Limite de confiança superior da média (95%).

Para as frações proteicas alfa, beta e gamaglobulina, e albumina presentes no soro sanguíneo colhido após 48 horas de vida do cordeiro (M48), foram estabelecidos Rf's distintos (tabela 6).

Tabela 6 – Estatística descritiva em medidas de tendência central e posição dos valores do Rf às 48 horas (M48) das proteínas séricas de cordeiros, fracionadas em eletroforese Nativa a 7% de concentração no gel separador, num sistema descontínuo de tampões alcalinos.

Frações	γ-globulinas			β-globulina		α-globulina	Albumina
	1	2	3	4	5	6	7
Média (X)	0,10	0,22	0,26	0,49	0,52	0,64	0,79
Lim. Conf. Inf.*	0,09	0,20	0,18	0,44	0,46	0,56	0,72
Lim. Conf. Sup.**	0,12	0,23	0,33	0,53	0,58	0,71	0,87
Desvio padrão (s)	0,03	0,01	0,20	0,13	0,17	0,21	0,21
Variância (s ²)	0,001	0,0003	0,04	0,01	0,03	0,04	0,04

*Lim. Conf. Inf. – Limite de confiança inferior da média (95%); **Lim.Conf. Sup. – Limite de confiança superior da média (95%).

Na tabela 7 encontram-se os valores em porcentagem (%) das frações séricas obtidas na eletroforese Nativa 7% do soro sanguíneo ao nascimento, ou seja, há zero hora (M0). As frações 1, 2 e 3 representam as γ -globulinas, frações 4 e 5 correspondem a β -globulina, α -globulina e albumina sérica são indicadas pelas frações 6 e 7, respectivamente.

Tabela 7 – Estatística descritiva em medidas de tendência central e posição dos valores em % a 0 hora (M0) das proteínas séricas de cordeiros, fracionadas em eletroforese Nativa a 7% de concentração no gel separador, num sistema descontínuo de tampões alcalinos.

Frações	γ -globulinas			β -globulina		α -globulina	Albumina
	1	2	3	4	5	6	7
Média (X)	0,13	2,18	0,57	9,13	7,76	15,67	44,17
Lim. Conf. Inf.*	0,04	1,90	0,21	7,34	6,39	12,97	40,38
Lim. Conf. Sup.**	0,31	2,47	1,36	10,93	9,14	18,37	47,95
Desvio padrão (s)	0,51	0,81	2,27	5,18	3,96	7,78	10,92
Variância (s ²)	0,26	0,66	5,17	26,92	15,73	60,57	119,39

*Lim. Conf. Inf. – Limite de confiança inferior da média (95%); **Lim.Conf. Sup. – Limite de confiança superior da média (95%).

Na tabela 8, as frações proteicas que correspondem as bandas encontradas no gel após eletroforese Nativa, foram calculadas em percentual. A amostra utilizada foi colhida no momento 6 horas (M6).

Tabela 8 – Estatística descritiva em medidas de tendência central e posição dos valores em % às 6 horas (M6) das proteínas séricas de cordeiros, fracionadas em eletroforese Nativa a 7% de concentração no gel separador, num sistema descontínuo de tampões alcalinos.

Frações	γ -globulinas			β -globulina		α -globulina	Albumina
	1	2	3	4	5	6	7
Média (X)	17,97	0,96	0,15	6,74	6,40	12,46	38,39
Lim. Conf. Inf.*	14,07	0,42	0,14	6,04	5,44	10,77	35,24
Lim. Conf. Sup.**	21,87	1,51	0,45	7,44	7,36	14,16	41,55
Desvio padrão (s)	11,25	1,56	0,87	2,00	2,76	4,89	9,10
Variância (s ²)	126,63	2,44	0,75	4,02	7,61	23,96	82,89

*Lim. Conf. Inf. – Limite de confiança inferior da média (95%); **Lim.Conf. Sup. – Limite de confiança superior da média (95%).

Para as frações proteicas alfa, beta e gamaglobulina, e albumina presentes no soro sanguíneo colhido após 12 horas de vida do cordeiro (M12), foram estabelecidas porcentagens distintas (tabela 9).

Tabela 9 – Estatística descritiva em medidas de tendência central e posição dos valores em % às 12 horas (M12) das proteínas séricas de cordeiros, fracionadas em eletroforese Nativa a 7% de concentração no gel separador, num sistema descontínuo de tampões alcalinos.

Frações	γ -globulinas			β -globulina		α -globulina	Albumina
	1	2	3	4	5	6	7
Média (X)	26,30	4,03	0,15	5,95	5,20	10,36	33,33
Lim. Conf. Inf.*	21,73	2,68	0,14	5,22	4,28	8,90	30,21
Lim. Conf. Sup.**	30,86	5,37	0,44	6,69	6,13	11,83	36,44
Desvio padrão (s)	13,17	1,28	0,84	2,11	2,66	4,23	8,98
Variância (s ²)	173,52	1,64	0,71	4,48	7,12	17,95	80,80

*Lim. Conf. Inf. – Limite de confiança inferior da média (95%); **Lim.Conf. Sup. – Limite de confiança superior da média (95%).

Na tabela 10, que corresponde ao momento de colheita 24 horas (M24), as porcentagens encontradas para cada banda proteica foram calculadas e dispostas de acordo com a análise estatística desejada.

Tabela 10 – Estatística descritiva em medidas de tendência central e posição dos valores em % às 24 horas (M24) das proteínas séricas de cordeiros, fracionadas em eletroforese Nativa a 7% de concentração no gel separador, num sistema descontínuo de tampões alcalinos.

Frações	γ-globulinas			β-globulina		α-globulina	Albumina
	1	2	3	4	5	6	7
Média (X)	27,04	4,63	2,17	5,25	4,84	8,66	28,56
Lim. Conf. Inf.*	21,87	2,38	1,36	4,39	3,89	7,10	24,26
Lim. Conf. Sup.**	32,22	6,88	2,97	6,11	5,79	10,23	32,85
Desvio padrão (s)	14,93	1,81	1,27	2,49	2,73	4,52	12,39
Variância (s ²)	222,95	3,27	1,61	6,20	7,50	20,47	153,55

*Lim. Conf. Inf. – Limite de confiança inferior da média (95%); **Lim.Conf. Sup. – Limite de confiança superior da média (95%).

Na tabela 11, foram dispostos os resultados obtidos na eletroforese do soro sanguíneo de cordeiros às 36 horas de vida (M36), de acordo com as frações proteicas obtidas. Os valores referem-se à porcentagem (%).

Tabela 11 – Estatística descritiva em medidas de tendência central e posição dos valores em % às 36 horas (M36) das proteínas séricas de cordeiros, fracionadas em eletroforese Nativa a 7% de concentração no gel separador, num sistema descontínuo de tampões alcalinos.

Frações	γ -globulinas			β -globulina		α -globulina	Albumina
	1	2	3	4	5	6	7
Média (X)	25,57	4,81	2,13	6,03	5,24	8,66	30,74
Lim. Conf. Inf.*	21,02	3,70	1,72	5,13	4,32	7,24	26,83
Lim. Conf. Sup.**	30,13	5,93	2,53	6,93	6,15	10,07	34,65
Desvio padrão (s)	13,14	1,20	0,84	2,60	2,65	4,08	11,29
Variância (s ²)	172,90	1,44	0,72	6,79	7,04	16,68	127,53

*Lim. Conf. Inf. – Limite de confiança inferior da média (95%); **Lim.Conf. Sup. – Limite de confiança superior da média (95%).

Os valores de porcentagem (%) das frações proteicas das amostras sanguíneas colhidas às 48 horas (M48) estão dispostos na tabela 12. As frações 1 a 7 correspondem às globulinas (alfa1 e 2, beta1 e 2, e gama) e albumina.

Tabela 12 – Estatística descritiva em medidas de tendência central e posição dos valores em % às 48 horas (M48) das proteínas séricas de cordeiros, fracionadas em eletroforese Nativa a 7% de concentração no gel separador, num sistema descontínuo de tampões alcalinos.

Frações	γ-globulinas			β-globulina		α-globulina	Albumina
	1	2	3	4	5	6	7
Média (X)	24,38	5,32	2,44	6,55	5,46	8,76	31,36
Lim. Conf. Inf.*	20,03	4,06	1,93	5,62	4,40	7,41	27,37
Lim. Conf. Sup.**	28,72	6,58	2,94	7,48	6,52	10,11	35,34
Desvio padrão (s)	12,53	1,35	1,08	2,67	3,05	3,89	11,50
Variância (s ²)	157,18	1,84	1,17	7,14	9,30	15,18	132,41

*Lim. Conf. Inf. – Limite de confiança inferior da média (95%); **Lim.Conf. Sup. – Limite de confiança superior da média (95%).

6.2. Eletroforese SDS-PAGE 10%

Na tabela 13 encontra-se a fração sérica e seu respectivo Rf's, obtido na eletroforese SDS-PAGE 10% do soro do colostro a zero hora (M0). A fração representa as γ -globulinas.

Tabela 13 – Estatística descritiva em medidas de tendência central e posição dos valores do Rf a 0 hora (M0) da fração gama do colostro, fracionada em eletroforese SDS a 10% de concentração no gel separador, num sistema descontínuo de tampões alcalinos.

Fração	Média (X)	Lim. Conf. Inf.*	Lim. Conf. Sup.**	Desvio padrão (s)	Variância (s ²)
Gama	0,27	0,24	0,29	0,06	0,004

*Lim. Conf. Inf. – Limite de confiança inferior da média (95%); **Lim.Conf. Sup. – Limite de confiança superior da média (95%).

Na tabela 14, foi disposto o resultado obtido na eletroforese do soro colostrar às 12 horas pós-parto (M12), de acordo com a fração proteica obtida. O valor refere-se à mobilidade no gel (Rf).

Tabela 14 – Estatística descritiva em medidas de tendência central e posição dos valores do Rf às 12 horas (M12) da fração gama do colostro, fracionada em eletroforese SDS a 10% de concentração no gel separador, num sistema descontínuo de tampões alcalinos.

Fração	Média (X)	Lim. Conf. Inf.*	Lim. Conf. Sup.**	Desvio padrão (s)	Variância (s ²)
Gama	0,27	0,24	0,29	0,06	0,004

*Lim. Conf. Inf. – Limite de confiança inferior da média (95%); **Lim.Conf. Sup. – Limite de confiança superior da média (95%).

Para a fração proteica gamaglobulina, presente no soro colostrado colhido após o parto (M0), foi estabelecido percentual distinto (tabela 15).

Tabela 15 – Estatística descritiva em medidas de tendência central e posição dos valores em % a 0 hora (M0) das proteínas séricas do colostro, fracionada em eletroforese SDS a 10% de concentração no gel separador, num sistema descontínuo de tampões alcalinos.

Fração	Média (X)	Lim. Conf. Inf.*	Lim. Conf. Sup.**	Desvio padrão (s)	Variância (s ²)
Gama	44,23	38,10	50,35	15,44	238,40

*Lim. Conf. Inf. – Limite de confiança inferior da média (95%); **Lim.Conf. Sup. – Limite de confiança superior da média (95%).

Na tabela 16, que corresponde ao momento de colheita 12 horas (M12), a porcentagem encontrada para a banda proteica, calculada e disposta de acordo com a análise estatística aplicada.

Tabela 16 – Estatística descritiva em medidas de tendência central e posição dos valores em % às 12 horas (M12) da fração gama do colostro, fracionada em eletroforese SDS a 10% de concentração no gel separador, num sistema descontínuo de tampões alcalinos.

Fração	Média (X)	Lim. Conf. Inf.*	Lim. Conf. Sup.**	Desvio padrão (s)	Variância (s ²)
Gama	31,42	26,37	36,46	12,72	161,95

*Lim. Conf. Inf. – Limite de confiança inferior da média (95%); **Lim.Conf. Sup. – Limite de confiança superior da média (95%).

6.3. Método de Biureto e Espectrofotometria

As concentrações proteicas obtidas a partir do soro do colostro pelo método de biureto, nos respectivos momentos de colheita, estão expostas na tabela 17.

Tabela 17 – Estatística descritiva em medidas de tendência central e posição dos valores de proteína total do colostro (g.dL^{-1}) das ovelhas, dosada por método espectrofotométrico e reagente de Biureto.

Tempo (horas)	Média (X)	Lim. Conf. Inf.*	Lim. Conf. Sup.**	Desvio padrão (s)	Variância (s^2)
0	6,26	5,48	7,04	1,96	31,35
12	3,77	3,19	4,35	1,46	2,13

*Lim. Conf. Inf. – Limite de confiança inferior da média (95%); **Lim.Conf. Sup. – Limite de confiança superior da média (95%).

6.4. Refratometria

Na tabela 18 encontram-se os valores de proteína sérica total (PT) do soro dos cordeiros divididos entre os momentos de colheita, de 0 a 48 horas (M0 a M48).

Tabela 18 – Estatística descritiva: Medidas de tendência central e posição dos valores de proteína total sérica (g.dL^{-1}) dos cordeiros, obtida por refratometria.

Momentos	0	6	12	24	36	48
Média (X)	4,46	4,75	5,62	5,68	5,19	5,61
Lim. Conf. Inf.*	4,24	4,35	5,28	5,34	4,56	5,32
Lim. Conf. Sup.**	4,68	5,16	5,95	6,02	5,82	5,90
Desvio padrão (s)	0,58	1,06	0,87	0,88	1,64	0,76
Variância (s^2)	0,33	1,12	0,77	0,79	2,72	0,58

*Lim. Conf. Inf. – Limite de confiança inferior da média (95%); **Lim.Conf. Sup. – Limite de confiança superior da média (95%).

6.5. Densidade Colostral

A tabela 19 dispõe os resultados do cálculo da densidade colostrar entre os tempos 0 (zero) e 12 horas.

Tabela 19 – Estatística descritiva em medidas de tendência central e posição dos valores de densidade do colostro (g.mL^{-1}) das ovelhas nos períodos zero e 12 horas pós-parto, calculado pela fórmula $d = m/v$.

Tempo (horas)	Média (X)	Lim. Conf. Inf.*	Lim. Conf. Sup.**	Desvio padrão (s)	Variância (s ²)
0	1,071	1,063	1,077	0,015	0,0002
12	1,064	1,058	1,070	0,014	0,0002

*Lim. Conf. Inf. – Limite de confiança inferior da média (95%); **Lim.Conf. Sup. – Limite de confiança superior da média (95%).

6.6. Gamaglobulina

A partir da porcentagem de globulinas obtidas por eletroforese e a PT estabelecida por biureto, foi possível calcular a concentração de gamaglobulina no soro dos cordeiros em cada momento de colheita. Esses valores foram colocados na tabela 20.

Na tabela 21, foram colocados os valores de γ -globulina colostrar obtidos pelo mesmo cálculo usado para o soro dos cordeiros.

Tabela 20 – Estatística descritiva em medidas de tendência central e posição dos valores de γ -globulina sérica* dos cordeiros calculada a partir da PT sérica e da % de globulinas na eletroforese, de acordo com os momentos de colheita.

Momentos	0	6	12	24	36	48
Média (X)	0,111	0,983	1,568	1,801	1,656	1,609
Lim. Conf. Inf.**	0,08	0,76	1,23	1,45	1,33	1,32
Lim. Conf. Sup.***	0,13	1,20	1,90	2,15	1,97	1,89
Desvio padrão (s)	0,07	0,61	0,87	0,86	0,80	0,72
Variância (s^2)	0,005	0,38	0,77	0,75	0,66	0,52

*Valores em $g.dL^{-1}$. **Lim. Conf. Inf. – Limite de confiança inferior da média (95%); ***Lim.Conf. Sup. – Limite de confiança superior da média (95%).

Tabela 21 – Estatística descritiva em medidas de tendência central e posição dos valores de γ -globulina colostrar* calculada a partir da PT colostrar e da % de globulinas na eletroforese, de acordo com os momentos de colheita.

Tempo (horas)	Média (X)	Lim. Conf. Inf.**	Lim. Conf. Sup.***	Desvio padrão (s)	Variância (s^2)
0	3,125	2,61	3,64	1,27	1,62
12	1,378	1,04	1,71	0,82	0,68

*Valores em $g.dL^{-1}$. **Lim. Conf. Inf. – Limite de confiança inferior da média (95%); ***Lim.Conf. Sup. – Limite de confiança superior da média (95%).

7. DISCUSSÃO

No fracionamento eletroforético, em gel de poliacrilamida Nativa 7%, das proteínas presentes no soro do cordeiro foram obtidos 4 frações distintas que correspondem a γ -globulina, β -globulina, α -globulina e albumina. Dentro da fração gama distinguiu-se 3 bandas, mas não foi possível identificar quais imunoglobulinas estavam presentes por falta de especificidade. Com a fração beta ocorreu o mesmo, mas com apenas 2 bandas distintas que são as β 1-globulinas e as β 2-globulinas. Para que pudesse haver uma discussão sobre os achados, as frações foram agrupadas de acordo com suas mobilidades relativas (R_f) no gel.

No gráfico 1, foi demonstrado o Teste t que relaciona os achados eletroforéticos com os momentos experimentais. Neste não se observa diferença entre os tratamentos, isso porque o R_f não se altera, ou seja, a capacidade da molécula proteica em migrar pelo gel depende de seu peso e conformação e não da quantidade presente na amostra ou concentração do gel. Assim, o R_f será sempre o mesmo modificando apenas o grau de nitidez da banda formada na corrida.

No gráfico 2 que relaciona o R_f das gamaglobulinas das amostras de colostro nos momentos experimentais M0 e M12, revelados a partir da eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10%, também não se observa diferença entre os momentos.

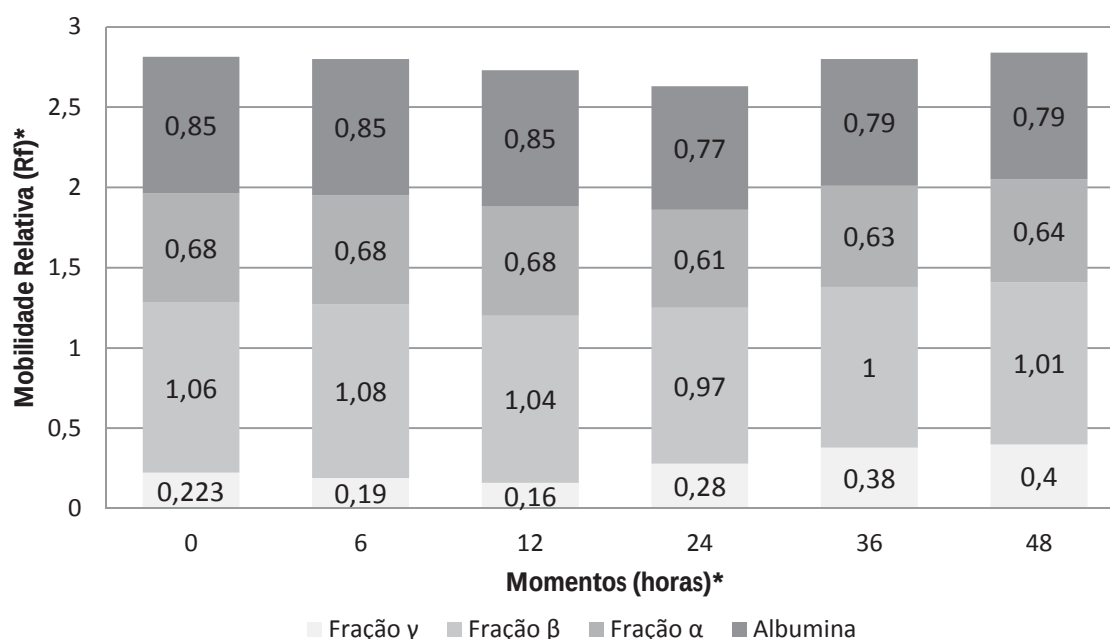


Gráfico 1 – Teste t em relação ao Rf (mobilidade relativa) das frações proteicas do soro de cordeiros nos momentos de colheita (0 a 48 horas).

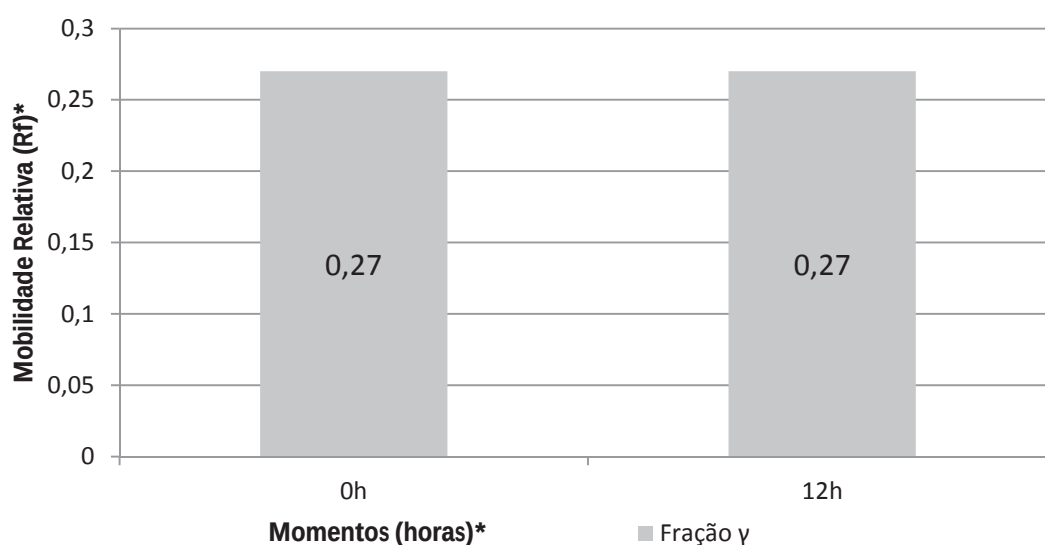


Gráfico 2 – Teste t em relação ao Rf (mobilidade relativa) da fração gama do soro do colostro nos momentos de colheita (0 e 12 horas).

Na análise densitométrica dos géis, tanto para soro sanguíneo quanto para soro colostrar, são obtidos valores numéricos em porcentagem da quantidade de proteínas presentes na banda em determinada posição.

As gamaglobulinas, foco principal do experimento, estão presentes em baixa concentração no momento zero (antes da primeira mamada) da corrida eletroforética do soro sanguíneo dos cordeiros. Isso estabelece que os animais nasçam hipogamaglobulinêmicos, confrontando a maioria dos autores que afirmam que os recém-nascidos da espécie ovina, assim como os bovinos, são agamaglobulinêmicos (PUGH, 2004; BARRINGTON; PARISH, 2006; TIZARD, 2009). A presença dessa pequena quantidade (2,5%) se deve a produção endógena de imunoglobulinas, pois os cordeiros são aptos a produzirem anticorpos ainda dentro do útero, mas sendo estas inespecíficas (TIZARD, 2009). Após a mamada do colostro ocorre um aumento de oito vezes na quantidade desta fração já nas primeiras 6 horas (19,5%) e a tendência é continuar elevando essa porcentagem até a estabilização dentro de 24 – 36 horas de vida. Isso revela a capacidade do cordeiro em absorver as proteínas do colostro, sendo este constituído por grande quantidade de proteínas, principalmente as gamaglobulinas (gráfico 3).

A porcentagem de gama no soro do colostro das mães dos cordeiros tende a decair com o passar do tempo (gráfico 4), isso porque o organismo da fêmea passa a dar prioridade para a produção de outros componentes que transformarão o colostro em leite. Ainda ocorrerá liberação para o leite de Ig, mas em concentrações muito reduzidas, como exemplifica Maestá (2003) ao estudar a concentração de IgG no colostro de ovelhas alimentadas com diferentes dietas até as 48 horas pós-parto ($0,390 \pm 0,13 \text{ g.dL}^{-1}$). Não foram analisadas amostras de colostro após o momento 12 horas no presente trabalho, ficando para posterior pesquisa.

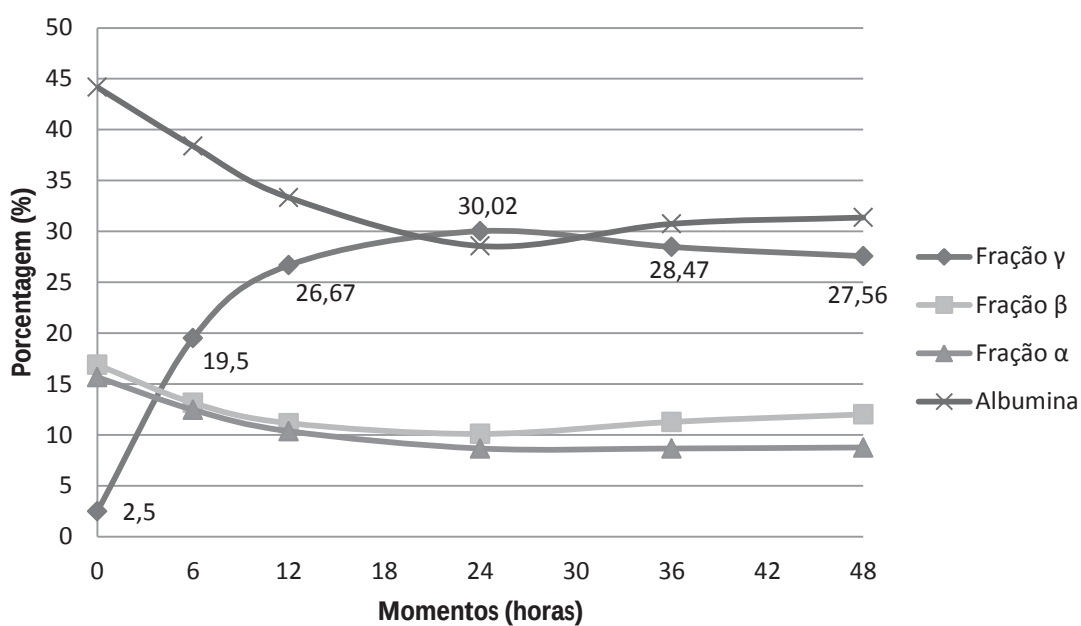


Gráfico 3 – Teste *t* em porcentagem (%) das frações eletroforéticas do soro de cordeiro em relação aos momentos (horas) de colheita.

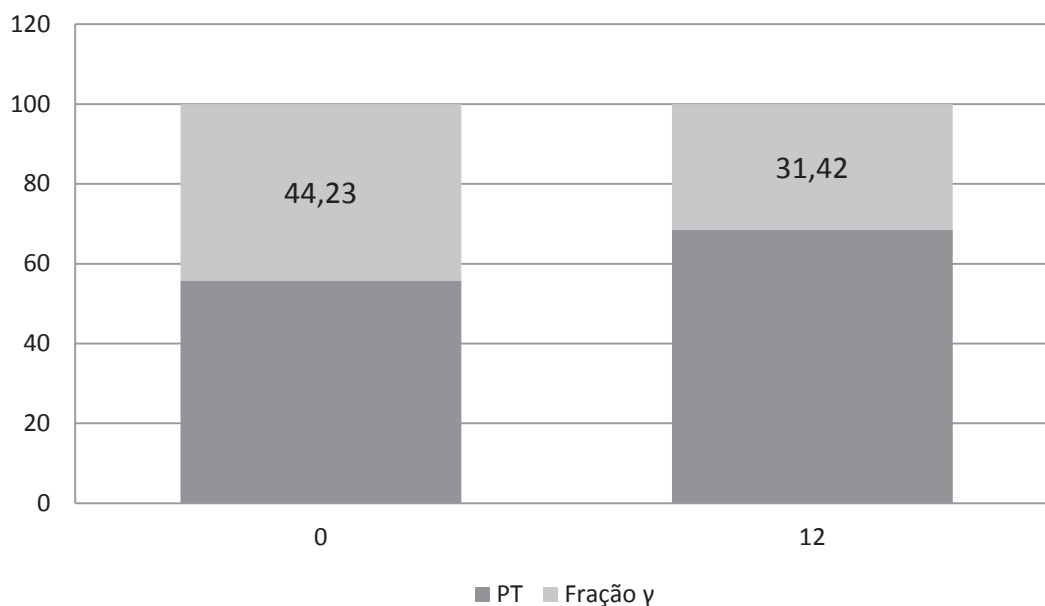


Gráfico 4 – Teste *t* em relação a porcentagem (%) da fração eletroforética gama do soro colostrar de acordo com os momentos zero e 12 horas, dentro da PT do colostro.

A máxima absorção de imunoglobulinas colostrais, em bovinos, se dá às 8 horas de vida, com queda brusca após esse período (CORTESE, 2009). O pico de absorção entre às 12 e 24 horas, observado no presente trabalho, não oferece prejuízo a imunidade do cordeiro (gráfico 5). Uma explicação para o longo período de absorção nos ovinos pode ser a quantidade de colostro ingerida, pois os cordeiros mamam entre 100 e 200mL por dia, enquanto que os bezerros ingerem de 2 a 4L. O colostro, além de ter propriedades de defesa também estimula o fechamento das microvilosidades intestinais às macromoléculas. Assim sendo, quanto maior a quantidade ingerida mais rápida será a troca de células epiteliais intestinais e menor a passagem de anticorpos. Por outro lado, esse rápido fechamento impede que agentes patogênicos adentrem ao organismo do neonato estimulando um quadro patológico (TIZARD, 2009).

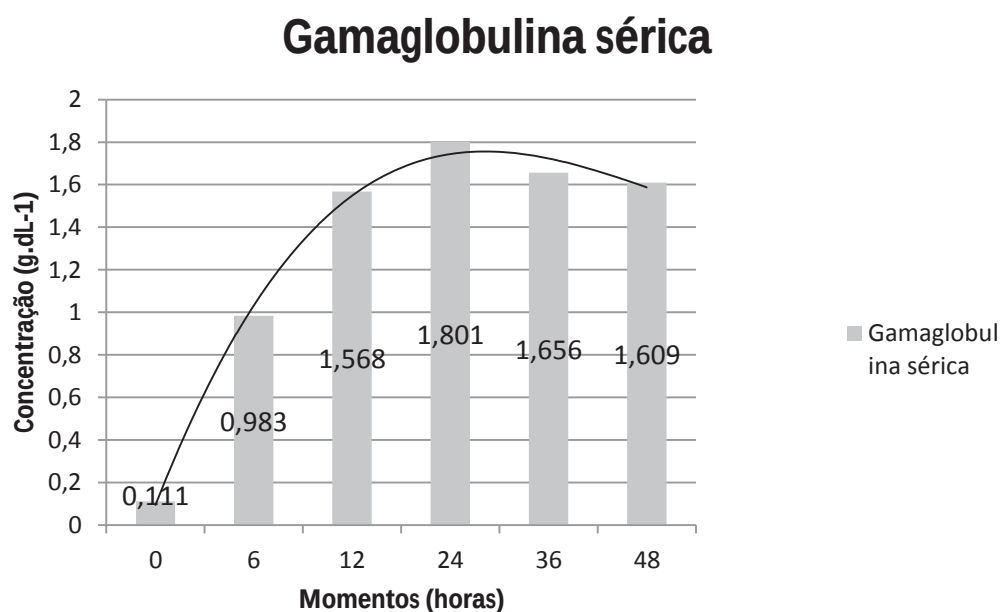


Gráfico 5 – Concentração de gamaglobulina sérica (g.dL⁻¹) em relação aos momentos de colheita. Teste Inteiramente Casualizado.

A entrada dessas globulinas na circulação do cordeiro confere imunidade passiva temporária, até que possa produzir seus próprios anticorpos específicos (RADOSTITS et al., 2002). A concentração de Ig no soro que condiz com boa imunidade em cordeiros varia entre os autores da literatura.

Shubber e Doxey (1979) observaram que concentrações maiores que $1,09\text{g.dL}^{-1}$ após 30 horas de vida conferem adequada imunidade. Feitosa e colaboradores (2001), trabalhando com bovinos, indicaram boa transferência quando valores maiores que $0,5\text{g.dL}^{-1}$, mas sendo ideal acima de $1,6\text{g.dL}^{-1}$ (FEITOSA et al., 2003). Relacionando aos valores encontrados às 24 horas neste trabalho ($1,801\pm 0,86\text{g.dL}^{-1}$) os cordeiros obtiveram quantidades suficientes de Ig colostrais para responderem adequadamente à infecções (tabela 20).

O uso do refratômetro como equipamento prático para avaliar a transferência efetiva de imunidade para o cordeiro pela averiguação da PT sérica revelou uma correlação positiva entre o valor obtido por esse método e a concentração de globulinas sérica (tabela 22). Assim, quanto maior o valor da proteína, maior presença de globulinas com função de anticorpo.

Tabela 22 – Correlação entre PT sérica e gamaglobulina dos cordeiros nos momentos M0, M6, M12, M24, M36 e M48

	Momentos	Gamaglobulina		
		Coef. Correlação	Valor de P	N*
PT	0h	,091	,557	29
	6h	,613a	,0001	29
	12h	,884a	,0001	29
	24h	,934a	,0001	27
	36h	,921a	,0001	29
	48h	,910a	,0001	28

*N – número de indivíduos. a – números seguidos pela mesma letra possuem significância estatística ($p<0,01$).

Em relação a PT sérica, foi observado um acréscimo na sua concentração entre os momentos M0 ($4,46\pm 0,58\text{g.dL}^{-1}$) e M24 ($5,68\pm 0,89\text{g.dL}^{-1}$), estabilizando logo após, como observado no gráfico 6. Esses dados condizem com o relatado por Silva e colaboradores (2007) que analisaram o soro de cordeiros mestiços, e obtiveram resultados de $3,62\pm 0,7\text{g.dL}^{-1}$ à zero

hora (0h) com aumento para $6,77 \pm 1,20 \text{ g.dL}^{-1}$ após 24 horas de vida. Os aumentos séricos demonstram a capacidade do organismo do neonato em absorver, em pouco tempo, grandes quantidades de moléculas proteicas e repassá-las a circulação. Também, a baixa atividade das enzimas proteolíticas intestinais permite que as microvilosidades, por ação pinocítica, absorvam as proteínas colostrais integralmente e passem a ter proteção contra antígenos, pois a maior parte destas são anticorpos.

As concentrações séricas antes da primeira mamada e com um dia de vida foram muito próximas às obtidas por Nunes (2006) para cordeiros nascidos de parto simples, respectivamente $4,649 \text{ g.dL}^{-1}$ e $7,235 \text{ g.dL}^{-1}$. Esta elevação ocorre devido a absorção maciça das proteínas, principalmente gamaglobulinas, que estão presentes no colostro em grandes quantidades.

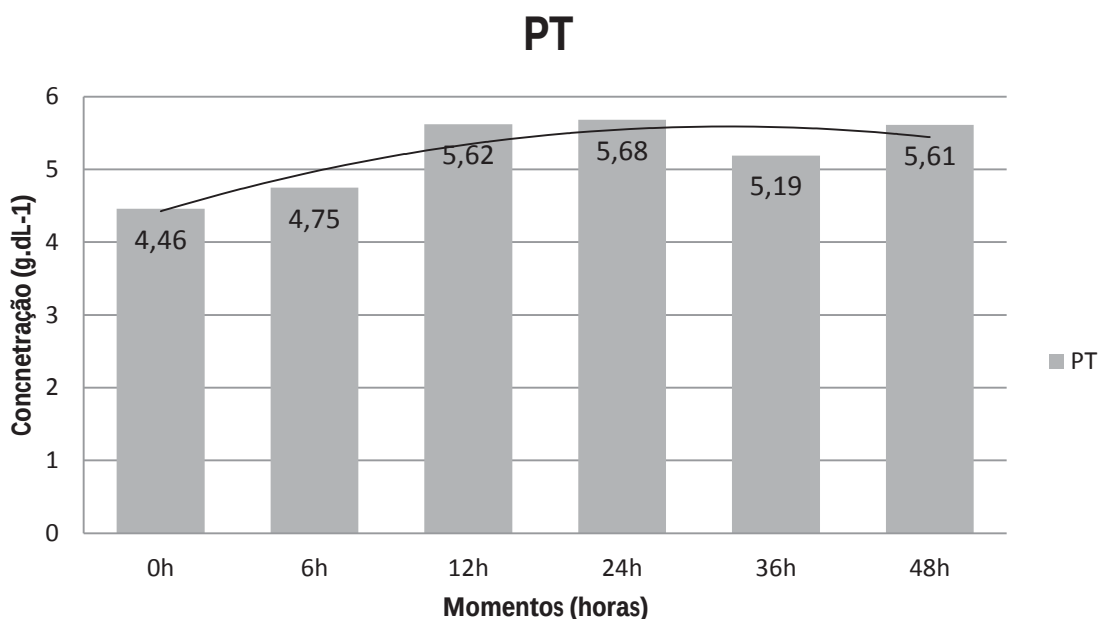


Gráfico 6 - Proteína total sérica (g.dL^{-1}) nos momentos experimentais.

Ainda, Silva e colaboradores (2007) observaram aumento sérico de 6 a 10 vezes na concentração de gamaglobulina após 24 – 72 horas da primeira mamada dos cordeiros. O valor encontrado a zero hora (0h) foi de $0,32 \pm 0,12 \text{ g.dL}^{-1}$, elevando-se para $3,39 \pm 1,13 \text{ g.dL}^{-1}$. Estes dados condizem com os encontrados neste trabalho, mesmo tendo a concentração de gama do

momento zero (M0) um valor abaixo do relatado ($0,111 \pm 0,07 \text{g.dL}^{-1}$), mas com aumento sérico de 9 a 16 vezes no momento 24 horas ($1,801 \pm 0,86 \text{g.dL}^{-1}$). Esta diferença pode ser explicada pelas diferentes metodologias aplicadas, pois a eletroforese Nativa deste experimento é mais sensível e específico do que a eletroforese em gel de agarose utilizada pelo outro autor.

O colostro de boa qualidade é aquele que fornece ao recém-nascido quantidades adequadas de substâncias protetoras (Ig), nutrientes e energia. Estes componentes tornam o colostro mais denso, ou seja, quanto maior a densidade colostrar maior é quantidade de componentes benéficos em sua constituição, para o cordeiro. A relação qualidade do colostro com densidade, foi estudada por Fleenor e Stott (1980) quando, tentando achar um método que fornecesse informações rápidas e precisas para ser usado a campo com o rebanho bovino, adaptou um hidrômetro calibrado para ser usado com colostro, o colostrômetro. Por este é possível qualificar o colostro bovino em bom, regular e ruim. Além disso, essa qualificação estabelece parâmetros de concentração de Ig para cada valor obtido na densidade. Vaz e colaboradores (2004), também trabalharam com a relação densidade x qualidade colostrar em bovinos e relataram que para se ter concentrações imunoglobulínicas ao redor de $5,84 \text{g.dL}^{-1}$ no colostro, é necessário que sua densidade esteja entre 1,090 e $1,046 \text{g.mL}^{-1}$. Quando menor que $1,035 \text{g.mL}^{-1}$ com concentração de $3,59 \text{g.dL}^{-1}$ de imunoglobulinas, é considerado colostro de baixa qualidade e não há transferência adequada de imunidade, estando o recém-nascido desprovido de defesa.

Nunes (2006) utilizou o método de refratometria e encontrou valores para a densidade colostrar de ovelhas entre 1,064 e $1,220 \text{g.mL}^{-1}$, mas não há garantias de que o método utilizado trouxera resultados confiáveis, pois foram utilizadas diluições com água, o que pode mascarar os resultados encontrados.

Por não haver métodos descritos para análise da densidade colostrar em ovinos e não ser possível o uso do colostrômetro por quantidade insuficiente de material produzido, foi utilizada a fórmula original da densidade ($d=m/v$); o intervalo variou de $1,056 - 1,086 \text{g.mL}^{-1}$ no momento zero (M0) e $1,050 - 1,078$ às 12 horas pós-parto (M12), como demonstrado na tabela 19. Para o primeiro intervalo a concentração de gamaglobulina foi de $3,125 \pm 1,27 \text{g.dL}^{-1}$ e $1,378 \pm 0,82 \text{g.dL}^{-1}$ para o segundo. Os valores de densidade estão de acordo

com os encontrados na literatura para bovinos, e conferiram boa imunidade para os cordeiros, mesmo com concentração de globulinas estando abaixo dos relatados. Para caprinos a falha de transferência ocorre quando a concentração está abaixo de $1,21\text{g.dL}^{-1}$ de Ig (SIMÕES et al., 2005).

Com relação à densidade e os níveis de gamaglobulina do colostro ocorreu uma correlação baixa, mas positiva entre as variáveis nos períodos zero e 12 horas após o parto, ou seja, com o aumento da fração gama também eleva-se a densidade. Nunes (2006) também observou correlação positiva ($r = 0,35$) em ovinos de corte.

No gráfico 7, observa-se o declínio na concentração de gama entre zero e 12 horas pós-parto ($3,125 \pm 1,27$ para $1,378 \pm 0,82\text{g.dL}^{-1}$) demonstrando a importância na ingestão de colostro neste período devido grande disponibilização de anticorpos. Como não foram colhidos e analisados colostro após 12 horas, não se verificou o grau de diminuição na quantidade de gama após esse período, ficando assim, para posterior pesquisa. Esses dados corroboram com os encontrados por Fernandes (2005), sendo a maior concentração de gama encontrada logo após o parto ($8,48 \pm 1,03\text{g.dL}^{-1}$), decaindo até a quinta parte após 24 horas ($0,88 \pm 0,33\text{g.dL}^{-1}$).

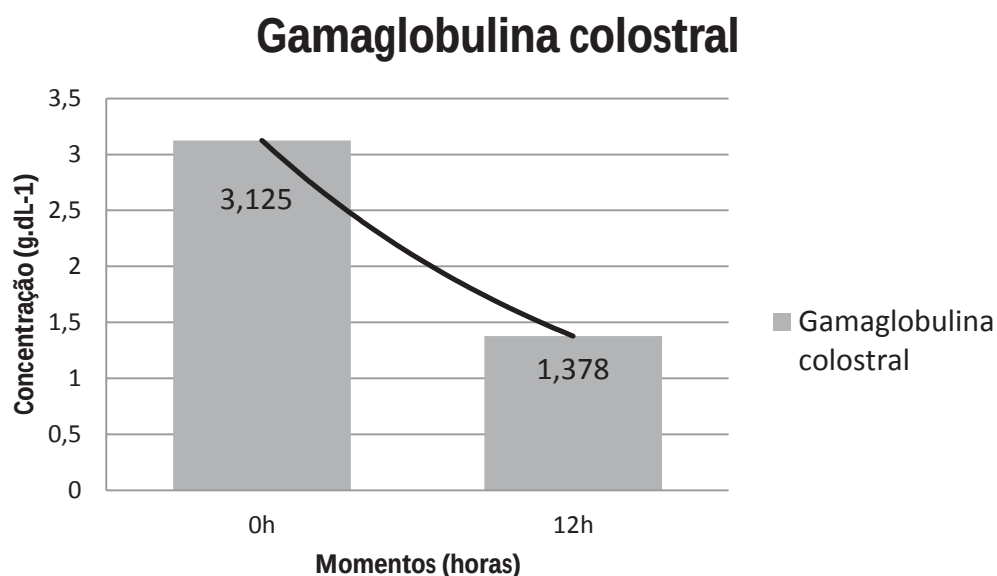


Gráfico 7 – Concentração de gamaglobulina colostrar (g.dL^{-1}) em relação ao período de colheita. Teste Inteiramente Casualizado.

Para a concentração de globulinas no momento 24 horas (M24) no soro dos cordeiros, encontrou-se $1,801 \pm 0,86 \text{ g.dL}^{-1}$ corroborando com os dados de Hunter e colaboradores (1977), com cordeiros com concentração imunoglobulínica menor que $1,5 \text{ g.dL}^{-1}$ no primeiro dia de vida, que foram considerados hipogamaglobulinêmicos. Também concordam com os valores estipulados por Nunes (2006) para considerar um animal com falha de transferência passiva ($< 0,5 \text{ g.dL}^{-1}$).

8. CONCLUSÃO

As conclusões obtidas por este trabalho foram:

- ocorreu aumento progressivo na concentração de PT e gamaglobulina sérica entre os momentos estudados com estabilização após 24 horas;
- o declínio na quantidade de PT e densidade colostrar está relacionado com a diminuição na concentração de gamaglobulinas;
- o uso de refratometria a campo para avaliar a transferência de imunidade passiva é um adequado método, pois foi demonstrada correlação positiva entre PT e gamaglobulina sérica;
- a eletroforese em gel de poliacrilamida fornece dados mais precisos das frações proteicas presentes no soro sanguíneo e colostrar;
- a absorção colostrar pelo cordeiro ocorre até às 24 horas de vida, não necessitando que se force a amamentação caso não ocorra nas primeiras horas de vida;
- concentrações acima de $1,5\text{g.dL}^{-1}$ de gamaglobulina sérica indicam boa transferência de imunidade passiva;
- estabeleceu-se uma equação preditória para a absorção colostrar em neonatos ovinos da raça Bergamácia: $y = 0,0171x^3 - 0,3138x^2 + 1,7598x - 1,3697$, $R^2 = 0,9945$, sendo “x” o tempo decorrido em horas, “y” a quantidade absorvida e “R” o coeficiente de correlação de variabilidade.

9. REFERÊNCIAS

BAROZA, P. F. J. *Proteínas, enzimas e minerais na secreção láctea de cabras e vacas, nos primeiros 30 dias pós-parto, congelada ou não*. 2007. 113 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

BARREIROS, T.R.R.; BLASCHI, W.; SAUT, J.P.E. Levantamento das condições de manejo reprodutivo em ovinos criados na região de Londrina. *Archives of Veterinary Science*. Curitiba, v12 (supl.). Resumo 042, p. 59-60. 2007.

BARRINGTON, G.M.; PARISH, S.M. Doenças de Imunodeficiência dos Ruminantes. In: SMITH, B.P. *Medicina Interna de Grandes Animais*. 3ed. São Paulo: Manole, 2006, p.1600-1602.

BASCH, J. J.; DOUGLAS JR., F. W.; PROCINO, L. G.; HOLSINGER, V. H.; FARRELL JR, H. M. Quantitation of Caseins and Whey Proteins of Processed Milks and Whey Protein Concentrates, Application of Gel Electrophoresis, and Comparison with Harland-Ashworth Procedure. *Journal Dairy Science*, Champaign, v. 68, n. 1, p. 23-31, 1985.

BESSI, R.; PAULETTI, P.; D'ARCE, R.D.; MACHADO NETO, R. Absorção de anticorpos do colostro em bezerros. I. Estudo no intestino delgado proximal. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v31, n6, p.2314 – 2324, 2002a.

BESSI, R.; PAULETTI, P.; D'ARCE, R.D.; MACHADO NETO, R. Absorção de anticorpos do colostro em bezerros. II. Estudo no intestino delgado distal. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v31, n6, p.2325 – 2331, 2002b.

BLUM, J. W.; HAMMON, H. Colostrum effects on gastrointestinal tract, and on nutritional, endocrine and metabolic parameters in neonatal calves. *Livestock Production Science*, v66, p.1151–1159, 2000.

BLUM, J. Nutritional physiology of neonatal calves. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. Germany, v90, p.1–11. 2006.

BRAMMER, S. P. A técnica de eletroforese: importância e aplicações em análises genéticas. Passo Fundo: *Embrapa Trigo*, 2001. 13p. (Embrapa Trigo. Documentos Online; 6). Disponível: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do06.htm>. Acesso em: 10 de maio de 2011.

CHRISTLEY, R. M.; MORGAN, K.L.; PARKIN, T.D.H.; FRENCH, N.P. Factors related to the risk of neonatal mortality, birth-weight and serum immunoglobulin concentration in lambs in the UK. *Preventive Veterinary Medicine*, USA, v.57, n.4, p. 209-226, 2003.

CORTESE, V.S. Neonatal Immunology. In: SMITH, R.A. *Bovine Neonatology. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. USA: Saunders Elsevier, Inc. v25. n1. p.221 – 228. 2009.

DWYER, C.M.; MORGAN, C.A. Maintenance of body temperature in the neonatal lamb: Effects of breed, birth weight, and litter size. *Journal of Animal Science*. Minnesota, v84, p.1093¹101. 2006.

DWYER, C.M. The welfare of the neonatal lamb. *Small Ruminant Research*. Maryland, v76. p.31–41. 2008.

FEITOSA, F.L.F.; BIRGEL, E.H.; MIRANDOLA, R.M.S.; PERRI, S.H.V. Diagnóstico de falha de transferência de imunidade passiva em bezerros através da determinação de proteína total e frações eletroforéticas, imunoglobulinas G e M e da atividade da gama glutamil transferase no soro sanguíneo. *Ciência Rural*. Santa Maria, v31, n2, p. 251-55. 2001.

FEITOSA, F.L.F.; BORGES, A.S.; BENESI, F.J.; BIRGEL, E.H.; MENDES, L.C.N.; PEIRO, J.R. Concentração de imunoglobulinas G e M no soro sanguíneo de bezerros da raça holandesa até os 90 dias de idade. *Brazilian*

Journal Veterinary Research Animal Science. São Paulo, v40 (suplemento 1), p. 26-31. 2003.

FERNANDES, S. *Efeitos da nutrição e da idade à desmama sobre o desempenho, qualidade do colostro e do leite e incidência de mastite subclínica em ovelhas da raça Santa Inês*. Botucatu, SP. 2005. 72p. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. Botucatu. 2005.

FIGUEIREDO, L.J.C. *Onfalopatias de bezerros*. Bahia: EDUFBA, 1999, 94p.

FLEENOR, W.A.; STOTT, G.H.. Hydrometer Test for Estimation of Immunoglobulin Concentration in Bovine Colostrum. *Journal of Dairy Science*. Champaign, v63, p.973-977. 1980.

FRAGA, R.; RAIMONDO, S.; MIYASHIRO, S.I.; BIRGEL JUNIOR, E.H. Influência da fase de lactação nas proteínas do soro lácteo de vacas Jersey. *Ciência Animal Brasileira*, Goiás, Supl. 1, p.732 – 738. 2009.

GEROV, K.; CHUSHKOV, P.; VENKOV, T. Non-infectious Diseases in Neonatal and Growing Animals. *Zemizdat*, Sofia. 1987.

GOKCE, H.; ERDOGAN, M. An Epidemiological Study on Neonatal Lamb Health. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. Turquia, v15, n2, p.225-236, 2009.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. *Reprodução Animal*. São Paulo, Brasil: Manole, 7ed, 513p. 2004.

HALLIDAY, R. Variation in immunoglobulin transfer from ewes to lambs. *Annales de Recherches Veterinaires*, França, v. 9, n. 2, p. 367-374, 1978.

HUNTER, A.G.; RENEAU, J.K.; WILLIAMS, J.B. Factors affecting IgG concentration in day-old lambs. *Journal of Animal Science*. Minnesota. v45, n5, p. 1146 - 1151. 1977.

IBGE - Efetivo dos rebanhos em 31.12 e variação anual, segundo as categorias - Brasil - 2008-2009. *Produção da Pecuária Municipal*. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal 2008-2009. v.37, 2009.

IBGE. Produção da Pecuária Municipal – 2001. Tabela 1 - Efetivo dos rebanhos - Brasil – 2001. *Diretoria de Pesquisas, Departamento de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal*, 2001. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/tabela1ppm_2001.shtm>. Acesso em: 02 de maio de 2011.

JAINUDEEN, M.R.; WAHID, H.; HAFEZ, E.S.E. Ovinos e Caprinos. In: HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. *Reprodução Animal*. 7ed. São Paulo: Manole, cap. 12, p.173 – 182. 2004.

KINDLEIN, L.; PAULETTI, P.; BAGALDO, A.R.; RODRIGUES, A.P.O.; MACHADO-NETO, R. Efeito da suplementação de colostro enriquecido sobre as características morfológicas da mucosa intestinal de bezerros neonatos. *Acta Scientiae Veterinarie*, Porto Alegre, v36, p.31 – 34, 2008.

KRUSE, P.E. The importance of colostral immunoglobulin and their absorption from the intestine of the newborn animals. *Annales de Recherches Veterinaries*, Bletchley, v14, n4, p.349 – 353, 1983.

LARSON, B. L.; HEARY JR., H. L.; DEVERY, J. E. Immunoglobulin production and transport by the mammary gland. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 63, n. 4, p. 665-671, 1980.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. v227, n15, p.680 – 685. 1970.

LEVIEUX, D. Le colostrum, un lait particulièrement riche en de nombreux composants: peut-on en déceler la présence dans les livraisons de lait de vache? *Le Lait*. França, v79, n5, p.465–488. 1999.

MAESTÁ, S.A. *Desempenho produtivo, composição química e concentração de IgG do colostro e do leite de ovelhas e cordeiros de corte sob distintos níveis de proteína e energia*. 2003. 62f. Tese (Doutorado em Zootecnia). Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu. Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 2003.

MCCARTHY, E.F.; MCDUGALL, E.I. Absorption of immune globulin by the young lamb after ingestion of colostrum. *Biochemical Journal*. London. v55, p.177⁻182. 1953.

MEDVEZKI, D. The Rearing of Calves. *Zemizdat*, Sofia. 1989.

MELLOR, D.J.; MURRAY, L. Making the most of colostrum at lambing. *The Veterinary Record*. London, v118, n13, p.351-353. 1986.

MICUSAN, V.V.; BORDUAS, A.G. Preferential transport into colostrum of Fc fragment derived from serum IgG1 immunoglobulin in the goat. *Research in Veterinary Science*, Amsterdam, v.21, n.2, p.150⁻154, 1976.

NÓBREGA JR, J.E.; RIET-CORREA, F.; NÓBREGA, R.S.; MEDEIROS, J.M.; VASCONCELOS, J.S.; SIMÕES, S.V.D.; TABOSA, I.M. Mortalidade perinatal de cordeiros no semiárido da Paraíba. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. Rio de Janeiro, RJ, v25, n3, p.171⁻178. 2005.

NORDI, W.M. *Efeito do fornecimento de colostro bovino liofilizado e caprino sobre o epitélio intestinal de caprinos recém-nascidos*. 2010. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

NUNES, A.B.V. *Estudo da transmissão da imunidade passiva e da mortalidade em cordeiros mestiços de Santa Inês, na região norte de Minas Gerais*. Dissertação (Mestre em Medicina Veterinária), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

ODLE, J.; ZIJLSTRA, R.T.; DONOVAN, S.M. Intestinal effects of milkborne growth factors in neonates of agricultural importance. *Journal of Animal Science*. Amsterdam, v74, p.2509-2522. 1996.

ONTSOUKA, C.E.; BRUCKMAIER, R.M.; BLUM, J.W. Fractionized milk composition during removal of colostrum and mature milk. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v86, p.2005–2011. 2003.

PAHUD, J.J.; MACH, J.P. Identification of secretory IgA, free secretory piece and serum IgA in the ovine and caprine species. *Immunochemistry*. Amsterdam, v.7, n.8, p.679-682, 1970.

PARK, C.S.; LINDBERG, G.L. Glândula Mamária e Lactação. In: REECE, W.O. *Dukes, Fisiologia dos Animais Domésticos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 12ed, p.670-690. 2006.

PRESTES, N.C.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. *Obstetrícia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., p.28-34; 158¹77. 2006.

PUGH, D.G. *Clínica de Ovinos e Caprinos*. São Paulo: Roca LTDA, 513p. 2004.

RADOSTITS, OM; GAY, CC; BLOOD, DC; HINCHCLIFF, KW. Estados sistêmicos gerais. *Clínica Veterinária: Um tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos*. 9ed. RJ: Guanabara Koogan.1770p. 2002.

RAIMONDO, R.F.S. *Proteinograma da secreção láctea de cabras*. 2011. 148f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

ROOK, J. S.; SCHOLMAN, G.; WING-PROCTOR, S.; SHEA, M.E. Diagnosis and control of neonatal losses in sheep. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. USA, v6, n3, p.531-562, 1990.

SANT'ANA, V.A.C.; BIRGEL, E.H. Obtenção do soro lácteo para o fracionamento das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida. In: XI CONGRESSO LATINOAMERICANO DE BUIATRIA, V CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA E II CONGRESSO NORDESTINO DE BUIATRIA. *Anais...* Salvador: Associação Brasileira de Buiatria, p.31. 2003.

SASAKI, M.; DAVIS, C.L.; LARSON, B.L. Production and turnover of IgG1 and IgG2 immunoglobulins in bovine around parturition. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v59, n12, p.2046-2055, 1976.

SILVA, F.A.S.E.; AZEVEDO, C.A.V. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, *Anais....* USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SILVA, D.F.M.; COSTA, J.N.; ARAUJO, A.L.; COSTA NETO, A.O.; ALMEIDA, M.A.O. Serum proteinogram concentration in crossbred lambs (Santa Inês x Dorper) from birth until 90 days old: effect of the age and ingestion of colostrums monitoring. *Archives of Veterinary Science*. Curitiba, v12, p.86-87, 2007.

SILVA, R.O.P.; LOPES, A.F.; FARIA, R.M.D. Eletroforese de proteínas séricas: interpretação e correlação clínica. *Revista Médica de Minas Gerais*. Minas Gerais, v18, n2, p.116-122. 2008.

SIMOES, S.V.D.; COSTA, R.G.; SOUZA, P.M.; MEDEIROS, A.N.; VILAR, A.L.T. Imunidade passiva, morbidade neonatal e desempenho de cabritos em diferentes manejos de colostro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. Rio de Janeiro, v25, n4, p.219-224. 2005.

SHUBBER, A.H.; DOXEY, D.L. Immunoglobulin levels in ewe colostrum and in lamb serum. *Research in Veterinary Science*. St. Louis, v27, p.283-5. 1979.

SMEATON, T.C.; SIMPSON-MORGAN, M.W. Epithelial cell renewal and antibody transfer in the intestine of the foetal and neonatal lamb. *Australian Journal Experimental Biology Medical Science*, Adelaide, v63, p.41 – 51, 1985.

SMITH, B.J. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. In: _____. *Methods in Molecular Biology. Volume I – Proteins*. New Jersey: The Humana Press Inc. Chapter 6, p. 41 – 55. 1984.

SOUZA, A.A.U. *Aula prática: Separação de Proteínas por Eletroforese Desnaturante Descontínua na Presença de SDS (SDS-PSGE) oferecida na Disciplina EQA 5517 – Laboratório para Engenharia Química, Dep. Engenharia Química e Engenharia de Alimentos. Curso de Engenharia Química. Disponível em: <http://www.enq.ufsc.br/disci/eqa5517/pratica_eletroforese.doc>. Acesso em 11 de agosto de 2010.*

THOMPSON, F.N. Reprodução em mamíferos do sexo feminino. In: REECE, W.O. *Dukes, Fisiologia dos Animais Domésticos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 12ed, p. 644-669. 2006.

TIZARD, I.R. *Imunologia Veterinária: Uma Introdução*. São Paulo: Roca LTDA, 8ed, 608p. 2009.

TURQUINO, C.F.; FLAIBAN, K.K.M.C.; LISBÔA, J.A.N. Transferência de imunidade passiva em cordeiros de corte manejados extensivamente em clima tropical. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. Rio de Janeiro, v31, n3, p.199-205. 2011.

VAZ, A.K.; FURTADO, A.C.; MARCA, A.; PATERNO, M.R. Qualidade do colostro bovino e transferência de imunidade aos bezerros recém-nascidos na região de Lages, SC. *Revista de Ciências Agroveterinárias*. Lages, v3, n2, p. 116⁻¹20. 2004.

WAEELCHLI, R.O.; MULLER, C.; HASSIG, M.; RUSCH, P. Immunoglobulin concentration in colostrums and serum of lambs of dairy sheep breeds. *The Veterinary Record*. London, v135, p.16⁻¹7, 1994.

XU, R.J. Development of the newborn GI tract and its relation to colostrum/milk intake: A review. *Reproduction Fertility and Development*, Melbourne, v8, n1, p.35-48, 1996.

YANG, X. Y.; CHEN, J. P.; ZHANG, F. X. Research on the chemical composition of Saanen goat colostrum. *International Journal of Dairy Technology*, United Kingdom, v62, n4, p.500-504, 2009.

10. ANEXOS

Anexo 1 - Preparo das placas de vidro para recebimento do gel de eletroforese (Guia de Preparação das placas Bio-Rad®)¹⁰

- limpar as placas de vidro com álcool para retirar gorduras e sujidades;
- unir as placas de vidro;
 - dimensões: placa grossa – 10,1x8,2cm
 - placa fina – 10,1x7,3cm
- deslizar as placas dentro da moldura plástica, mantendo a placa fina para fora, travar a moldura;
- colocar a moldura com as placas de vidro no suporte e prender com presilha
- proceder com os géis de separação Nativa ou SDS, e gel de empilhamento
- após polimerização do gel de empilhamento, tirar a moldura do suporte e as placas da moldura
- lavar com água deionizada retirando os resíduos de gel
- retirar os espaçadores, completar os poços com água deionizada
- fixar as placas no suporte dos eletrodos e acomodar na cuba de corrida
- preencher com tampão da cuba (Nativa ou SDS)
- aplicar as amostras nos poços correspondentes
- acoplar a tampa na cuba de eletroforese
- iniciar a corrida

Preparação do Gel de Separação 7% Nativa

- 1,170mL Bis-acrilamida
- 0,5mL Tris-HCl pH 8,8
- 3,350mL Água deionizada
- 33,5µL Persulfato de amônio
- 4,5µL TEMED
- Álcool isopropílico

Em um béquer foram pipetados os volumes acima, exceto o álcool, e agitados levemente para que misturassem. A solução foi passada para as placas e

¹⁰ Gel Cassette Preparation, Mini-Protean®3 Cell assembly Guide, Bio-Rad Laboratories, Inc.

cobertas com álcool para diminuir contato com o ar e uniformizar o gel. Após polimerização, verter o álcool para que seja repassado o gel de empilhamento. Secar o resíduo com papel filtro, s/ tocar o gel.

Tampão da Amostra (Nativa)

- 12mL Tris-HCl pH 6,8
- 50mL Glicerol 100%
- 2g Azul de Bromofenol
- 138mL Água deionizada

Adicionar todos os componentes em um frasco identificado, agitar e conservar em geladeira.

Tampão da Cuba Nativa

- 100mL Tris-Glicina pH 8,6
- 900mL Água deionizada

Colocar em frasco e manter na geladeira até o momento do uso.

O tampão gelado evita o efeito Joule, que consiste no aquecimento da resistência da eletroforese.

Preparo do gel SDS-PAGE 10%

- 3,33mL Bis-acrilamida 30%
- 1mL Tris-HCl pH 8,8
- 10 μ L SDS 10%
- 5,6mL Água deionizada
- 67 μ L Persulfato de amônio
- 9 μ L TEMED
- 0,5mL Álcool isopropílico

Em um béquer foram pipetados os volumes acima, exceto o álcool, e agitados levemente para que se misturassem. A solução foi passada para as placas e cobertas com álcool para diminuir contato com o ar e uniformizar o gel. Após polimerização, verter o álcool para que seja repassado o gel de empilhamento.

Tampão da Amostra com SDS

- 35,5mL Água deionizada
- 12,5mL Tris-HCl pH 6,8
- 25mL Glicerol
- 20mL SDS 10%
- 2g Azul de Bromofenol

Adicionar todos os componentes em um frasco identificado, agitar, esperar que as bolhas se desfaçam e conservar em geladeira.

Este tampão só deve ser usado em eletroforeses que tenham SDS como parte do gel.

Tampão da Cuba SDS

- 10mL SDS 10%
- 100mL Tris-Glicina pH 8,6
- 890mL Água deionizada

Colocar em frasco e evitar agitação brusca. Manter em geladeira até uso.

O tampão gelado evita o efeito Joule que consiste no aquecimento da resistência da eletroforese.

Preparação do Gel de Empilhamento 4% (Nativa e SDS)

- 665µL Bis-acrilamida 30%
- 500µL Tris-HCl pH 6,8
- 50µL SDS 10%
- 3,8mL Água deionizada
- 34µL Persulfato de amônio
- 5µL TEMED

Pipetar os componentes em béquer, agitar levemente e repassar para a placa já com o gel de separação. Um molde de plástico em forma de pente foi posicionado entre as placas sobre o gel de empilhamento para formar, assim que ocorrer a polimerização, os poços de aplicação das amostras.

Condições da corrida eletroforética Nativa 7%

- ligar a fonte elétrica (Power Pac™ Basic)¹¹
- fixar voltagem em 100V (amperagem varia para manter a voltagem constante)
- tempo de corrida: 90 minutos

Condições da corrida eletroforética SDS 10%

- ligar a fonte elétrica (Power Pac™ Basic)¹²
- fixar voltagem em 100V (amperagem varia para manter a voltagem constante)
- tempo de corrida: 240 minutos

Preparo da Solução Corante Comassie R-250 0,1%

- 250mL solução estoque Comassie R-250 0,2%
- 250mL ácido acético 20%

Após a corrida, o gel foi retirado da placa de vidro e imerso em solução corante Comassie 0,1% durante 4 horas.

Preparo do Descorante

- 600mL água deionizada
- 300mL metanol
- 100mL ácido acético glacial

Retirar o corante e no mesmo recipiente, recobrir o gel com descorante.

Renovar a solução quantas vezes forem necessárias até que o gel fique transparente.

Conservação do gel para análise

Após descolorir o gel, retirar o descorante e adicionar 100mL de água deionizada. Ficar em água até que seja analisado através do Image Master VDS®¹³.

¹¹ Power Pac™ Basic Power Supply, Bio-Rad Laboratories, Inc.

¹² Power Pac™ Basic Power Supply, Bio-Rad Laboratories, Inc.

¹³ Image Master® VDS Software, Pharmacia Biotech Inc.

Análise dos géis

Os géis foram salvos e suas imagens digitalizadas através do Image Master® VDS ¹⁴ e um software analisador de imagens (Image Master® VDS software ¹⁵) do Departamento de Física e Biofísica do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu/SP.

O programa foi utilizado para determinar a mobilidade eletroforética relativa (RF) e a IOD (intensidade de densidade ótica) de cada banda proteica.

Secagem e Armazenamento

Após escaneamento e análise, os géis foram colocados entre duas folhas de papel celofane molhadas e, após uma semana de secagem, foram guardados em pasta com as respectivas identificações.

Caso fosse necessária uma nova colheita de imagem, os géis secos seriam escaneados em scanner comum e analisados pelo programa VDS.

¹⁴ Image Capture Board, Image Master® VDS System, Pharmacia Biotech Inc.

¹⁵ Image Master® VDS Software, Pharmacia Biotech Inc.

Anexo 2 - Densidade Colostral

Realizou – se o procedimento a partir da fórmula original da densidade:

$$\text{densidade (g.mL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{massa}}{\text{volume}}$$

- Em balança analítica digital com precisão de quatro casas após a vírgula, foi pesado um béquer com uma ponteira de 1mL, ambos vazios;
- A balança foi zerada para descontar este peso da massa que se queria obter;
- Após passagem por banho–maria à 37°C e descanso em temperatura ambiente até atingir 20°C para que todos as amostras estivessem nos mesmos parâmetros (a temperatura influencia no valor da densidade), 1mL colostro foi pipetado com a mesma ponteira que foi pesada;
- Na balança zerada, foi descartada a ponteira dentro do béquer;
- Após estabilização do peso, este foi anotado e colocado na fórmula da densidade.

Para cada amostra foi utilizado um novo béquer e uma nova ponteira, seguindo todos os passos citados.

Resultados das densidades colostrais, nos períodos zero e 12 horas pós-parto.

Nº ovelha	Densidade (g.mL ⁻¹)	
	0h	12h
495	1,094	1,077
493	1,078	1,066
561	1,071	1,098
404	1,078	1,059
513	1,063	1,056
401	1,082	1,066
509	1,071	1,056
310	1,067	1,058
524	1,064	1,076
349	1,041	1,078
350	1,097	1,087
361	1,086	1,052
411	1,074	1,074
503	1,072	1,079
438	1,087	1,070
393	1,045	1,054
Nina	1,076	1,043
456	1,070	1,055
511	1,055	1,068
556	1,069	1,058
492	1,077	1,066

Continuação - Resultados das densidades colostrais, nos períodos zero e 12 horas pós-parto.

Nº ovelha	Densidade (g.mL ⁻¹)	
	0h	12h
353	1,094	1,060
402	1,044	1,037
528	1,077	1,060
372	1,072	1,056

Anexo 3 - Resultado das concentrações de PT (g.dL^{-1}) do soro do colostro, de acordo com as leituras espectrofotométricas pelo método de Biureto, nos momentos zero à 48 horas de vida.

Nº ovelha	PT (g.dL^{-1})	
	0h	12h
495	6,2	3,4
493	5,6	3,2
561	9,2	4,8
404	7,8	3,4
513	7,8	2,6
401	6	3,8
509	5,6	2,6
310	4	2,6
524	5,2	5,8
349	7,4	5,6
350	7,6	4,6
361	6,8	2,2
411	6,8	3,6
503	7	5,2
438	8	6,2
393	2	3,4
Nina	5	1,6
456	6,4	5,4
511	5,6	2,4
556	6,2	4,6
492	4,2	3

Continuação - Resultado das concentrações de PT (g.dL^{-1}) do soro do colostro, de acordo com as leituras espectrofotométricas pelo método de Biureto, nos momentos zero à 48 horas de vida.

Nº ovelha	PT (g.dL^{-1})	
	0h	12h
353	6,6	4,2
402	8,6	3,4
528	7,4	4
372	7	4

Anexo 4 - Resultado das concentrações de PT sérica dos cordeiros, de acordo com as leituras refratométricas, nos momentos zero à 48 horas de vida.

Nº cordeiro	PT (g.dL ⁻¹)					
	0h	6h	12h	24h	36h	48h
1	3,8	6,2	8,2	8	8	7,4
2	4,2	4,6	5	6	6,1	6,8
3	4,4	4,4	5	5,2	5	5
4	4	4,8	6	7	6	5,8
5	4	4,4	6,2	6	6,2	5,6
6	4	5	6,2	6,6	6,2	6,2
7	6,2	5,6	6,4	6,6	6,2	6,4
8	4	4	5	5,2	5	5
9	5	5,2	5	5,4	5	5
10	4	5	5,4	5,4	5,6	6
11	5	5,2	5,8	6	6	6,4
12	4,2	5	5,2	5,6	5	5,8
13	4,2	4,6	5	5,8	4,8	5,2
14	4	5	6	5,2	5,8	5,8
15	4,4	5,2	5,8	6,4	6,4	6,2
16	4,6	4,6	5,2	6	5,4	6,4
17	4	4	4,6	4,2	5	4,4
18	4	4,8	4,6	5,4	5,2	5,2
19	4,6	4,8	4,6	4,2	4,4	4,4
20	5	4,6	5,2	4,4	4,6	4,2
21	4	4,8	5	5	4,8	5,6

Continuação - Resultado das concentrações de PT sérica dos cordeiros, de acordo com as leituras refratométricas, nos momentos zero à 48 horas de vida.

Nº cordeiro	PT (g.dL ⁻¹)					
	0h	6h	12h	24h	36h	48h
22	5	6	6,4	6	6,2	6,2
23	4,4	5,4	6	5,8	5,6	5,8
24	6	6	7	7	6,8	6
25	4,8	4,6	5,8	6,2	5,8	6
26	4,2	5	7,4	6	6	5,4
27	4,2	4,8	5,4	4,8	5	4,6
28	4,6	4,8	5	4,6	4,6	5
29	4,6	4,2	4,6	4,8	4,4	5

Anexo 5 - Resultados da concentração e porcentagem de gamaglobulina no soro do colostro, de acordo com o obtido no gel de eletroforese nos períodos zero e 12h pós-parto.

Nº ovelhas	Gamaglobulina			
	0h		12h	
	%	g.dL ⁻¹	%	g.dL ⁻¹
138	65,43	4,23	29,31	0,97
170	61,56	4,70	47,90	2,94
310	33,92	1,39	29,50	0,76
349	42,76	3,19	48,68	2,71
350	47,92	3,63	36,54	1,69
353	46,01	3,05	36,40	1,55
361	37,29	2,55	16,81	0,37
372	48,72	3,39	38,26	1,51
393	14,75	0,30	22,29	0,76
401	51,41	3,12	44,13	1,68
402	52,27	4,51	24,20	0,81
404	49,92	3,89	35,64	1,24
411	39,23	2,64	16,28	0,59
438	68,60	5,60	55,48	3,43
456	67,76	4,39	45,60	2,50
492	23,03	0,97	24,42	0,74
493	44,10	2,77	41,64	1,41
495	45,84	3,25	36,75	1,92
503	53,39	2,96	36,18	0,96

Continuação - Resultados da concentração e porcentagem de gamaglobulina no soro do colostro, de acordo com o obtido no gel de eletroforese nos períodos zero e 12h pós-parto.

Nº ovelhas	Gamaglobulina			
	0h		12h	
	%	g.dL ⁻¹	%	g.dL ⁻¹
509	41,80	2,33	20,34	0,48
511	54,20	4,26	23,12	0,59
513	32,18	1,67	24,68	1,43
524	52,71	3,87	36,58	1,47
528	35,84	2,22	25,01	1,16
556	50,95	4,70	41,35	1,99
561	32,62	1,67	11,35	0,19

Resultados da concentração de gamaglobulina no soro dos cordeiros de acordo com a porcentagem encontrada nos gel de eletroforese nos momentos experimentais.

Nº cordeiro	Gamaglobulina					
	0h		6h		12h	
	%	g.dL ⁻¹	%	g.dL ⁻¹	%	g.dL ⁻¹
1	3,42	0,137	12,75	0,510	27,40	1,370
2	2,03	0,081	17,00	0,850	23,90	1,291
3	2,17	0,109	17,10	0,889	28,00	1,624
4	1,63	0,078	14,50	0,667	22,20	1,288
5	3,00	0,120	17,30	0,830	25,50	1,173
6	1,56	0,062	28,00	1,400	39,90	2,474
7	1,36	0,057	18,10	0,905	33,10	2,449
8	1,52	0,061	29,10	1,397	38,50	2,310
9	2,00	0,080	22,40	1,120	29,70	1,782
10	2,82	0,113	18,80	0,902	31,40	1,570
11	2,21	0,133	31,90	1,914	39,20	2,744
12	1,72	0,072	42,90	2,660	35,40	1,770
13	3,52	0,134	18,60	0,967	55,80	4,576
14	1,46	0,064	34,40	1,926	27,30	1,583
15	1,90	0,118	25,40	1,524	38,80	2,483
16	2,02	0,101	23,40	1,030	30,20	1,933
17	1,59	0,064	16,70	0,868	33,60	2,083
18	1,53	0,077	13,30	0,638	22,80	1,140
19	2,99	0,126	18,60	1,004	21,10	1,139

Continuação - Resultados da concentração de gamaglobulina no soro dos cordeiros de acordo com a porcentagem encontrada nos gel de eletroforese nos momentos experimentais.

Nº cordeiro	Gamaglobulina					
	0h		6h		12h	
	%	g.dL ⁻¹	%	g.dL ⁻¹	%	g.dL ⁻¹
20	1,75	0,077	10,76	0,473	30,10	1,806
21	10,62	0,467	46,71	2,336	19,60	0,980
22	2,34	0,098	31,30	1,440	25,80	1,342
23	2,07	0,087	16,30	0,782	26,50	1,325
24	3,54	0,163	16,64	0,699	11,36	0,568
25	3,44	0,158	7,43	0,342	15,14	0,696
26	0,82	0,038	9,53	0,381	10,10	0,525
27	2,44	0,098	4,99	0,240	15,67	0,721
28	2,26	0,104	7,89	0,363	9,86	0,454
29	2,91	0,146	8,49	0,418	5,63	0,293

Continuação - Resultados da concentração de gamaglobulina no soro dos cordeiros de acordo com a porcentagem encontrada nos gel de eletroforese nos momentos experimentais.

Nº cordeiro	Gamaglobulina					
	24h		36h		48h	
	%	g.dL ⁻¹	%	g.dL ⁻¹	%	g.dL ⁻¹
1	31,80	1,654	29,26	1,463	30,98	1,549
2	28,32	1,529	27,80	1,557	26,30	1,578
3	32,20	1,932	31,85	1,911	31,68	2,028
4	25,80	1,600	27,74	1,609	26,27	1,576
5	35,40	1,912	32,70	1,700	10,70	0,556
6	41,00	2,706	40,33	2,500	37,73	2,339
7	34,10	2,046	33,10	1,986	32,76	1,769
8	44,90	3,143	41,97	2,518	39,64	2,299
9	33,00	1,716	31,41	1,822	32,26	1,871
10	34,39	1,720	32,53	1,561	30,62	1,715
11	36,30	2,541	36,80	2,502	33,90	2,034
12	40,36	2,422	36,90	2,251	38,81	2,639
13	53,90	4,312	52,20	4,176	49,50	3,663
14	32,00	2,048	26,80	1,715	27,10	1,680
15	37,60	2,482	38,82	2,407	29,00	1,798
16	31,08	1,865	28,66	1,777	33,49	1,875
17	33,60	2,016	35,00	2,170	22,67	1,134
18	20,90	1,003	22,22	1,111	19,00	0,874
19	32,10	1,862	20,90	1,045	27,90	1,618

Continuação - Resultados da concentração de gamaglobulina no soro dos cordeiros de acordo com a porcentagem encontrada nos gel de eletroforese nos momentos experimentais.

Nº cordeiro	Gamaglobulina					
	24h		36h		48h	
	%	g.dL ⁻¹	%	g.dL ⁻¹	%	g.dL ⁻¹
20	20,93	1,088	26,50	1,484	19,99	1,000
21	26,40	1,478	19,67	0,984	25,13	1,458
22	27,50	1,595	24,22	1,211	25,00	1,300
23	12,31	0,566	24,40	1,171	22,20	1,110
24	22,82	1,095	13,50	0,621	19,00	0,950
25	8,93	0,375	19,86	0,874	36,68	2,348
26	2,85	0,125	10,14	0,446	9,40	0,414
27	-	-	3,33	0,153	6,41	0,269
28	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-

“-“ : valores não calculados por perda de amostra.

11. ARTIGO CIENTÍFICO

A ser encaminhado para o periódico *Pesquisa Veterinária Brasileira*

Normas para publicação disponível em:

<http://www.pvb.com.br/br/instructions.pdf>

Artigo: **Avaliação da transferência de imunidade passiva em cordeiros a partir da determinação de proteína total sérica e fração gama no soro sanguíneo pela eletroforese**

Carla M.V. Ulian^{16*}, Simone B. Chiacchio¹⁴, Simone Fernandes¹⁷, Paulo R.R. Ramos¹⁸ e Adriano Dias¹⁹.

ABSTRACT.- Ulian C.M.V., Chiacchio S.B., Fernandes S., Ramos P.R.R., Dias A. & Toma H.S. 2011. [Evaluation of passive transfer of immunity in lambs by total protein determination and electrophoresis gamma fraction in serum.] Avaliação da absorção colostrar em cordeiros a partir da determinação de proteína total sérica e fração gama no soro sanguíneo pela eletroforese. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Distrito de Rubião Junior s/n, Botucatu, SP 18618-970, Brazil. E-mail: dcvet@fmvz.unesp.br

The aim of this paper was determine the passive immune transfer by the colostrar absorption in 29 Bergamasca lambs kept on semi extensive management. Blood samples was collected immediately after birth until 48 hours of life. Total serum proteins in serum were determinate by refractometry and the gammaglobulins fractions by electrophoresis Native 7%. Were established positive correlations between variables, showing adequate concentrations of antibodies in lambs to initiated the extra uterine life.

INDEX TERMS: Blood proteins, gammaglobulin, immunology, neonates.

RESUMO.- Objetivou-se determinar a transferência de imunidade passiva (TIP) pela absorção colostrar em 29 cordeiros da raça Bergamácia mantidos em regime intensivo. Amostras de sangue foram colhidas imediatamente após o nascimento até 48 horas de vida. Por refratometria do soro sanguíneo foram obtidos os valores de PT e por eletroforese Nativa 7%, foram obtidas as frações gamaglobulina. Obteve-se correlação

¹⁶ Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Distrito de Rubião Junior s/n, Botucatu, SP 18618-970, Brasil. *Autor para correspondência: carla.ulian@yahoo.com.br, chiacchios@fmvz.unesp.br

¹⁷ Departamento de Produção Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Fazenda Experimental Lageado, Botucatu, SP 18618-000, Brasil. Email: simone.fernandes@fmvz.unesp.br

¹⁸ Departamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Distrito de Rubião Junior s/n, Botucatu, SP 18618-970, Brasil. Email: prrramos@r7.com.br

¹⁹ Grupo de Apoio à Pesquisa – GAP, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Distrito de Rubião Junior s/n, Botucatu, SP 18618-970, Brasil. Email: adias@fmb.unesp.br

positiva entre as variáveis, demonstrando que os animais estudados possuíam concentrações adequadas de anticorpos para iniciarem a vida extra-uterina.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Neonatos, gamaglobulina, imunologia, proteínas sanguíneas.

INTRODUÇÃO

Uma das grandes preocupações na ovinocultura brasileira, e no mundo, é a elevada taxa de mortalidade pós-natal em cordeiros, que inibem o desenvolvimento de uma adequada cadeia produtiva. O período neonatal, que abrange desde o nascimento até 30 dias de vida, exige cuidados a fim de minimizar as perdas tanto neste período quanto no futuro, pois os problemas que se instalarem trarão consequências negativas para a produção (Rook et al., 1990, Grundy, 2006).

Nos ruminantes, principalmente, o momento pós-parto é de extrema importância pela falta de imunidade apresentada pelo neonato ao nascer. Devido a forte barreira placentária que impede a passagem de anticorpos, esses animais nascem hipogamaglobulinêmicos, fazendo com que não consigam debelar infecções tidas como de baixa gravidade (Tizard, 2009). A ingestão de colostro o quanto antes deve ser efetiva para que os anticorpos sejam repassados caracterizando, assim, uma boa transferência de imunidade passiva (Pugh, 2004, Nordi, 2010).

Muitas metodologias são descritas para diagnosticar adequada transferência de imunidade passiva em bezerros, mas pouco se fala em cordeiros, dando a entender que por serem parte da família dos ruminantes, os resultados podem ser extrapolados para a espécie ovina (Nunes, 2006).

Visando avaliar a TIP em cordeiros de da raça Bergamácia do nascimento até 48 horas de vida, determinaram-se as concentrações séricas de proteína total (PT) por refratometria, e fração gama, representante das imunoglobulinas, por eletroforese Nativa em gel de poliacrilamida 7%. Também foram feitas correlações entre as variáveis para validar o uso da refratometria como instrumento de rápido diagnóstico de falha de transferência a campo.

MATERIAL E MÉTODOS

Após aprovação do Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP Botucatu (protocolo nº 28/2009 - CEEA), foram colhidas amostras de sangue de 29 cordeiros da raça Bergamácia entre o momento imediatamente após o parto até 48 horas de vida, através de punção da veia jugular em tubos à vácuo sem anticoagulante.

Parte do sangue colhido foi repassado para capilar não heparinizado e centrifugado por 10 minutos à 3500rpm para obtenção dos valores de proteína total pelo método de refratometria. A outra parte foi centrifugada por 15 minutos à 7500rpm e o soro sanguíneo obtido foi pipetado em microtubos de 1,5mL para fracionamento eletroforético das proteínas em gel de poliacrilamida 7%.

Para obter os valores de gamaglobulina (g.dL^{-1}) foi utilizada a porcentagem desta fração após leitura densitométrica do gel pelo equipamento Image Master® VDS²⁰. Esses resultados foram multiplicados pelo valor da PT e divididos por 100%.

Foi utilizada a análise descritiva do programa Assistat Statistical para proteína total e fração gama (Silva & Azevedo, 2009). Para a interação entre as variáveis foi empregado o Teste de Spearman ao nível de 1% de probabilidade do programa IBM/SPSS Statistics v.19.0.

²⁰ Image Capture Board, Image Master® VDS System, Pharmacia Biotech Inc.

RESULTADOS

A concentração de PT sérica nos momentos zero e 6 horas não diferiram entre si, mas quando relacionadas aos momentos 12, 24, 36 e 48 horas observou-se um aumento significativo (quadro 1). Quanto a fração gamaglobulina no momento zero foi significativamente menor que os outros períodos, confirmando a hipogamaglobulinemia que ocorre nos cordeiros ao nascer e antes de mamar o colostro. Às 6 horas de vida, a quantidade de gama foi maior que no momento zero, mas ainda menor que os momentos 12, 24, 36 e 48 horas (quadro 1).

No quadro 2 foram dispostos os resultados obtidos na correlação da PT com a gamaglobulina sérica pelo teste de Spearman, verificando-se que existe interação positiva entre as variáveis, ou seja, a concentração de PT sérica aumentou a medida que ocorreu acréscimo na quantidade de gamaglobulina entre os períodos estudados.

DISCUSSÃO

Foi observado um acréscimo na concentração de PT entre os momentos zero ($4,46 \pm 0,58 \text{ g.dL}^{-1}$) e 24 horas ($5,68 \pm 0,89 \text{ g.dL}^{-1}$), estabilizando logo após. Esses dados condizem com o relatado por Silva e colaboradores (2007) que analisaram o soro de cordeiros mestiços e obtiveram resultados de $3,62 \pm 0,7 \text{ g.dL}^{-1}$ no momento zero (0h) com aumento para $6,77 \pm 1,20 \text{ g.dL}^{-1}$ após 24 horas de vida. Os aumentos séricos demonstram a capacidade do organismo do neonato em absorver, em pouco tempo grandes quantidades de moléculas proteicas e repassá-las a circulação. Também foram muito próximas às obtidas por Nunes (2006) para cordeiros nascidos de parto simples, respectivamente $4,649 \text{ g.dL}^{-1}$ e $7,235 \text{ g.dL}^{-1}$. Esta elevação ocorre devido à absorção maciça das proteínas, principalmente gamaglobulinas, que estão presentes no colostro em grandes quantidades.

O uso do refratômetro como equipamento prático para avaliar a transferência efetiva de imunidade para o cordeiro pela averiguação da PT sérica revelou uma correlação positiva entre o valor obtido por esse método e a concentração de globulinas sérica (quadro 2). Assim, quanto maior o valor da proteína, maior presença de globulinas com função de anticorpo.

As gamaglobulinas estão presentes em baixa concentração no momento zero hora da corrida eletroforética do soro sanguíneo dos cordeiros. Isso estabelece que os animais nasçam hipogamaglobulinêmicos, confrontando a maioria dos autores que afirmam que os recém-nascidos da espécie ovina, assim como os bovinos, são agamaglobulinêmicos (Pugh, 2004; Barrington & Parish, 2006; Tizard, 2009).

A presença dessa pequena quantidade ($0,111 \pm 0,07 \text{ g.dL}^{-1}$) deve-se a produção endógena de imunoglobulinas, pois os cordeiros são aptos a produzirem anticorpos ainda dentro do útero, mas sendo estas inespecíficas (Tizard, 2009). Após a mamada do colostro ocorre um aumento de oito vezes na quantidade desta fração já nas primeiras 6 horas ($0,983 \pm 0,61 \text{ g.dL}^{-1}$) e a tendência é continuar elevando essa concentração até a estabilização dentro de 24 – 36 horas de vida. Isso revela a capacidade do cordeiro em absorver as proteínas do colostro, sendo este constituído por grande quantidade de proteínas, principalmente as gamaglobulinas.

Quadro 1 – Média (X), desvio padrão(s) e variância (s²) dos valores de concentração das proteínas totais sérica (g.dL⁻¹) obtidas por refratometria, e dos valores de γ -globulina sérica (g.dL⁻¹) dos cordeiros calculada a partir da PT sérica e da % de globulinas obtida pela eletroforese, de acordo com os momentos de colheita

	PT(g.dL ⁻¹)		γ -Globulina	
	X $\pm$ s	s ²	X $\pm$ s	s ²
0h	4,46 $\pm$ 0,58 ^{*a}	0,33	0,111 $\pm$ 0,07 ^{*a}	0,005
6h	4,75 $\pm$ 1,06 ^{*a}	1,12	0,983 $\pm$ 0,61 ^{*b}	0,38
12h	5,62 $\pm$ 0,87 ^{*b}	0,77	1,568 $\pm$ 0,87 ^{*c}	0,77
24h	5,68 $\pm$ 0,88 ^{*b}	0,79	1,801 $\pm$ 0,86 ^{*c}	0,75
36h	5,19 $\pm$ 1,64 ^{*b}	2,72	1,656 $\pm$ 0,80 ^{*c}	0,66
48h	5,61 $\pm$ 0,76 ^{*b}	0,58	1,609 $\pm$ 0,72 ^{*c}	0,52

* - Teste *t* (p<0,01), correlação linear. a, b, c - Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si dentro do grupo, teste *t* ao nível de 5% probabilidade.

Quadro 2 – Correlação entre proteína total sérica (PT) e gamaglobulina dos cordeiros nos períodos 0h, 6h, 12h, 24h, 36h, 48h de vida

	Gamaglobulina			
	Momentos	Coef. Correlação	Valor de P	N*
PT	0h	,091	,557	29
	6h	,613 ^a	,0001	29
	12h	,884 ^a	,0001	29
	24h	,934 ^a	,0001	27
	36h	,921 ^a	,0001	29
	48h	,910 ^a	,0001	28

*N – número de indivíduos. a – números seguidos pela mesma letra possuem significância estatística (p<0,01).

A máxima absorção de imunoglobulinas colostrais, em bovinos, ocorre às 8 horas de vida, com queda brusca após esse período (Cortese, 2009). O pico de absorção está entre às 12 e 24 horas, neste trabalho, sem prejuízo a imunidade do cordeiro. Uma explicação para o longo período de absorção nos ovinos pode ser a quantidade de colostro ingerida, pois os cordeiros mamam entre 100 e 200mL por dia, enquanto que os bezerros ingerem de 2 a 4L. O colostro, além de proteger também estimula o fechamento das microvilosidades intestinais às macromoléculas. Assim sendo, quanto maior a quantidade ingerida mais rápida será a troca de células epiteliais intestinais e menor a passagem de anticorpos. Por outro lado, esse rápido fechamento impede que agentes patogênicos adentrem ao organismo do neonato estimulando um quadro patológico (Tizard, 2009).

Para a concentração de globulinas no momento 24 horas no soro dos cordeiros da raça Bergamácia, encontrou-se $1,801 \pm 0,86 \text{ g.dL}^{-1}$ corroborando com os dados de Hunter e colaboradores (1977), em que a concentração imunoglobulínica menor que $1,5 \text{ g.dL}^{-1}$ no primeiro dia de vida, são considerados hipogamaglobulinêmicos. Também concordam com os valores estipulados por Nunes (2006) para considerar um animal com falha de transferência passiva (falha $< 0,5 \text{ g.dL}^{-1}$, boa $> 1,5 \text{ g.dL}^{-1}$). O mesmo critério foi adotado por Turquino e colaboradores (2011) que consideraram valores acima de $1,5 \text{ g.dL}^{-1}$ de gamaglobulina sérica, especificamente IgG, como adequada TIP.

CONCLUSÃO

O uso de instrumentos como o refratômetro, para diagnosticar rapidamente uma má transferência de imunidade, deve ser aplicado, podendo assim ser corrigida ainda no período de absorção do neonato, ou seja, dentro das primeiras 24 horas de vida.

Agradecimentos.- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de mestrado e do auxílio pesquisa. Aos colegas do Setor de Ovinos da Fazenda Edgárdia, UNESP. Aos Departamentos de Clínica Veterinária e Produção Animal da FMVZ – UNESP Botucatu, Física e Biofísica do IB – UNESP Botucatu e GAP da FMB, UNESP Botucatu.

REFERÊNCIAS

- Barrington, G.M. & Parish, S.M. 2006. Doenças de Imunodeficiência dos Ruminantes. In: Smith, B.P. Medicina Interna de Grandes Animais. 3ed. Manole, São Paulo, p.1600-1602.
- Cortese, V.S. 2009. Neonatal Immunology. In: Smith, R.A. Bovine Neonatology. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. Saunders Elsevier Inc., USA. 25(1):221 – 228.
- Grundy, S.A. 2006. Clinically Relevant Physiology of the Neonate, BVSc (Hons), MACVSc, Vet. Clin. Small Anim. 36: 443–459.
- Hunter, A.G., Reneau, J.K. & Williams, J.B. 1977. Factors affecting IgG concentration in day-old lambs. J. Anim. Sci. 45(5):1146-1151.
- Nordi, W.M. 2010. Efeito do fornecimento de colostro bovino liofilizado e caprino sobre o epitélio intestinal de caprinos recém-nascidos. Dissertação de Mestrado, Universidade De São Paulo, Piracicaba, SP. 92p.
- Nunes, A.B.V. 2006. Estudo da transmissão da imunidade passiva e da mortalidade em cordeiros mestiços de Santa Inês, na região norte de Minas Gerais. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 83p.
- Pugh, D.G. 2004. Clínica de Ovinos e Caprinos. Roca LTDA, São Paulo. 513p.
- Rook, J. S., Scholman, G., Wing-Proctor, S. & Shea, M.E. 1990. Diagnosis and control

- of neonatal losses in sheep. Vet. Clin. North Am. [Food Anim. Pract.]. 6(3):531-562.
- Silva, F.A.S.E. & Azevedo, C.A.V. 2009. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: World Congress On Computers In Agriculture, 7, Anais.... USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers.
- Silva, D.F.M., Costa, J.N., Araujo, A.L., Costa Neto, A.O. & Almeida, M.A.O. 2007. Serum proteinogram concentration in crossbred lambs (Santa Ines x Dorper) from birth until 90 days old: effect of the age and ingestion of colostrum monitoring. Arch. Vet. Sci. 12:86-87.
- Tizard, I.R. 2009. Imunologia Veterinária: Uma Introdução. 8ªed. Roca LTDA, São Paulo. 608p.
- Turquino, C.F., Flaiban, K.K.M.C. & Lisboa, J.A.N. 2011. Transferência de imunidade passiva em cordeiros de corte manejados extensivamente em clima tropical. Pesq. Vet. Bras. 31(3):199-205.