

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CAMPUS DE ARAÇATUBA

**AVALIAÇÃO COLOSTRAL E DE NÍVEIS SÉRICOS
IMUNES DE BEZERROS HOLANDESES ORIUNDOS DE
VACAS ACOMETIDAS OU NÃO POR MASTITE**

Guilherme Gonçalves Fabretti Santos

Médico Veterinário

ARAÇATUBA – SP

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CAMPUS DE ARAÇATUBA

**AVALIAÇÃO COLOSTRAL E DE NÍVEIS SÉRICOS
IMUNES DE BEZERROS HOLANDESES ORIUNDOS DE
VACAS ACOMETIDAS OU NÃO POR MASTITE**

Guilherme Gonçalves Fabretti Santos

Orientador: Prof. Dr. Francisco Leydson Formiga Feitosa

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

ARAÇATUBA – SP

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da FMVA / UNESP

Santos, Guilherme Gonçalves Fabretti

S237a

Avaliação colostrar e de níveis séricos imunes de bezeros holandeses oriundos de vacas acometidas ou não por mastite/
Guilherme Gonçalves Fabretti Santos.

Araçatuba: [s.n], 2013

108f. il.; + CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Medicina Veterinária, 2013

Orientador: Prof Adj. Francisco Leydson Formiga Feitosa

1. Mastite
2. colostro
3. Bezerro
4. Citocina
5. Imunoglobulinas
6. Proteínas de fase aguda
7. Transferência de imunidade passiva

CDD 636.22664



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba
Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Avaliação colostrar e de níveis séricos imunes de bezerros Holandeses oriundos de vacas acometidas ou não por mastite.

AUTOR: GUILHERME GONÇALVES FABRETTI SANTOS

ORIENTADOR: Dr. FRANCISCO LEYDSON FORMIGA FEITOSA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL (FISIOPATOLOGIA MÉDICA E CIRÚRGICA) pela Comissão Examinadora.


Dra. ALICE MARIA MELVILLE PAIVA DELLA LIBERA


Dra. MÁRCIA MARINHO


Dr. FRANCISCO LEYDSON FORMIGA FEITOSA

DATA DA REALIZAÇÃO: 1 de abril de 2013.


Presidente da Comissão Examinadora
Dr. FRANCISCO LEYDSON FORMIGA FEITOSA
- Orientador -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GUILHERME GONÇALVES FABRETTI SANTOS- Nascido em Londrina- PR, no dia 25 de Janeiro de 1984, filho de Lúcia Helena Gonçalves Santos e Eduardo Fabretti Santos. Graduiu-se em Medicina Veterinária na Universidade Estadual de Londrina no ano de 2008. Participou do programa de residência em Medicina Veterinária nível 1 e 2, junto ao Hospital Veterinário “Luiz Quintiliano de Oliveira” na Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba/UNESP na área de Clínica Médica, Cirúrgica e Anestesiologia de Grandes Animais com ênfase em Clínica Médica de Grandes Animais. Em março de 2011, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica de Grandes Animais) da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, curso de Mestrado sob a orientação do Prof. Dr. Francisco Leydson Formiga Feitosa.

"O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem."

(João Guimarães Rosa - Grande Sertão: Veredas)

Dedicatórias

Aos meus pais Lúcia e Eduardo que foram os pilares de minha vida. Fontes de inspiração e força, para superar todas as adversidades. Muito obrigado por todos os esforços e todas as adversidades que vocês enfrentaram para me ajudar. Sem vocês nada disso teria sido possível.

Ao meu grande Mestre, Professor Francisco Leydson Formiga Feitosa, exemplo de profissional e de pessoa. Meu Professor na residência e orientador do mestrado, que acreditou em mim, e mesmo com uma vida tão ocupada, sempre me deu toda atenção. Muito obrigado, Mestre!

À minha namorada Renata que me ajudou de uma forma inimaginável. Esteve ao meu lado nos momentos bons e ruins, e que, apesar de todos os seus afazeres, sempre tinha tempo para me ajudar. Exemplo de pessoa para mim e para todos que a conhecem. Sempre me apoiando e incentivando a enfrentar os desafios diários. Muito obrigado por fazer parte de tudo isso e me ajudar sem medir esforços. A você dedico este trabalho, pois você é uma parte muito importante dele.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida. Por todos os dias mostrar o sentido real de vivermos.

Aos meus pais e minha irmã Raquel, que se sacrificaram para que este trabalho tivesse êxito. Com muita força e estímulo me ajudaram a superar as dificuldades.

À minha namorada Renata, exemplo de pessoa e profissional. Sem você nada disso seria possível.

Ao meu Mestre e amigo professor Francisco Leydson F. Feitosa por todos os seus ensinamentos, principalmente na semiologia veterinária. Tenho muita admiração pelo senhor como orientador, profissional e pessoa. Muito obrigado por confiar em mim.

À Fazenda São Joaquim (Milk Mel) por permitir que toda essa pesquisa fosse possível em especial ao senhor João Abdala, Itamar, Val, Osvaldo, Gilmar, Barata e em especial ao Carlão quem sempre me ajudou com os animais, sendo prestativo e solidário independente do horário e do dia, muito obrigado a todos vocês.

Aos meus grandes amigos Renan e Melissa que mesmo de tão longe sempre me ajudaram e me deram conselhos. Muito obrigado, sem vocês nada disso teria sido possível.

Ao meu eterno amigo Daniel (*in memoriam*) que partiu tão cedo deixando seus conselhos e seus bons exemplos. Você me deu força todos os dias, mesmo não estando presente.

A todos os meus amigos da 55ª turma de medicina veterinária da UEL. Em especial ao Alexandre, Gabriel, Éder, Christopher, Adriano e Eduardo, que tem uma enorme parcela de contribuição na minha formação. Muito obrigado.

Aos meus amigos de Araçatuba, Maurício, Jefferson, Luis Gustavo e Breno. A vocês agradeço toda a amizade e companherismo.

À toda equipe de neonatologia Fernanda, Larissa, Natália, André e Diogo que sempre me ajudaram. Vocês foram muito importantes para esse trabalho.

À Tatiane Silva Poló pela incansável ajuda no processamento das análises eletroforéticas.

Aos meus colegas de residência Miriam, Sérgio, Otávio, Vanessa, Maurício, Rafaela, Josiane e Natália que ajudaram no meu crescimento profissional.

Aos professores de clínica médica, cirúrgica e anestesiologia de grandes animais da UNESP de Araçatuba. Prof. Dr. Fabiano, Prof. Dr. Luiz Cláudio, Prof. Dr. Paulo Sérgio Patto, Prof. Dra. Juliana e Prof. Dr. Celso. Muito obrigado pelos ensinamentos e oportunidades.

À Prof. Dra. Juliana Peiró, que mesmo sempre ocupada, tinha tempo para me ajudar e esclarecer todas minhas dúvidas.

À Prof. Dra. Márcia Marinho e Cilene pela ajuda incondicional com as análises de microbiologia desse trabalho

À Prof. Dra. Silvia H. V. Perri pela ajuda com as análises estatísticas.

À Universidade Estadual de Londrina e a todos os mestres que fizeram parte da minha formação, em especial ao Prof. Dr. Augusto Savioli por sempre acreditar em mim, ao Prof. Dr. Júlio César de Freitas que sempre me aconselhou e me ajudou com seus ensinamentos.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, pela disponibilização das instalações e equipamentos para que a realização dessa pesquisa fosse possível.

À Prof. Dra Alice Maria Melville Paiva Della Libera, Prof. Dra. Viviani Gomes e a Prof. Dra. Karina Médici Madureira por toda a preocupação em esclarecer minhas dúvidas.

À toda minha família que, de alguma forma, me ajudou a realizar esse trabalho.

À Fundação de amparo a pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro e pela bolsa de estudos (Processo: 2010/12256-1 e 2010/12229-4)

A todas as pessoas que me ajudaram direta e indiretamente durante esse trabalho disponibilizando equipamentos, salas e utensílios para que o andamento dessa pesquisa pudesse ocorrer da melhor forma possível. A todos muito obrigado pelo incentivo e paciência.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 Colostro	20
2.2 Mastite bovina	22
2.3 Resposta ao processo inflamatório de fase aguda	25
2.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5 CONCLUSÕES.....	92
REFERÊNCIAS.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- α – alfa
- β – beta
- \bar{X} - média
- % - por cento
- \pm - mais ou menos
- °C – graus Celcius
- CMT – California mastites test
- CCS – contagem de células somáticas
- dL – decilitro
- DNA – ácido desoxirribonucleico
- ELISA – ensaio imunossorvente ligado à enzima
- FTIP – falha na transferência de imunidade passiva
- g – gramas
- G – força gravitacional
- GL – gay lussac
- GI – grupo I
- GII – grupo II
- GIII – grupo III
- GIV – grupo IV
- h – hora
- Hp – haptoglobina
- IgA – Imunoglobulina A
- IgG – imunoglobulina G
- IgG₁ – imunoglobulina G 1
- IgG₂ – imunoglobulina G 2

- IgM – imunoglobulina M
- IL1- β – interleucina 1 beta
- IL-2 – interleucina 2
- IL-3 – interleucina 3
- IL-4 – interleucina 4
- IL-5 – interleucina 5
- IL-6 – interleucina 6
- IL-10 – interleucina 10
- INF- γ – interferon gama
- kDa – kilo Daltóns
- LF – lactoferrina
- M – molar
- MHz – mega Hertz
- min – minutos
- MIX – pool amostral de todos os quartos mamários
- mL – mililitros
- mm – milímetros
- N° - número
- nm – nanômetros
- pg – picogramas
- PFA – proteínas de fase aguda
- RFA – resposta de fase aguda
- RNAm – ácido ribonucléico mensageiro
- S – desvio padrão
- SDS-PAGE- eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio

- Se – selênio
- Th1 – linfócito T helper 1
- Th2 – linfócito T helper 2
- TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

Avaliação colostrar e de níveis séricos imunes de bezerros holandeses oriundos de vacas acometidas ou não por mastite

RESUMO- O objetivo do estudo foi avaliar a transferência de imunidade passiva (TIP) de vacas que pariram com mastite assintomática e clínica para os seus bezerros. Foram avaliados quatro grupos, a saber: Grupo I (GI) composto de 10 vacas primíparas sadias com contagem de células somáticas (CCS) ≤ 300 mil cél/mL, Grupo II (GII) composto de 10 vacas pluríparas sadias com CCS 301-600 mil cél/mL; Grupo III (GIII) composto de 10 vacas pluríparas com histórico de mastite que pariram com mastite assintomática com CCS > 600 mil cél/mL sem alterações no úbere e colostro; e Grupo IV (GIV) composto por 10 vacas pluríparas com histórico de mastite que pariram com mastite clínica com CCS > 600 mil cél/mL com alterações no úbere e/ou colostro. Foram coletadas amostras de sangue e colostro imediatamente após o parto, 24 e 48 horas após o parto/nascimento. O cultivo microbiológico mostrou ser *Streptococcus* sp. o principal agente isolado nos animais com mastite assintomática e o *Staphylococcus* sp. nos animais com mastite clínica. A CCS estipulada para os animais do grupo controle não pode ser seguida, uma vez que as secreções de animais sadios apresentaram valores médios superiores a 992 mil cél/mL de colostro. O CMT foi valioso no diagnóstico a mastite no pós-parto imediato. O exame ultrassonográfico mostrou-se eficaz na determinação de parênquimas acometidos por infecção. Não foram observadas diferenças entre os valores dos constituintes proteicos do colostro e dos valores de citocinas de vacas primíparas e pluríparas. A ingestão de colostro oriundo de vacas com mastite clínica e assintomática não causa falha na transferência de imunidade passiva nos respectivos conceptos.

Palavras-chave: mastite, colostro, bezerro, citocinas, imunoglobulinas, proteínas de fase aguda, transferência de imunidade passiva.

Evaluation of colostrum and serum immune components from Holstein calves delivery from cows with and without mastitis.

SUMMARY-The aim of this study was to evaluate the transfer of passive immunity (TPI) in Holstein calves delivery from cows with subclinical and clinical mastitis. Four groups of studies were evaluated. Group I (GI) 10 healthy primiparous cows with SCC \leq 300,000 cells/mL, Group II (GII) 10 healthy multiparous cows with SCC 301-600,000 cells/mL, Group III (GIII) 10 multiparous cows with mastitis records that calved with subclinical mastitis with SCC > 600,000 cells/mL with normality in udder and colostrum and Group IV (GIV) 10 multiparous cows with mastitis records that calved with clinical mastitis with SCC > 600 000 cells/mL with changes in the udder and/or colostrum. Blood samples and colostrum were collected immediately after birth, 24 and 48 hours after delivery/birth. The microbiological culture showed that *Streptococcus* sp. and *Staphylococcus* sp. were the most common bacteria isolated from cows with subclinical and clinical mastitis respectively. The SCC stipulated for the control group cannot be followed, since the secretions of healthy animals showed average values greater than 992,000 cells/mL of colostrum. CMT can be useful to confirm mastitis in post-partum period. The ultrasound was effective in determining parenchyma affected by infection. No differences were observed between the values of the protein constituents of colostrum and values of cytokines in multiparous and primiparous cows. Ingestion of colostrum derived from cows with clinical and subclinical mastitis is unlikely to be an important contributor to failure of passive transfer in calves.

Key-words: mastitis, colostrum, calves, cytokines, immunoglobulin, acute phase protein, immune passive transfer

1 INTRODUÇÃO

A mortalidade de bezerros nos primeiros meses de vida é uma das principais causas de prejuízo para a bovinocultura mundial, sendo a falha na transferência de imunidade passiva (FTIP) fator de grande contribuição para essas mortes (SELIM et al., 1995; WITTUM; PERINO, 1995). Os bovinos apresentam placenta do tipo sineptélicorioral, que impede a passagem de grande parte das bactérias, vírus e, igualmente, das proteínas séricas, principalmente de imunoglobulinas (TIZARD, 2008).

Os anticorpos são proteínas produzidas por estímulo antigênico e amplamente encontradas no colostro bovino. Essas proteínas são de extrema importância para os recém-nascidos, pois servem de defesa contra patógenos. Dessa forma, os bezerros necessitam de anticorpos por meio da ingestão de colostro materno (GODDEN, 2008). A maior taxa de absorção de macromoléculas ocorre nas porções mais distais do intestino delgado (CORTESE, 2009). A absorção de imunoglobulinas pelos neonatos é mais intensa nas primeiras quatro horas de vida. Após seis horas, somente 50% da capacidade de absorção é observada; após oito horas, a taxa de absorção decresce para 33%; e, às 24 horas de vida, nenhuma taxa de absorção é visível (CORTESE, 2009; GODDEN, 2008).

A principal imunoglobulina no colostro dos bovinos é a IgG, que corresponde a 80-95% dos anticorpos presentes, sendo a IgG₁ responsável por cerca de 80 a 90% das imunoglobulinas presentes (GODDEN, 2008). A passagem da IgG₁ para o colostro começa várias semanas antes do parto e continua até o momento da parição (BESSER; GAY, 1994). Cada imunoglobulina tem função específica, a saber: a IgG tem a função principal de identificar e destruir possíveis patógenos; a IgM serve como primeira defesa nos casos de septicemia; e, a IgA, protege as mucosas, como, por exemplo, a mucosa intestinal, ligando-se à parede intestinal e evitando a adesão de possíveis patógenos. Contudo, o efeito da IgA perdura enquanto o bezerro estiver consumindo colostro, pois atua na parede externa do intestino (TIZARD, 2008).

Não apenas anticorpos estão presentes no colostro, mas outros constituintes do sistema imune, tais como macrófagos, neutrófilos, linfócitos B, citocinas, fatores de crescimento e hormônios, se tornam totalmente ativos após a absorção. Enzimas e minerais como cálcio, fósforo e magnésio também estão presentes (FRANCIOSI et al., 2009). A função desses ainda é motivo de estudos, mas sabe-se que tem a função de realçar mecanismos de defesa nos neonatos, aumentar a atividade linfocitária, estimular atividade fagocítica e bactericida no trato digestório, e aumentar a transferência de imunidade passiva (CORTESE, 2009; GODDEN, 2008).

As citocinas são proteínas que participam tanto da resposta imune inata quanto da adaptativa. São produzidas frente aos estímulos de microrganismo e outros antígenos. Elas sinalizam diversos eventos sinérgicos que contribuem para o funcionamento e desenvolvimento do sistema imune neonatal. Há dificuldades na quantificação e no estudo da ação das citocinas na glândula mamária, pois esta é secretada em intervalo de tempo curto e consumida completamente durante sua atuação. Sua ação, preferencialmente local, ocorre em virtude da meia-vida curta dessa molécula (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Atualmente mais de 30 tipos de citocinas já foram identificadas, e sua mensuração tem sido utilizada no controle e no diagnóstico da mastite bovina (SORDILLO et al., 1997). A secreção dessas moléculas está relacionada a duas populações de linfócitos *T helper*: Th1 responsável pela produção de IL-2, IL-3, TNF- α e INF- γ e o Th2 que, além de produzirem os anticorpos, produzem IL-4, IL-5 e IL-10 (MADUREIRA, 2011). Esses linfócitos as produzem em resposta ao reconhecimento dos antígenos por parte do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) presentes nos linfócitos B e nos macrófagos (SORDILLO et al., 1997). O colostro bovino contém uma série de citocinas como a IL-6 e TNF- α . Pouco se conhece a respeito do papel dessas moléculas, porém acredita-se que esteja ligado à imunidade do neonato (HAGIWARA et al., 2000).

A produção das proteínas de fase aguda está diretamente relacionada às citocinas. Após lesão tecidual ocorre a liberação de citocinas pró-inflamatórias (ECKERSALL, 2000). O TNF- α , IL-1 β e INF- γ , são fundamentais na indução de outras citocinas e agentes inflamatórios. Esses agentes atuam nos hepatócitos

estimulando a produção das proteínas de fase aguda como a ceruloplasmina, transferrina, haptoglobina, entre outras, que auxiliam no diagnóstico precoce e no prognóstico de enfermidades inflamatórias, tão comuns em neonatos (BARRAGRY, 1997; FAGLIARI; SILVA, 2002; FAGLIARI et al., 2003; GRUYS et al., 2005).

A inflamação da glândula mamária causada pela invasão de microrganismo é uma das principais causas de diminuição da produção leiteira. O processo inflamatório desencadeia o recrutamento de inúmeras células de defesa e mediadores inflamatórios que são responsáveis pela proteção do tecido glandular (RIOLETT et al., 2000). Além disso, a severidade da mastite influencia a quantidade de citocinas liberadas (WENZ et al., 2010). O tipo de agente também é responsável pelo padrão de resposta e pelo tipo de citocina liberada (SORDILLO et al., 1997; WENZ et al., 2010).

No rebanho brasileiro a mastite pode ter prevalência de até 71%. Contudo, a maior porcentagem de perdas pela mastite é devido à forma assintomática da doença (70-80%), sendo mais difícil de ser diagnosticada (COSTA, 1995). A incidência de mastite nas vacas leiteiras parece elevar-se com o aumento da idade dos animais. Essa infecção, quando adquirida durante o período seco, persiste de forma assintomática até o parto ou o início da lactação (SMITH et al., 1985).

O diagnóstico da mastite é realizado por meio do exame físico, características macroscópicas do leite, contagem de células somáticas por fluxometria, ou indiretamente, pelo California Mastitis Test (CMT), contagem bacteriana total e cultura de patógenos do leite (GROUNLUND et al., 2005). A ultrassonografia do úbere também pode ser realizada para o diagnóstico da mastite. Porém, seu uso não substitui o exame bacteriológico e de contagem de células somáticas em quartos acometidos por mastite, mas fornece informações mais precisas sobre a normalidade do úbere do que a palpação, e ajuda no estabelecimento do diagnóstico da enfermidade (FRANZ et al., 2009).

Vacas primíparas têm menor prevalência de mastite clínica do que vacas mais velhas, as quais, por sua vez, apresentam maior variação na contagem de células somáticas (CCS) do que vacas de primeira cria (MILLER et al., 1991).

Glândulas mamárias sem histórico recente de mastite têm grande número de células somáticas nos primeiros dias de lactação, ou seja, na fase colostrar, e decréscimo nesse valor com a evolução dos dias. Segundo Dohoo (1993) vacas primíparas e pluríparas apresentam valores elevados na CCS nos primeiros nove a onze dias após o parto, respectivamente. Raimondo et al. (2008) estudando os valores de células somáticas em animais da raça Jersey observaram que após o 15º dia de lactação os valores de CCS são plausíveis aos patamares de plena lactação. Porém, na literatura não existem valores de células somáticas definidos que possam confirmar o diagnóstico da mastite na secreção colostrar.

Quando as amostras de colostro são submetidas ao exame do CMT há divergências sobre a porcentagem de reações negativas ao teste, devido, provavelmente, ao fato de ser um método semi-quantitativo e de apresentar sensibilidade na detecção de amostras com alto número de células (BIRGEL JÚNIOR, 2006). Porém, estudos comprovam ser o CMT uma ferramenta útil no diagnóstico da mastite no pós-parto imediato (MAUNSELL et al., 1999).

A mastite que ocorre no período seco e no início da lactação é causada, geralmente, devido à infecção por *Staphylococcus* sp. (SORDILLO et al., 1989). O *S.aureus* é o maior causador da mastite bovina em vários países do mundo (ROBERSON et al., 1998). Esse patógeno causa redução da capacidade secretória e de síntese das células epiteliais da glândula mamária de vacas pluríparas durante a colostrogênese (MAUNSELL et al., 1998). Tanto bactérias Gram-positivas como Gram negativas já foram identificadas no colostro bovino (MAUNSELL et al., 1998), e diferentes respostas celulares são observadas dependendo do tipo de patógeno presente (RIOLLET et al., 2000).

O objetivo desse estudo foi o de investigar os efeitos da mastite clínica e assintomática, bem como a influência do número de lactações em vacas da raça Holandesa nas características físicas, microbiológicas e imunes do colostro produzido, de forma a avaliar a eficiência de transferência de imunidade passiva em seus respectivos produtos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Colostro

O colostro bovino tem sido foco de muitos estudos ao longo dos últimos anos (GODDEN, 2008; MADUREIRA, 2011; ROCHA, 2010; SANT'ANA, 2004). Sua importância está intimamente ligada à produção animal, pois uma satisfatória transferência de imunoglobulinas para os recém-nascidos resulta em melhora no ganho de peso, redução da mortalidade neonatal, redução da idade a primeira cria, aumento na produção leiteira entre outras características importantes para a cadeia produtiva do leite e da carne (GODDEN, 2008). Contudo, o colostro é extremamente rico em células de defesa para o neonato ainda sem competência imunológica (CORTESE, 2009). Uma produção colostrada de boa qualidade permite efetiva transferência de imunidade passiva. Nesse aspecto, a glândula mamária deve estar isenta de microrganismo para que não haja sua transferência (JOHNSON et al., 2007).

No que tange a qualidade e quantidade de colostro produzido, alguns aspectos devem ser levados em consideração. A categoria animal é inerente a essas características, pois a glândula mamária cresce a cada gestação comportando, assim, uma quantidade de colostro superior à prenhez anterior (SWANSON; POFFENBARGER, 1979). Porém, acredita-se que exista relação inversa entre a quantidade produzida e a concentração de imunoglobulinas. Supõe-se que um volume maior de colostro dilua essas proteínas. Portanto, o volume produzido não tem relação com a concentração de anticorpos produzidos. No que concerne à nutrição pré-parto, suspeita-se que não haja influência na produção de imunoglobulinas, mas a administração de elementos, como vitamina E e Se, podem aumentar a quantidade de colostro secretado (GODDEN, 2008).

Os bezerros recém-nascidos são susceptíveis a infecções, pois a placenta das fêmeas bovinas impede a passagem de anticorpos para esses animais. A fonte dessas glicoproteínas é também o primeiro alimento, o colostro

(GODDEN, 2008). Este possui citocinas, imunoglobulinas, leucócitos, hormônios, fatores de crescimento entre outras que são de extrema importância tanto para o desenvolvimento quanto para a defesa dos conceptos (BARRINTON; PARISH, 2001).

Há quatro classes de imunoglobulinas presentes na glândula mamária que auxiliam em sua defesa IgG₁, IgG₂, IgA e IgM. Todas essas são encontradas normalmente no leite e no colostro bovino, porém em casos de mastite e durante a colostrogênese suas concentrações atingem o pico de produção (SORDILLO; STREICHER, 2002). De todos os isótipos a IgG é a molécula com maior representação no colostro, sendo seguida pela IgM e IgA (BARRINTON; PARISH, 2001; GODDEN, 2008; TIZARD, 2008).

Outra categoria de células presente são os leucócitos. Pesquisas já apontaram a existência das células brancas na secreção colostrar (GODDEN, 2008; GOMES, 2008; TIZARD, 2008). Os leucócitos fazem parte das chamadas células somáticas. Essa terminologia inclui os glóbulos brancos, originários da corrente sanguínea, e as células de descamação do epitélio glandular secretor. Os leucócitos, em sua maioria, são mobilizados do sangue para o tecido mamário diante de alterações na permeabilidade capilar. Seu aporte se intensifica na quarta semana pré-parto, diminuindo gradativamente até uma semana pós-parto. (PHILPOT; NICKERSON, 1991). O número dessas células depende de vários fatores, inclusive do período da lactação (FAGAN et al., 2008).

Outro componente importante presente no colostro bovino são as citocinas (HAGIWARA et al., 2000). Essas proteínas participam tanto da resposta imune inata quanto da adaptativa. Sua presença na glândula mamária é extremamente importante, pois são responsáveis por desencadear defesa incipiente. Por sua vez, essas também são transmitidas aos recém-nascidos por meio do colostro. Porém, somente por meio deste, que os neonatos adquirem essas moléculas que auxiliam o sistema imune ainda imaturo (MADUREIRA, 2011). Acredita-se que o mecanismo de absorção das citocinas seja semelhante aos das imunoglobulinas e que, com o passar do tempo, há a diminuição de receptores na mucosa intestinal, diminuindo, assim, a absorção dessas moléculas (BARRINTON; PARISH, 2001). Tanto no leite quanto no colostro sua

concentração parece estar aumentada na presença de microrganismo e outros antígenos (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

2.2 Mastite bovina

A mastite é a principal doença infecciosa que afeta o rebanho leiteiro no mundo (BARKEMA et al., 2009). Poucos estudos têm evidenciado as perdas econômicas com essa doença no Brasil. Holanda et al. (2005) contabilizaram o prejuízo atribuído à mastite em cinco rebanhos do interior de Minas Gerais. Esses autores mensuraram perdas econômicas na ordem de US\$126 por animal. Demeu et al. (2009) estimaram prejuízos da ordem de US\$693,32-733,19 por animal ao longo da lactação. Esses prejuízos são referentes tanto à diminuição da produção leiteira, da qualidade do leite como também aos gastos com medicamentos e exames complementares para o diagnóstico da doença.

A mastite nos bovinos pode se apresentar de duas formas: assintomática e clínica. A mastite assintomática não se caracteriza por alterações macroscópicas na secreção láctea, porém há mudanças na composição do leite além do isolamento de microrganismo. Esse tipo de mastite tem impacto maior na produção leiteira, pois a ausência de sinais evidentes da inflamação da glândula mamária passa despercebida na maioria das vezes (BRITO et al., 1997).

Atualmente a mastite clínica é dividida em três escores segundo o grau de severidade da doença. Grau 1: anormalidade no leite; grau 2 anormalidade no leite e no úbere; e grau 3: anormalidade no leite, úbere e alterações clínicas, como aumento da temperatura retal, diminuição dos movimentos ruminais, desidratação e alteração de postura (RUEGG, 2012; WENZ et al., 2010).

No Brasil, a partir da década de 1990, algumas cooperativas de laticínios iniciaram a implantação gradativa de programas de pagamento do leite por qualidade tendo por base as provas de redutase, crioscopia e contagem global de microrganismo. Em casos isolados, os rendimentos por qualidade incluía a CCS (MÜLLER, 2002). Porém, o País não possuía normas que regularizavam a cadeia produtiva do leite. Atualmente as condições ideais do leite produzido no Brasil

estão regulamentadas pela instrução normativa 62 (IN 62). Essa normativa estipula os requisitos básicos a serem adotados na composição e produção do leite comercializado. A CCS é um dos padrões mais usados para a mensuração da higiene do leite. Pela legislação em vigor a CCS do leite tipo A integral é de $4,80 \times 10^5$ células /mL (BRASIL, 2011). A secreção láctea de um úbere sadio apresenta número de células somáticas baixo, sendo essas células representadas predominantemente pelos macrófagos (SORDILLO et al., 1997). Quando há a invasão de um patógeno ocorre a liberação de IL-1 β e TNF- α . Essas moléculas atraem para o interior da glândula grandes quantidades de glóbulos brancos, sendo os neutrófilos as células predominantes, podendo chegar a até 90% do total, culminando com o aumento na CCS. Essa intensa diapedese causa lesões no parênquima mamário e ocasiona diminuição da produção de leite. Além do número de macrófagos diminuírem, sua atividade fagocítica também é deprimida. (SORDILLO; STREICHER, 2002).

Na dependência do tipo de agente há maior liberação de determinado tipo de citocina, porém o TNF- α e a IL-6 desempenham papel fundamental para a resposta imune do hospedeiro (GRUYS et al., 2005). A grande liberação de TNF- α ocorre principalmente quando o úbere é invadido por bactérias Gram-negativas. Sua secreção desencadeia uma série de respostas inflamatórias que podem ser nocivas ao animal. Além disso, essa molécula em conjunto com a IL-1 β é responsável pela liberação da IL-6. Essa citocina está envolvida na resposta imune inata e adaptativa além de estimular a diferenciação dos linfócitos B para a produção de imunoglobulinas. A IL-6 e o TNF- α , também são responsáveis pela produção hepática de proteínas de fase aguda que agem tanto sistemicamente como localmente na glândula mamária (ECKERSALL et al., 2006; GRUYS et al., 2005).

Os microrganismos envolvidos na etiologia da mastite bovina podem ser classificados epidemiologicamente em dois grupos, segundo a fonte de infecção e modo de transmissão: microrganismos contagiosos transmitidos principalmente durante a ordenha, que necessitam do animal para sobreviverem e se multiplicar no interior da glândula mamária; os microrganismos ambientais, presentes no ar, cama, água e fezes. No primeiro grupo encontram-se o *Streptococcus agalactiae*,

Staphylococcus aureus, e no segundo grupo, *Streptococcus uberis* e outros estreptococos, enterobactérias, além de fungos, principalmente leveduras, e algas clorofiladas do gênero *Prototheca* sp. (COSTA, 1998).

A reação inflamatória causada por esses patógenos causa profundas mudanças na composição do leite. Em relação aos componentes lácteos ocorre redução naqueles sintetizados na glândula mamária (α e β caseína, α -lactoalbumina e β -lactoglobulina) e aumento das proteínas de origem sanguínea (albumina sérica e imunoglobulinas). Em virtude do processo infeccioso há maior permeabilidade entre a glândula mamária e a corrente sanguínea fazendo com que haja o influxo de constituintes séricos para o interior do sistema afetado (KITCHEN, 1981; LARSON, 1980). Outra proteína que apresenta alteração marcante nas mastites é a lactoferrina. Essa proteína absorve o ferro necessário para a replicação bacteriana aumentando sua concentração na presença de um estímulo inflamatório (TSUJI et al., 1990).

No entanto, há divergências na literatura no que diz respeito às alterações dos constituintes lácteos. Maunsell et al. (1998) não observaram diferenças significativas nas concentrações de imunoglobulinas no colostro de vacas com mastite clínica quando comparadas às de vacas sadias. Sant'ana (2004) não observou diferenças entre as concentrações de α -lactoalbumina e β -lactoglobulina de animais sadios e animais com mastite. Porém, esse mesmo autor evidenciou maior concentração de albumina no leite de animais acometidos por mastite, mas não constatou diferença, em sua concentração, em amostras estéreis e contaminadas por microrganismo.

A eficiência do diagnóstico da mastite depende de vários fatores. A experiência clínica é fundamental para tal êxito, contudo existe uma série de testes complementares que podem auxiliar o clínico de maneira mais efetiva. O California Mastitis Test (CMT) possibilita ao clínico o diagnóstico rápido da doença no rebanho. A utilização do CMT é muito útil, principalmente no diagnóstico da mastite assintomática aonde a reação ocorrida entre o reagente e o leite é proporcional à concentração de células de defesa presentes, podendo indicar, de forma subjetiva, a intensidade do processo inflamatório (BRITO et al., 1997). Os testes do recipiente do fundo escuro e da caneca telada também são

considerados de extrema valia para o diagnóstico da doença. Todos esses testes podem ser realizados ao pé da vaca e são facilmente interpretados.

2.3 Resposta ao processo inflamatório de fase aguda

Na última década o estudo da monitoração e do diagnóstico precoce das reações inflamatórias tem ganhado importância. A resposta de fase aguda (RFA) é primordial para a ação do sistema imune inato contra as ações lesivas dos microrganismos no hospedeiro (ECKERSALL et al., 2006). Esse tipo de resposta ocorre no estágio inicial do processo inflamatório não sendo necessária uma memória imunológica para que o organismo reconheça e destrua o antígeno. A penetração desses agentes no organismo causa vários tipos de alterações como lesões teciduais, inflamação, distúrbio imunológico, entre outras. Em virtude dessas alterações, o sistema imune age rapidamente, liberando moléculas chamadas citocinas. Existe uma gama de diferentes tipos de citocinas, porém a primeira linha de defesa apresenta características pró-inflamatórias (GRUYS et al., 2005; WENZ et al., 2010). IL-1 β , INF- γ e TNF- α são as primeiras citocinas liberadas. Essas proteínas induzem sinais sistêmicos no animal como febre e anorexia. Além disso, há aumento dos precursores de células brancas na medula óssea, aumento dos fibroblastos e macrófagos (GRUYS et al., 2005).

As moléculas supracitadas também são responsáveis pela liberação de outras citocinas como a IL-6. As interleucinas são um grupo de moléculas responsáveis pela sinalização entre os linfócitos (TIZARD, 2008). Em resposta à inflamação aguda, essa molécula é secretada pelos macrófagos presentes no local afetado, iniciando uma série de reações que tem por finalidade a defesa do organismo (ECKERSALL et al., 2006). A IL-6 é necessária para a diferenciação final dos linfócitos B em plasmócitos. Ela atua em conjunto com outras interleucinas para promover a produção de diferentes classes de imunoglobulinas como, por exemplo, a IgA e a IgM (TIZARD, 2008).

O TNF- α é uma citocina secretada por macrófagos e linfócitos T. Esta molécula está envolvida diretamente no processo inflamatório agudo, assim como

as interleucinas (TIZARD, 2008), sendo consumida rapidamente (SORDILLO; STREICHER, 2002). Portanto, essas moléculas estão presentes em grandes concentrações no sangue de animais acometidos por processos inflamatórios (GRUYS et al., 2005).

Essas citocinas auxiliam localmente no combate aos agentes patogênicos, no entanto, a IL-6 e o TNF- α desencadeiam a resposta de fase aguda atuando em receptores hepáticos. No fígado são responsáveis pela ativação do RNAm para a síntese das proteínas de fase aguda positivas. Essas proteínas têm essa denominação, pois aumentam sua concentração em resposta a processos inflamatórios ou infecciosos. Nos bovinos são representadas pela ceruloplasmina, haptoglobina e α_1 -glicoproteína ácida. Ao mesmo tempo há diminuição de outras proteínas como a transferrina e a albumina, que são denominadas de proteínas de fase aguda negativas (ECKERSALL, 2000; GRUYS et al., 2005).

Nos seres humanos as proteínas de fase aguda (PFA) são classificadas em três grupos de acordo com a elevação sérica de suas concentrações durante a RFA. Grupo 1-aumento de 50%: ceruloplasmina; Grupo 2-aumento de duas a três vezes: haptoglobina e fibrinogênio; Grupo 3-aumento de cinco a 1000 vezes: Proteína-C reativa e Amilóide sérica A. Porém, na medicina veterinária, as diferentes espécies animais apresentam respostas distintas. Por exemplo, em bovinos a haptoglobina pode aumentar em até 100 vezes devido à inflamação ou infecção, sendo a PFA mais utilizada para o diagnóstico precoce de processos mórbidos. Em aves a transferrina é considerada uma PFA positiva, diferentemente do que ocorre nos bovinos (ECKERSALL, 2000; GRUYS et al., 2005). Em cães, nos seres humanos, e nos suínos, a Proteína-C reativa é a proteína mais importante, aumentando sua concentração em até 1000 vezes durante a RFA (ECKERSALL, 2000).

Sabe-se que grande número de doenças nos bovinos é responsável pela estimulação da RFA. A mastite tem sido amplamente estudada no que se refere às alterações das PFA, tanto no leite como no soro sanguíneo dos animais acometidos (ECKERSALL et al., 2006; SANT'ANA, 2004; VELS et al., 2009; WENZ et al., 2010). No entanto, os animais recém-nascidos também têm sido foco de estudos (FAGLIARI et al., 2006; ROCHA, 2010). Nesses animais as PFA

podem ser preditoras de reações inflamatórias sofridas ainda dentro do útero materno (HUZZLEY et al., 2009). Fagliari et al. (2003) observaram aumento sérico da ceruloplasmina, haptoglobina e α_1 -glicoproteína ácida duas horas após a inoculação de cepas de *M. haemolytica* em bezerros holandeses, demonstrando que as PFA são extremamente importantes para o diagnóstico precoce de enfermidades inflamatórias e infecciosas em bovinos jovens.

2.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

A determinação do proteinograma é extremamente importante para a identificação e quantificação das frações proteicas presentes na amostra analisada. Ao longo dos anos essa técnica tem sido usada por diferentes autores para o estudo tanto em amostras de soro sanguíneo como da secreção láctea de vacas (KATO et al., 1989; ROCHA, 2010; SANT'ANA, 2004).

O fracionamento proteico é usado para a confirmação do diagnóstico de algumas enfermidades inflamatórias, entre elas a mastite. Kato et al. (1989) detectaram, por meio de corridas eletroforéticas em gel de poliacrilamida, alteração em no mínimo doze frações proteicas do leite de vacas com mastite. Por permitir maior segregação proteica, essa técnica auxilia na quantificação das PFA, tão sensíveis à resposta inflamatória, tais como: haptoglobina, ceruloplasmina, transferrina, α_1 -glicoproteína ácida, além da IgG, o que não é possível na eletroforese em gel de agarose, permitindo a detecção da FTIP em recém-nascidos (FAGLIARI et al., 2006, ROCHA, 2010; SANT'ANA, 2004).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizadas 40 fêmeas bovinas com e sem mastite, em fase puerperal, da raça Holandesa, provenientes de propriedade leiteira localizada no interior do Estado de São Paulo, na região de Araçatuba. Cerca de 40 bezerros, filhos das respectivas vacas, também foram acompanhados do nascimento até as 48 horas de vida. Os animais permaneceram com as suas mães após o nascimento e receberam os cuidados habituais recomendados no período pós-parto. O estudo foi aprovado pelos Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) (Protocolo N°02494-2011).

3.2 Seleção dos grupos animais

As vacas dos diferentes grupos foram alocadas da seguinte forma, a saber:

Grupo I (GI): 10 vacas saudáveis primíparas, com contagem de células somáticas no colostro de até 300.000 células.

Grupo II (GII): 10 vacas saudáveis pluríparas, com contagem de células somáticas no colostro entre 301.000 a 600.000 células.

Grupo III (GIII): 10 vacas com mastite assintomática e contagem de células somáticas no colostro superior a 600.000 células, mas sem alterações físicas do parênquima glandular e macroscópicas do leite.

Grupo IV (GIV): 10 vacas com mastite clínica e contagem de células superior a 600.000 células, e com alterações físicas do úbere e/ou macroscópicas do leite.

3.3 Seleção dos animais

A seleção das vacas pluríparas foi feita imediatamente antes do início do período seco, e após o parto, por meio do exame físico do úbere e da avaliação das características macroscópicas da secreção láctea. Foram acompanhadas, no início do período seco, o total de 49 vacas pluríparas (de duas a sete gestações) selecionando-se 10 vacas pluríparas sadias ao parto, 10 vacas pluríparas que pariram com mastite assintomática e 10 vacas pluríparas que pariram com mastite clínica. As mesmas avaliações foram realizadas em 10 vacas de primeira cria, imediatamente à parição. Para melhor inserção dos animais nos diferentes grupos, levou-se também em consideração o histórico desses animais com relação à saúde da glândula mamária nas diferentes fases, já que a propriedade realizava a CCS mensal dos animais em lactação, bem como possuía registros individuais dos mesmos, no que se refere à presença de mastite em um ou em mais períodos de lactação.

3.4 Alimentação e manejo geral dos animais

Na propriedade utilizada no presente estudo, os animais eram mantidos em pasto, recebendo alimentação a base de silagem de milho e ração comercial, na dependência da produção láctea.

Aos sete meses de gestação era realizada a secagem dos animais, retirando-os da ordenha. Aproximadamente quatro semanas antes da data prevista para o parto, esses animais eram alocados no piquete maternidade, próximo às casas dos funcionários, para melhor monitoração.

Quando os animais entravam em trabalho de parto, sempre que possível, um funcionário observava a vaca e somente interferia quando se passava mais de duas horas após a exposição dos cascos do feto sem que a parição ocorresse.

Todos os partos das fêmeas utilizadas no presente estudo foram acompanhados. A propriedade adotava, como regra geral de manejo, a permanência do bezerro com a respectiva mãe por período mínimo de seis a oito horas. Porém,

para o andamento normal do projeto, logo após o parto a fêmea era colocada no tronco de contenção e o CMT, teste da caneca do fundo escuro e a colheita do colostro eram realizados. Após esse período, a fêmea retornava para a companhia de seu respectivo conceito o qual ficava em observação até a efetiva ingestão do colostro. Após o evento, esses foram transferidos para piquetes coletivos, aonde recebiam ração específica para a faixa etária, feno e água “ad libidum”. Da mesma forma, a vaca retornava ao tronco de contenção para a primeira ordenha e realização dos exames ultrassonográficos e físico da mama.

3.5 Colheitas das amostras de colostro e leite

As amostras de colostro provenientes dos quartos mamários das fêmeas bovinas recém-paridas foram obtidas no tronco de contenção, logo após a parição, bem como às 24 e às 48 horas pós-parto. As colheitas foram realizadas após os procedimentos rotineiros de preparo dos animais. Para tanto, a glândula mamária e os tetos foram higienizados, retirando-se as sujidades, sendo os tetos embebidos em solução clorada e secos, individualmente, com papel toalha. Procedeu-se a assepsia da extremidade do teto, particularmente do seu orifício, utilizando-se algodão embebido em álcool 70° GL, de acordo com os padrões recomendados em boletim da *International Dairy Federation* (1981). Após assepsia, uma amostra representativa de cada quarto (MIX), foi colhida em um tubo do tipo Falcon estéril, de 50 mL, inclinado em ângulo de 90° em relação ao teto, para evitar contaminação. O frasco permaneceu aberto por, no máximo, cinco segundos, sendo posteriormente transportado ao laboratório em caixas de isopor com gelo.

Esse volume foi separado em dois tubos estéreis. O primeiro foi centrifugado a 700 G por 50 minutos a 4°C. Esta velocidade permitiu a separação da gordura, somente das amostras colhidas as 24 e às 48 horas. As amostras colhidas durante o pós-parto imediato não obtiveram separação em três fases nítidas. Portanto, padronizou-se a centrifugação de todos os momentos em microtubos, com capacidade de 1,5mL, em centrífuga própria, a 6000 G durante

30 minutos, a 4°C obtendo, assim, uma solução trifásica. A gordura foi retirada com uma bomba de vácuo e o sobrenadante foi armazenado em criotubos e congelado a -80°C (MADUREIRA, 2011).

À segunda alíquota, adicionou-se solução de renina¹ referente a 10% do volume total presente no tubo, permanecendo em banho-maria a 37°C por 20 minutos até a retração do coágulo. Posteriormente, foram centrifugados a 4200 G por 20 minutos a 15°C. Após a centrifugação, a gordura foi removida com auxílio de uma bomba de vácuo e, a porção intermediária da solução trifásica obtida, foi armazenada em microtubos, com capacidade de 1,5mL e armazenados a -20°C, até o momento das análises laboratoriais (ROCHA, 2010).

3.6 Colheita de amostras de sangue

As amostras de sangue foram colhidas dos bezerros recém-nascidos logo após o nascimento, às 24 e às 48 horas de vida, por meio de punção da veia jugular, usando sistema a vácuo, em um tubo siliconizado com anticoagulante² e uso de agulha para múltiplas colheitas (25mm X 8mm). Após a colheita, as amostras foram levadas ao laboratório sob refrigeração. Em seguida, após a retração do coágulo, foram centrifugadas a 1000 G, durante 10 minutos em centrífuga comum. Após a centrifugação o soro foi alíquotado em microtubos com capacidade de 1,5mL e congelados a -20°C e -80°C para a posterior mensuração das proteínas de fase aguda e de citocinas, respectivamente.

3.7 Avaliação das glândulas mamárias

As glândulas mamárias de cada vaca foram avaliadas seguindo-se as recomendações de Maunsell et al. (1998). Cada glândula foi examinada segundo as seguintes características, a saber: cor, tamanho, temperatura e consistência. A

¹ Coelho Estrella®, Chr. Hansen Brasil Ind. E Com. LTDA, Valinhos, São Paulo

² Vacutainer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA.

cor foi classificada como normal (amarelada) e avermelhada. O tamanho foi caracterizado como normal, maior que o esperado, ou menor que o esperado. A temperatura foi indicada como normal, quente e fria. A consistência foi caracterizada como normal (relativamente pastosa), firme e dura, segundo Dirksen (1993)

Para melhor avaliação do grau de lesão do parênquima glandular, realizaram-se exames ultrassonográficos. Para tanto, animais eram mantidos em tronco de contenção, em posição quadrupedal, e submetidos à higienização do úbere com água e sabão, secando-o, posteriormente, com papel toalha. O exame ultrassonográfico foi realizado com aparelho portátil³, equipado com transdutor linear de 5MHz. Após a aplicação de gel, o transdutor era apoiado e movimentado sobre superfície da pele dos parênquimas mamários, visando à realização de ultrassonogramas longitudinais e transversais.

3.8 Avaliação macroscópica da secreção láctea

As secreções colostrais colhidas de cada um dos quatro quartos mamários foram avaliadas de acordo com as recomendações de Maunsell et al. (1998), com relação a cor, viscosidade, opacidade e consistência. Alguns jatos de colostro foram desprezados em canecas de fundo escuro para verificar alterações macroscópicas na secreção. A cor foi classificada como amarelada, esbranquiçada, avermelhada, incolor ou acastanhada. A viscosidade foi classificada como viscosa (semelhante ao mel), ligeiramente viscosa (semelhante ao leite) ou aquosa (semelhante à água). A opacidade foi avaliada como opaca ou transparente. A consistência foi determinada como normal, se não houvesse a presença de grumos, estrias de sangue ou pús.

³ Mindray DP 2200vet, Shenzhen 518057, P. R. China.

3.9 Realização da CCS e do California Mastitis Test (CMT)

A análise das células somáticas das amostras de leite foi realizada nas vacas imediatamente após o parto, utilizando-se um contador de células somáticas portátil⁴. Uma amostra representativa de cada quarto mamário (MIX) foi coletada em um tubo Falcon estéril com 15 mL de capacidade.

O CMT foi realizado após a colheita de leite dos quartos mamários, individualmente, em uma bandeja apropriada. Adicionou-se detergente aniônico neutro⁵, que atua rompendo a membrana das células e liberando o material nucleico (DNA), que apresenta alta viscosidade. De acordo com a intensidade da reação classificou-se em: negativa (0), levemente positivo (+), nitidamente positiva (++) e fortemente positiva (+++) (GRUNERT, 1993). Dessa forma, quanto maior a gelificação da amostra de leite, maior o escore atribuído a essa mistura (BIRGEL, 2004). Esse teste teve por finalidade identificar de maneira rápida e prática os animais acometidos por mastite assintomática (SCHALM et al., 1971). O teste foi realizado logo após o parto, às 24 e às 48 horas após o evento, e os resultados anotados em fichas individuais.

3.10 Análise microbiológica do colostro e leite

As análises microbiológicas foram realizadas no laboratório de microbiologia do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba/UNESP. A obtenção e acondicionamento das amostras foram feitos de acordo com as recomendações de Birgel Junior (2006), desprezando-se os três primeiros jatos em um recipiente de fundo escuro. Cerca de cinco mL de leite foram armazenados em tubos do tipo Falcon estéreis, com capacidade para 15 mL, acondicionando-as em caixas de isopor, sendo posteriormente congeladas a -20°C. Após o descongelamento, as

⁴DeLaval cell counter DCC, DeLaval®, Estocolomo, Suécia

⁵ Reagente CMT, FATEC Indústria de nutrição e saúde animal LTDA, Arujá, São Paulo

mesmas foram semeadas em meio de ágar sangue de equino desfibrinado e MacConkey e incubadas a 37°C, sendo realizadas leituras do aspecto das colônias após 24, 48 e 72 horas de incubação.

Estudou-se a morfologia das colônias, anotando-se características com relação ao tamanho, forma, produção ou não de pigmento e presença de hemólise. Foram consideradas como cultura positiva quando havia o crescimento de pelo menos três colônias idênticas em um mesmo meio de cultivo, exceto para *S. aureus*, que se considerou como positiva a partir do crescimento de uma colônia (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1999). O isolamento dos microrganismos foi feito de acordo com as técnicas descritas por (QUINN et al., 1994).

3.11 Parâmetros bioquímicos do soro sanguíneo e da secreção láctea.

As análises séricas foram realizadas no Centro de Pesquisa do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba/UNESP. A proteína total do soro sanguíneo e do soro lácteo foi determinada pelo método do Biureto (STRUFALDI, 1987), utilizando reagentes comerciais⁶. As leituras foram feitas utilizando-se analisador bioquímico⁷ em comprimento de onda apropriado para o teste. O princípio do método baseia-se na reação de peptídeos e proteínas presentes no soro sanguíneo e lácteo com íons de cobre, presentes no reativo biureto, em meio alcalino, formando-se um complexo de coloração violeta.

Para o fracionamento proteico em SDS-PAGE foi utilizada a técnica proposta por Laemmli (1970). Após o fracionamento o gel foi corado por aproximadamente duas horas em solução de Coomassie blue 0,2%, e posteriormente, colocado em solução de ácido acético 0,1% e álcool metílico 0,25% para retirar o excesso do corante, até que as frações proteicas fossem nítidas. O gel foi conservado em solução de ácido acético a 7%. As frações foram

⁶ Labtest, Diagnóstica, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil

⁷ Celm, SB-190, Barueri, São Paulo, Brasil

mensuradas por meio de um programa computadorizado⁸. Como referência foi utilizada uma solução marcadora⁹ com diferentes pesos moleculares de amplo e estreito espectro, além das proteínas purificadas IgG sérica, transferrina, lactoferrina, α_1 -glicoproteína ácida, β -lactoglobulina e α -lactoalbumina.

3.12 Determinação das concentrações de citocinas

A dosagem das citocinas foi feita por meio de kits comerciais pelo método de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). O método é apontado como sendo altamente específico para a quantificação dessas moléculas em diferentes fluídos corpóreos.

Adotou-se o kit formulado para a espécie humana¹⁰. As citocinas de diferentes espécies podem ser homólogas, se a sequência de aminoácidos da citocina da espécie analisada apresentar, no mínimo, 60% de identidade com os aminoácidos da espécie padrão do kit utilizado. As citocinas analisadas nesta pesquisa seguiram este padrão (SCHEERLINCK, 1999).

As citocinas TNF- α e IL-6 foram obtidas do sobrenadante do colostro das fêmeas bovinas e no soro sanguíneo de seus respectivos produtos. O princípio do ELISA baseou-se na presença de um anticorpo monoclonal anti IL-6 e anti TNF- α distribuídos nos poços das placas. As citocinas presentes na amostra ou no padrão se ligam aos anticorpos adsorvidos nos poços. A biotina conjugada (anticorpo monoclonal anti-citocina) se ligou à citocina capturada pelo primeiro anticorpo. A estreptavidina-HRP se ligou a biotina conjugada anti-citocina. Após três horas de incubação a biotina e a estreptavidina-HRP foram removidas durante a etapa de lavagem e a solução substrato reativa HRP adicionada aos poços. Uma reação colorimétrica foi formada com a intensidade relacionada à concentração de citocina presente na amostra estudada. A reação foi finalizada com a adição de uma solução de parada (Ácido fosfórico 1M). A absorvância foi lida em 450nm. Uma curva padrão foi preparada a partir de sete diluições padrões

⁸ Image Quant TL GE healthcare, versão 7, Buckinghamshire-U.K

⁹ Sigma, St Louis, MO, USA

¹⁰ GE HealthCare, Buckinghamshire, U.K.

e a concentração das citocinas presentes determinada, com os resultados em pg/mL.

No presente estudo, tanto para as amostras de soro sanguíneo como para o sobrenadante da secreção láctea, foram adotadas as concentrações mínimas estabelecidas pelo fabricante quando os valores se mostravam negativos (BREEN et al., 2011)

Para a determinação das citocinas utilizou-se o leitor computadorizado¹¹ e um software para a mensuração das concentrações das amostras avaliadas¹².

3.13 Análise estatística

Os dados foram testados quanto à normalidade e à homogeneidade de variâncias, pré-requisitos necessários para a análise de variância. As variáveis foram submetidas à análise de variância, com medidas repetidas, sendo as médias comparadas por meio do teste de Tukey no nível de significância de 5%. Os valores de ceruloplasmina e células somáticas foram transformados em log e posteriormente submetidos aos testes estatísticos supracitados. As variáveis IL-6 e TNF- α foram analisadas usando o teste de Kruskal-Wallis para comparar os grupos em cada momento e o teste de Friedman para comparar os momentos em cada grupo, seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas.

Empregou-se o teste de correlação de Spearman entre as variáveis estudadas, considerando-se significativo os resultados quando $p < 0,05$ ou $p < 0,01$. Para variável categórica, CMT, utilizou-se o teste de Mean-Whitney. Para as demais variáveis categóricas associadas à glândula mamária (tamanho, consistência, temperatura e cor) e à secreção colostrálica (cor, viscosidade, opacidade e consistência) foram utilizados o teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher para verificar a associação entre grupos e variáveis estudadas.

Análises estatísticas foram efetuadas empregando-se o programa SAS (Statistical Analysis System). (ZAR, 1999).

¹¹Spectra Count, Packard, Missouri City, USA

¹²GraphPad PRISM, La Jolla, CA92037 USA

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação física do úbere, características macroscópicas e laboratoriais de secreções colostrais oriundas de vacas saudáveis e com mastite assintomática e clínica.

4.1.1 Características físicas do úbere e macroscópicas de secreções lácteas

As características físicas da glândula mamária estudadas foram escolhidas em virtude de algumas alterações estarem presentes na maioria dos animais com mastite em plena lactação. Contudo, nem todos os animais puderam ser avaliados. Um total de cinco animais (um do GI, dois do GII e dois do GIV) apresentaram hipocalcemia pós-parto impedindo o exame físico na glândula mamária; no entanto, a colheita das amostras de colostro foi realizada em todos os animais. As 36 glândulas avaliadas nos animais do grupo controle (GI) apresentaram, quase em sua totalidade, resultados de normalidade às avaliações física e organoléptica do colostro e leite. Observou-se, logo após a parição, variabilidade das características físicas dos quartos mamários nas vacas pluríparas (GII). Dos 32 quartos avaliados, 11 (34,3%) estavam com tamanho normal ao exame físico, e três apresentavam-se firmes à palpação (9,37%). Porém, das 40 secreções avaliadas, 10 não apresentavam a coloração característica (amarelada). Quatro (10%) apresentavam-se acastanhada, quatro (10%) com coloração esbranquiçada e duas (5%) com coloração avermelhada, porém sem a presença de grumos, pús ou estrias de sangue.

Constatou-se, também, variabilidade das características físicas dos quartos mamários nos animais portadores de mastite assintomática (GIII). Dos 40 quartos avaliados, 14 (35%) mostravam-se firmes à palpação, contudo, sem nódulos em seu parênquima, sendo que 12 (30%) quartos mamários possuíam tamanho

normal e três (7,5%) apresentavam-se pequenos. Entretanto, também não foram constatados grumos, pús ou estrias de sangue na secreção colostrar, indicando, pela ausência de alterações macroscópicas, que esses animais efetivamente não apresentavam mastite clínica. Tal certeza foi corroborada pelo elevado número de células somáticas nas amostras de secreção colostrar de animais portadores de mastite assintomática em relação àquelas do grupo controle, com concomitante crescimento microbiano. Estes dados foram cruciais para confirmação do diagnóstico diferencial.

As alterações da glândula mamária também foram evidentes nos animais possuidores de mastite clínica (GIV), já que dos 32 quartos avaliados 12 (37,5%) apresentaram consistência firme no momento do parto. A temperatura cutânea encontrava-se elevada em três (9,37%) quartos mamários avaliados, possivelmente em decorrência do processo inflamatório.

As glândulas de animais acometidos por mastite clínica e assintomática possuíam maior ecogenicidade no parênquima mamário quando comparadas com aquelas de animais com glândulas consideradas sadias. Franz et al. (2009) relataram que animais com mastite apresentam tais características devido ao aumento da celularidade do leite. Na tabela 1 observa-se que os animais do GIII e GIV apresentam CCS superior aos animais sadios.

Segundo Maunsell et al. (1999), secreções colostrais com a presença de grumos e/ou sanguinolenta são achados característicos de processo inflamatório. 15 amostras de colostro dos animais do GIV apresentaram alterações macroscópicas. Verificou-se a presença de grumos em 10 amostras. Contudo, a presença de estrias de sangue foi verificada em somente duas amostras, com coloração acastanhada e não hemorrágica, contrariando, em parte, as afirmações dos autores supracitados. Três secreções possuíam grande quantidade de pús no momento do parto. Somente uma glândula do GIV demonstrou secreção colostrar avermelhada, sem ocorrência de grumos, pús e estrias de sangue, no teste da caneca de fundo escuro. A ordenha de leite com coloração avermelhada (sanguinolenta) pode ser considerada como fisiológica nos primeiros 10 dias de lactação (GRUNERT, 1993).

Nenhuma característica física diferiu marcadamente entre os grupos estudados. Em nenhum animal do GIV foi observada a presença de grumos em todos os quartos, confirmando que o processo inflamatório estava restrito a somente a um único quarto mamário. O mesmo foi observado por Maunsell et al. (1998). No presente estudo a presença de grumos, pús ou estrias de sangue no colostro estava associada à presença de mastite no momento do parto ($p < 0,0001$).

4.1.2 Determinação de células somáticas e CMT

A determinação da CCS no leite é método convencional e amplamente usado para o diagnóstico da mastite assintomática em regiões de pecuária leiteira desenvolvida. É também o parâmetro mais empregado para a avaliação da qualidade higiênica do leite (HEESCHEN; REICHMUTH, 1995). A elevada celularidade resulta em prejuízos para a cadeia leiteira, visto que a qualidade do leite e de seus derivados se tornam extremamente comprometidas (KITCHEN, 1981). A CCS é influenciada por vários fatores, mas especialmente pela presença de inflamação da glândula mamária. Outros fatores que podem interferir são a época do ano, a raça, o estágio de lactação, o número de ordenhas, a produção de leite e o manejo alimentar (OSTRENSKY, 1999; VIANA, 2000). Raimondo et al. (2006) observaram valores médios de células somática no colostro de vacas da raça Jersey logo após o parto de 946.444 células/mL. Schutz et al. (1990), trabalhando com vacas da raça Holandesa, Guernsey e Jersey, constataram maiores valores para o início e final da lactação. Fagan et al. (2008) verificaram aumento na CCS no final da lactação devido à diminuição da produção leiteira e ao aumento da descamação do tecido epitelial. Maunsell et al. (1998) reportaram valores médios de CCS para animais saudáveis no pós-parto de 891.000 células/mL. Ressalta-se, porém, que elevadas contagens de CCS no pós-parto imediato, não necessariamente, devem caracterizar a ocorrência de mastite, pois além da CCS, o isolamento microbiano, acompanhado das alterações físicas da glândula e macroscópicas do leite, dever-se-ão sempre ser levados em consideração.

Contudo, ainda existe grande controvérsia a respeito da CCS em diferentes estágios da lactação. A definição de “não doente” ou “não infectado” em relação à CCS tem apresentado valores discrepantes, que variam desde cerca de 100.000 até 500.000 células/mL para animais em plena lactação (CASURA, 1985). Os resultados encontram-se descritos na Tabela 1.

Tabela 1- Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (S) da contagem de células somáticas (CCS x 10³/mL) em amostras de colostro e leite de vacas primíparas saudáveis (GI, n=10), vacas pluríparas saudáveis (GII=10), vacas com mastite assintomática (GIII, n=10) e vacas com mastite clínica (GIV, n=10), imediatamente após o parto (0), as 24 e às 48 horas após o referido evento. Araçatuba-SP, 2013.

Grupo	CCS ($\bar{x} \pm S$)		
	0 h	24 h	48 h
GI	992,29 ± 927,00 Ab	550,00 ± 669,58 Bb	362,96 ± 506,47 Bc
GII	1290,63±1449,61 Ab	1164,06±2137,18 Ab	1212,50±2281,96 Ab
GIII	2735,95 ± 1677,75 Aa	1681,94 ± 1159,83 Ba	1407,81± 1149,47 Bb
GIV	3378,63 ± 2856,93 Aa	2003,13 ± 1235,39 Aa	1808,93 ± 884,11 Aa

Médias seguidas de letras distintas, maiúscula na linha e minúscula na coluna, diferem entre si ($p < 0,05$)

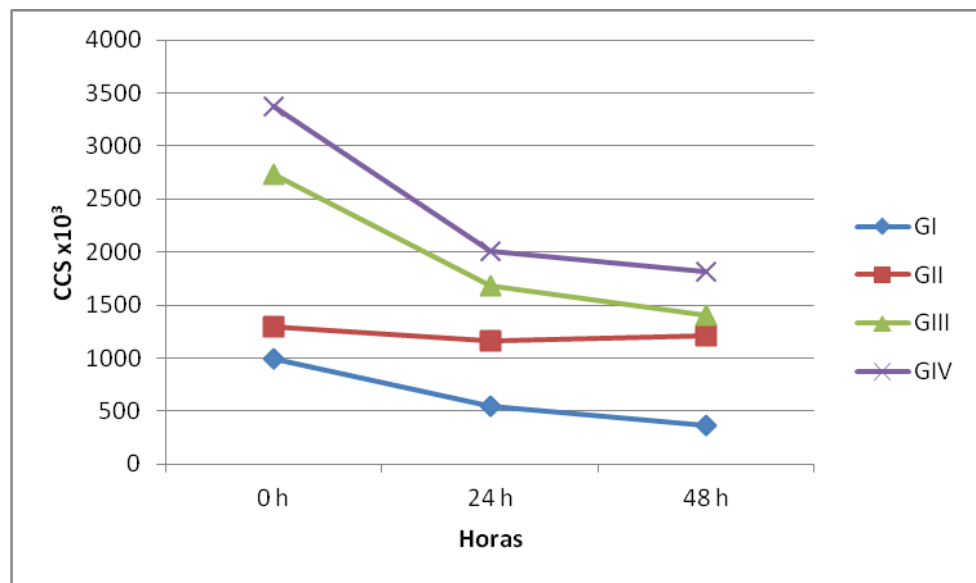


GRÁFICO 1 - Representação gráfica dos valores médios da CCS no colostro e leite de vacas primíparas saudáveis (GI), vacas pluríparas saudáveis (GII), vacas com mastite assintomática (GIII), e vacas com mastite clínica (GIV), imediatamente após o parto (0), às 24 e às 48 horas após o referido evento. Araçatuba-SP, 2013.

A contagem de células somáticas no momento do parto é alta em virtude da presença de inúmeras células de defesa (GODDEN, 2008). Observaram-se concentrações de células somáticas elevadas em todas as amostras obtidas no pós-parto imediato (Tabela 1). Os animais do GI e GII não apresentaram isolamento microbiano e nem alterações físicas significativas no úbere e na secreção láctea no momento do parto. Portanto, a elevada celularidade das amostras oriundas dessas vacas não serviram como indicadoras de processo inflamatório e/ou infeccioso do parênquima glandular nessa fase de lactação. Diferença significativa entre a CCS dos animais acometidos por mastite (GIII e GIV) dos animais sadios (GI e GII) (Tabela 1) foi identificada. Denotou-se, também, diminuição gradativa dos valores médios ao longo das 48 horas pós-parto. Somente nos Grupos I e III constatou-se diferença entre os momentos estudados, fato não verificado nos valores obtidos dos animais do Grupo II e IV (Tabela 1 e Gráfico 1).

Os resultados de CCS obtidos no pós-parto imediato dos animais com mastite clínica, por serem menores, diferem dos observados por Maunsell et al. (1998), que verificaram média de $4413 \times 10^3/\text{mL}$ em animais da raça Holandesa que pariram com mastite sintomática. Entretanto, Ferdowski Nia et al. (2010), avaliando 69 vacas holandesas que apresentaram mastite no momento do parto, observaram variação no número de células somáticas entre $960 - 5051 \times 10^3$ células/mL de leite. Esses autores constataram que essa diferença de valores era devida às variadas intensidades de mastite que esses animais apresentavam no momento do parto. Segundo Kitchen (1981), dependendo da severidade, da extensão, da infecção e do tipo de microrganismo, a CCS pode apresentar uma ampla variação. Contudo, os valores médios observados no presente estudo, para animais que pariram com mastite clínica e assintomática, estavam dentro da faixa de valores descritos por esses pesquisadores.

A identificação dos animais com mastite assintomática em plena lactação é realizada invariavelmente por meio do CMT, CCS e isolamento microbiológico. Foram realizados os testes da caneca de fundo escuro e do CMT das secreções lácteas obtidas logo após a parição. A realização do CMT no pós-parto imediato é, na maioria das vezes, considerada como positiva (SCHALM et al., 1971). Esse teste apresenta, entretanto, o inconveniente da subjetividade, sujeito a produzir resultados falso-positivos e falso-negativos.

Diferentemente dos animais com mastite clínica, a mastite assintomática não se caracteriza pela presença de grumos na secreção láctea. Segundo Maunsell et al. (1999), o CMT é arma útil para a identificação da mastite nos animais recém-paridos. Deve-se atentar, contudo, que outras características colostrais, tais como a presença de estrias de sangue, pús ou grumos na secreção láctea, também devem ser associadas à ocorrência de mastite no período em questão. Birgel (2004) relatou que apesar das inúmeras particularidades entre o número de células somáticas e os diferentes estágios de lactação, não há dúvidas que os resultados positivos no CMT são, em sua maioria, oriundos de mastite.

Com o passar do tempo, a intensidade da reação diminuiu gradativamente. Segundo Godden (2008), há diminuição das células liberadas pela secreção

lática com o passar das horas pós-parto, fato que elucida a diminuição gradativa da intensidade das reações. Nos animais que pariram com mastite clínica, os quartos anteriores receberam maior número de resultados considerados como nitidamente e fortemente positivos (53,84%). Porém, o fato inverso foi observado nos animais que pariram com mastite assintomática (60%).

O teste do CMT foi feito em 40 glândulas de vacas primíparas logo após a parição. Dentre estas, 20 glândulas receberam resultado levemente positivo (+), representando a pontuação mais obtida nos animais desse grupo. Contudo, em virtude da elevada concentração de células de defesa, 14 glândulas apresentaram reações fortemente positivas (+++), tornando-se o segundo resultado mais observado.

Da mesma forma, 40 glândulas dos animais do GII foram analisadas logo após o parto. Destas, 14 quartos mamários foram classificados como levemente positivos (+). Secreções oriundas de 15 glândulas receberam o resultado negativo (0) no momento do parto. Porém, cinco secreções possuíam reações fortemente positivas (+++) e seis nitidamente positiva (++)

Houve equilíbrio dos valores do CMT das secreções lácteas de vacas com mastite assintomática obtidas no momento do parto. Constatou-se o escore de três cruces em 12 (30%) amostras e de duas cruces em outras 10 (25%) amostras, das 40 secreções avaliadas. Dessa forma, ao menos uma glândula de cada animal apresentava, no momento do parto, escore de CMT de duas ou três cruces. Menos da metade das amostras (45%), no entanto, mostrava-se negativa ao teste ou fracamente positiva (+). De 40 glândulas de animais com mastite sintomática avaliadas no momento do parto, 21 tinham escore de três cruces e cinco de duas cruces, representando, tais resultados, 65% do total de amostras avaliadas.

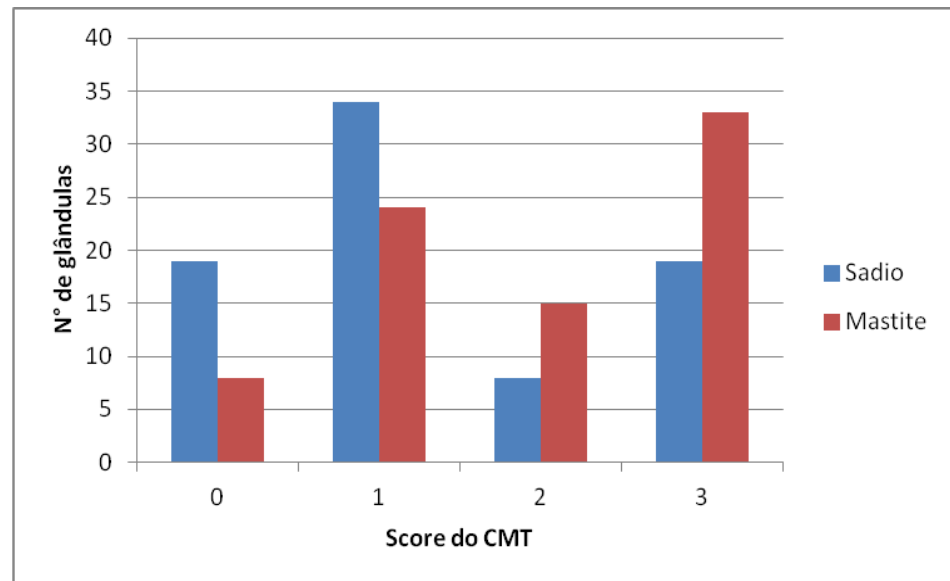


GRÁFICO 2 - Representação gráfica dos escores do CMT, em amostras de colostro de vacas primíparas e pluríparas saudáveis (Sadio) e vacas com mastite assintomática e clínica (Mastite), imediatamente após o parto. Araçatuba-SP, 2013.

Os resultados obtidos nessa pesquisa diferem dos dados de Raimondo et al. (2006). Esses autores observaram maior número de reações negativas ao CMT em animais sadios da raça Jersey, no momento do parto. No presente estudo, os animais sadios receberam como resultado mais comum o escore fracamente positivo (+) e aqueles com mastite fortemente positivo (+++). Talvez essa diferença seja devido aos diferentes tipos de manejo e de raças estudados. Outro fator se deve, possivelmente, ao fato que o referido autor não utilizou amostras de colostro com isolamento microbiológico positivo, diferentemente do presente estudo.

Houve diferença significativa entre os resultados de CMT ($p=0,0016$) para amostras de glândulas mamárias de animais sadios e acometidos por mastite assintomática e clínica. Os valores referentes às amostras obtidas dos animais com mastite, à primeira ordenha, estão de acordo com os resultados obtidos por Maunsell et al. (1999). Segundo esses pesquisadores, o CMT é parte importante de um conjunto de artifícios utilizados para o diagnóstico da mastite em secreções colostrais. Esses autores concluíram que escore de CMT ≥ 2 (++)

ou +++)) no pós-parto imediato é característico de secreção oriunda de animais com mastite. No presente estudo, 33 secreções oriundas de animais com mastite (GIII e GIV) apresentaram o escore +++ e outras 15, o escore ++, o que representa cerca de 60% do total de amostras avaliadas.

4.1.3 Exame microbiológico das secreções lácteas

O manejo correto na secagem dos animais é fundamental para o início da lactação sem transtornos. Nessa fase, as defesas celulares da glândula mamária estão diminuídas, deixando o animal à mercê de patógenos ambientais. Além da diminuição da atividade fagocítica de inúmeros componentes celulares, a produção do colostro aumenta a pressão intra-mamária dilatando o canal do teto. Há, conseqüentemente, gotejamento da secreção colostrálica e a liberação da camada de queratina, deixando o canal do teto aberto para a entrada de agentes patogênicos (SORDILLO; STREICHER, 2002).

Devido à grande variabilidade de microrganismo que podem causar mastite, é essencial para o diagnóstico seguro e correto que todas as amostras submetidas para exame laboratorial sejam colhidas assepticamente e em frascos estéreis. Todos os requisitos de higiene e conservação para obtenção e armazenamento das amostras, que foram enviadas ao exame microbiológico para impedir o crescimento de contaminantes, foram adotados no presente estudo. Houve o crescimento microbiano em somente quartos mamários dos animais que apresentaram mastite assintomática e sintomática no momento do parto. Amostras lácteas oriundas dos animais do GI e GII não evidenciaram isolamento microbiológico. Como discutido anteriormente, esses animais possuíam maiores valores de células somáticas do que os animais saudáveis, logo após a parição, corroborando com a afirmação de que o isolamento microbiano causa aumento da CCS (FERDOWSKI NIA et al., 2010; OSTRENSKY, 1999; SORDILLO; STREICHER, 2002).

Geralmente as infecções no período seco resultam em casos de mastite sintomática no período pós-parto (OLIVER; SORDILLO, 1988). Constatou-se, no

presente estudo, 41 quartos mamários (25,62%) com crescimento microbiano. Portanto, é possível que essas espécies tenham infectado a glândula mamária desses animais durante o referido período.

Tabela 2- Número (N^o), porcentagem (%) e identificação microbiológica em amostras de colostro obtidas de 20 vacas holandesas com mastite assintomática e clínica. Araçatuba-SP, 2013.

Classificação Mastite	Grupo	N ^o amostras	Glândulas infectadas (N ^o e %)	Identificação (N ^o)
Assintomática	III	40	28 (70%)	<i>Streptococcus</i> sp. (16) <i>Staphylococcus intermedius</i> (04) <i>Staphylococcus</i> sp. (03) <i>Mannheimia haemolytica</i> (02) <i>Staphylococcus aureus</i> (01) <i>Trueperella</i> sp. (01) <i>Bacilos Gram –</i> (01)
Clínica	IV	40	13 (32,5%)	<i>Streptococcus</i> sp. (05) <i>Staphylococcus intermedius</i> (04) <i>Staphylococcus</i> sp. (02) <i>Staphylococcus aureus</i> (01) <i>Bacilos cereus</i> (01)

Ocorreu isolamento majoritário de *Streptococcus* sp. em animais que pariram com mastite assintomática quando comparado com aqueles que pariram com mastite clínica; porém, estes não apresentaram anormalidades no exame macroscópico da secreção colostrálica. No GIV houve o isolamento majoritário de *Staphylococcus* sp.

Das 40 amostras obtidas de glândulas mamárias de vacas que pariram com mastite assintomática, constatou-se o crescimento de *Streptococcus* sp. em 57,14%, e de *S. intermedius* em 14,28% delas. Apesar do isolamento de um maior número de agentes nas glândulas mamárias dos animais do GIII, não se verificaram grandes alterações no exame físico da mama nem macroscópicas no colostro avaliado. Além do mais, esse maior número de agentes não proporcionou valor médio de células somáticas superiores aos animais com mastite sintomática. Porém, a elevada CCS e um maior número de reações nitidamente e fortemente

positivas ao teste do CMT, foram preditoras da presença de processo inflamatório não observado à inspeção.

Em 40 secreções do GIV avaliadas, somente 13 apresentaram cultivo microbiológico positivo. O *Staphylococcus* sp. foi isolado em 53,84% (7 glândulas), sendo que o *S.intermedius* foi o agente mais comum (4 glândulas). Um total de 15 glândulas dos animais do GIV apresentaram grumos, pús ou estrias de sangue no colostro, porém em duas amostras não houve isolamento microbiano.

Os resultados acima concordam da literatura compulsada. Fecteau et al. (2002) os quais, analisando 234 amostras de colostro, obtiveram isolamento majoritário de *Staphylococcus* sp. Segundo Oliver e Sordillo (1988), o *Staphylococcus* sp. são os agentes patógenos mais frequentes nas mastites de bovinos que ocorrem no período seco. Maunsell et al. (1998) em seu estudo observaram isolamento majoritário de *S. hyiucus* em animais que pariram com sinais de mastite clínica. No que tange aos animais do grupo com mastite assintomática, os resultados obtidos concordam com Urech et al. (1999) que afirmam ser o *Streptococcus* sp. um dos principais agentes causadores de mastite assintomática.

Do total de glândulas avaliadas, dois animais apresentaram o isolamento de mais de um agente etiológico. Em um animal do GIII foram isolados *Streptococcus* sp. e *Staphylococcus intermedius*, e em outro, pertencente ao GIV, foram isolados *Streptococcus* sp. e *Staphylococcus* sp.

4.2 Proteinograma das secreções lácteas

O eletroforetograma das proteínas do soro lácteo permitiu a identificação de até 14 frações proteicas. Desse total, seis foram consideradas de interesse e tiveram suas concentrações mensuradas, a saber: imunoglobulina A, lactoferrina, albumina de origem plasmática, imunoglobulina G total, β -lactoglobulina e α -lactoalbumina

4.2.1 Proteína total do soro lácteo

Verificaram-se maiores concentrações de proteína total do soro lácteo de vacas acometidas por mastite clínica quando comparado aos animais saudáveis no dia do parto. Os dados aqui apresentados concordam com Sant'ana (2004). O aumento da proteína total do soro lácteo ocorre devido à intensa transudação de moléculas oriundas do plasma para o interior da glândula mamária inflamada, devido ao aumento da permeabilidade vascular local (KITCHEN, 1981).

Sant'ana (2004) não verificou diferença significativa nos teores de proteína total do soro lácteo em animais com diferentes números de lactação. O mesmo foi observado no presente estudo. Ocorreu redução gradual na concentração de proteína total do soro lácteo ao longo do período experimental. Porém, Rocha (2010) verificou valores significativamente inferiores de proteína no soro lácteo de secreções colostrais de vacas primíparas em relação às pluríparas, diferindo do presente estudo.

Segundo Smith et al. (1985), vacas primíparas apresentam celularidade menor na secreção colostrar quando comparadas às fêmeas pluríparas. Possivelmente, vacas velhas apresentam maior número de ordenhas e, conseqüentemente, maior exposição aos patógenos do meio ambiente do que animais de primeira cria.

Tabela 3- Valores médios (\bar{x}) e desvio-padrão (S) do teor de proteína total (g/dL) em amostras de colostro e leite de vacas primíparas saudáveis (GI, n=10), vacas pluríparas saudáveis (GII=10), vacas com mastite assintomática (GIII, n=10) e vacas com mastite clínica (GIV, n=10), imediatamente após o parto (0), as 24 e às 48 horas após o referido evento. Araçatuba-SP, 2013.

Grupo	Proteína Total ($\bar{x} \pm S$)		
	0 h	24 h	48 h
GI	15,30 \pm 2,27 Ab	7,98 \pm 4,31 B	6,46 \pm 7,17 B
GII	15,30 \pm 3,77 Ab	6,66 \pm 4,65 B	2,05 \pm 0,96 B
GIII	17,16 \pm 1,11 Aab	4,64 \pm 2,25 B	2,56 \pm 0,63 B
GIV	20,43 \pm 1,43 Aa	6,16 \pm 3,16 B	2,20 \pm 0,65 B

Médias seguidas de letras distintas, maiúscula na linha e minúscula na coluna, diferem entre si ($p < 0,05$)

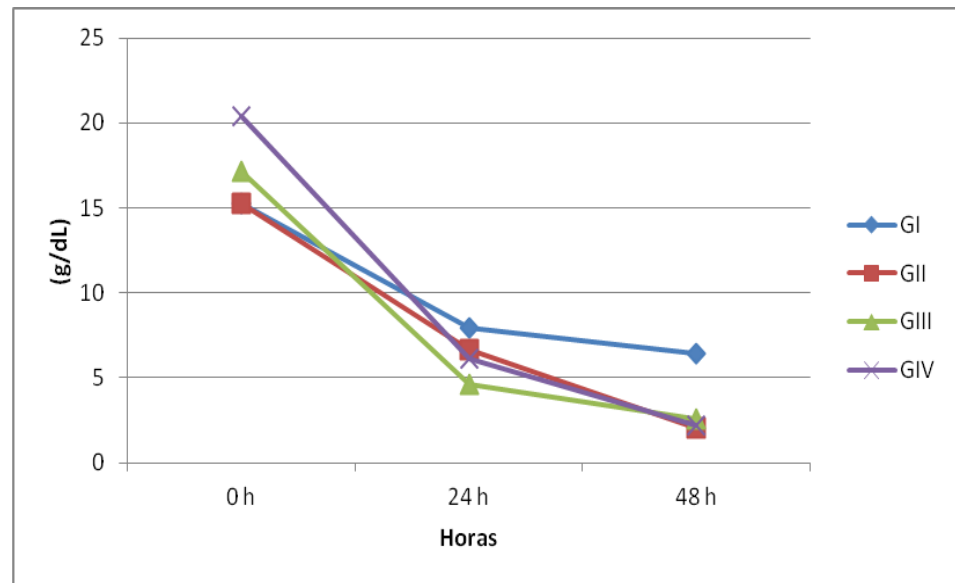


GRÁFICO 3 - Representação gráfica do teor de proteína total (mg/dL) no soro lácteo de vacas primíparas saudáveis (GI), vacas pluríparas saudáveis (GII), vacas com mastite assintomática (GIII) e vacas com mastite clínica (GIV), imediatamente após o parto (0), às 24 e às 48 horas após o referido evento. Araçatuba-SP, 2013.

4.2.2 Teor de imunoglobulina A (IgA) no soro lácteo

Não foi observada diferença significativa entre os grupos quanto aos teores de IgA no soro lácteo. Suas concentrações foram significativamente maiores no momento do parto e, com a evolução do tempo, houve redução gradual até o segundo dia de avaliação. O mesmo comportamento foi observado por Rocha (2010), não se verificando diferença em relação ao número de partições das vacas.

A IgA é produzida pelos plasmócitos da glândula mamária e transmitida, pelo colostro, para o neonato. É a principal imunoglobulina no colostro das diferentes espécies de mamíferos, exceto nos ruminantes, onde representa, aproximadamente, 5% das imunoglobulinas (Larson et al., 1980). Kehoe et al. (2007) observaram valores de 166mg/dL nos teores de IgA no colostro de vacas

holandesas por meio da técnica de imunodifusão radial. Rocha (2010), utilizando a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, obteve valores semelhantes aos encontrados no presente estudo.

Tabela 4- Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (S) do teor de imunoglobulina A (mg/dL) em amostras de colostro e leite de vacas primíparas saudáveis (GI, n=10), vacas pluríparas saudáveis (GII=10), vacas com mastite assintomática (GIII, n=10) e vacas com mastite clínica (GIV, n=10), imediatamente após o parto (0), às 24 e às 48 horas após o referido evento. Araçatuba-SP, 2013.

Grupo	IgA ($\bar{x} \pm S$)		
	0 h	24 h	48 h
GI	661,68±132,97 A	318,13±207,75 B	52,26±27,74 C
GII	700,84±105,90 A	152,64±80,22 B	31,81±15,22 C
GIII	537,03±126,16 A	113,21±46,88 B	37,36±9,56 C
GIV	550,49±195,22 A	227,42±154,36 B	44,59±19,51 C

Médias seguidas de letras distintas, na linha, diferem entre si ($p < 0,05$)

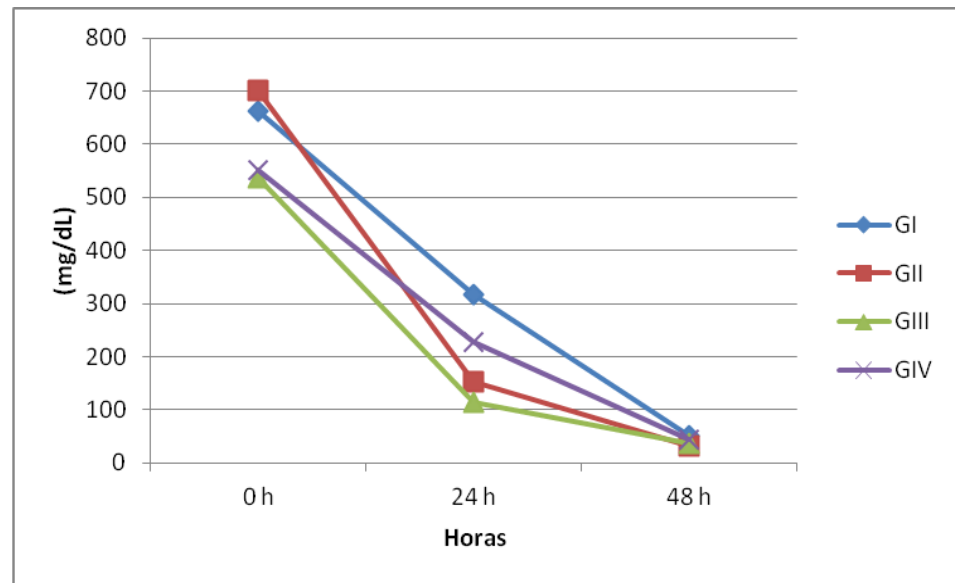


GRÁFICO 4 - Representação gráfica do teor de imunoglobulina A (mg/dL) no soro lácteo de vacas primíparas saudáveis (GI), vacas pluríparas saudáveis (GII), vacas com mastite assintomática (GIII) e vacas com mastite clínica (GIV), imediatamente após o parto (0), às 24 e às 48 horas após o referido evento. Araçatuba-SP, 2013.

4.2.3 Teor de lactoferrina (LF) no soro lácteo

Constatou-se redução gradual dos teores de LF ao longo do período experimental. As secreções colostrais dos animais do GIV apresentaram, após a parição, concentrações de LF mais elevadas. Sant'ana (2004) observou a mesma tendência em seus resultados, porém, não verificou diferença significativa entre secreções de animais sadios e com isolamento microbiano.

A presença de infecção intramamária causa aumento nos teores de LF no leite. Grande parte das células somáticas, normalmente aumentada nessa situação, é composta pelos neutrófilos produtores da LF (SANT'ANA, 2004; TSUJI et al., 1990). Kawai et al. 1999, constataram maior valor da LF em leite de animais com mastite assintomática e sintomática em relação aos animais sadios, tendo sido a presença de microrganismo fator preponderal para tal achado. No presente

estudo observou-se aumento da LF somente em animais do GIV. Esses, por sua vez, também possuíam valores elevados de CCS quando comparados aos animais sadios. Porém, a LF do colostro dos animais do GIII não diferiu significativamente da dos Grupos GI e GII.

Corroborando os achados de Tsuji et al. (1990), obteve-se correlação positiva entre os valores de LF e de células somáticas entre os grupos estudados ($p < 0,05$; $r = 0,44$), confirmando que cerca de 90% das células somáticas observadas em secreções mamíferas são constituídas por neutrófilos (SORDILLO; STREICHER, 2002).

O teor de LF colostrado no GI e GII foi superior ao encontrado por Sant'ana (2004) no colostro de vacas da raça Jersey e Gir ($67,62 \pm 35,80$ mg/dL). Esse mesmo autor observou valores de LF em secreções lácteas mamíferas ($121,43 \pm 97,28$ mg/dL), consideravelmente diferentes dos resultados apresentados no presente estudo. Contudo, o mesmo autor observou tal valor em animais em que apresentaram mastite em plena lactação. Tsuji et al. (1990) estudando colostro de vacas da raça holandesa verificaram valores inferiores aos encontrados no presente estudo (196 ± 27 mg/dL) obtidos por meio do teste de imunodifusão radial. Essa discrepância de valores pode ter ocorrido em virtude das diferentes raças e técnicas laboratoriais utilizadas.

A LF é uma glicoproteína produzida pelos neutrófilos (ARNOLD et al., 1980). Desempenha importante papel na defesa tanto na glândula mamária dos animais em lactação como da mucosa intestinal contra infecções (CHENG et al., 2008; ROBBLEE et al., 2003). Sua função é de quelar o ferro, um dos principais substratos para o crescimento microbiano, atuando, assim, de forma bacteriostática (ARNOLD et al., 1980). Outras possíveis ações dessa proteína estão vinculadas ao aumento da permeabilidade da parede bacteriana aos antibióticos e à ligação à membrana externa das bactérias Gram-negativas, causando rápida liberação da lipossacaridases e aumento na permeabilidade da membrana (ARNOLD et al., 1977).

Tabela 5- Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (S) do teor de lactoferrina (mg/dL) em amostras de colostro e leite de vacas primíparas saudáveis (GI, n=10), vacas pluríparas saudáveis (GII=10), vacas com mastite assintomática (GIII, n=10) e vacas com mastite clínica (GIV, n=10), imediatamente após o parto (0), às 24 e às 48 horas após o referido evento. Araçatuba-SP, 2013.

Grupo	Lactoferrina ($\bar{x} \pm S$)		
	0 h	24 h	48 h
GI	870,66±66,32 Ab	457,85±212,95 Ba	56,28±30,54 Ca
GII	903,15±189,16 Ab	311,12±163,51 Ba	95,04±45,47 Ca
GIII	942,50±155,70 Ab	257,39±83,34 Ba	109,40±56,10 Ca
GIV	1413,71±357,24 Aa	420,99±215,18 Ba	131,45±47,69 Ca

Médias seguidas de letras distintas, maiúscula na linha e minúscula na coluna, diferem entre si ($p < 0,05$)

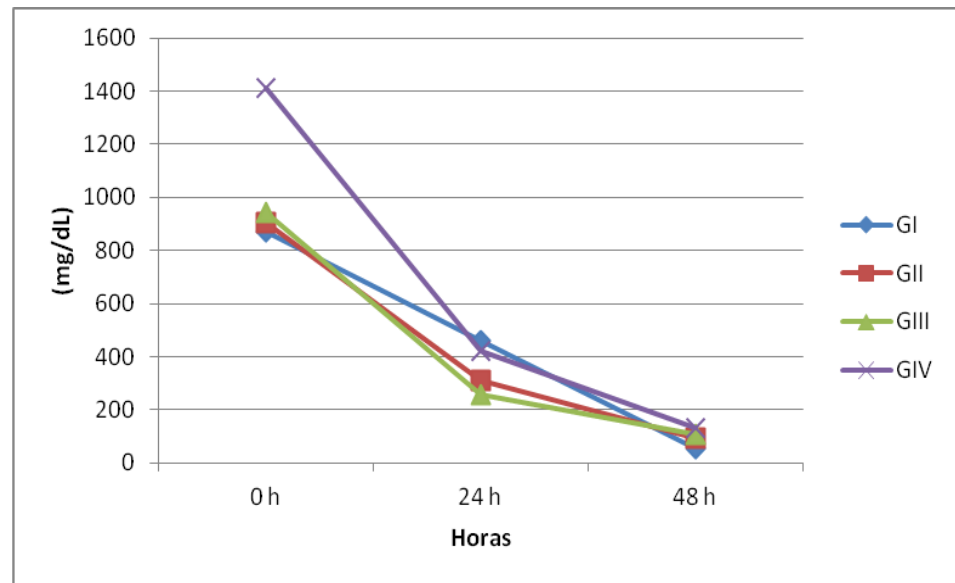


GRÁFICO 5 - Representação gráfica do teor de lactoferrina (mg/dL) no soro lácteo de vacas primíparas saudáveis (GI), vacas pluríparas saudáveis (GII), vacas com mastite assintomática (GIII) e vacas com mastite clínica (GIV), imediatamente após o parto (0), às 24 e às 48 horas após o referido evento. Araçatuba-SP, 2013.

4.2.4 Teor de albumina no soro lácteo

Não houve diferença significativa entre os momentos a partir do primeiro dia após o parto, com exceção do GI, às 24 horas, quando comparado às 48 horas. Com relação aos grupos, o GIV possuiu teores de albumina no soro lácteo superior aos demais grupos no dia do parto. Animais do GII seguiram a mesma tendência dos do GIII, às 24 horas. As amostras dos animais do GIV tinham valores intermediários e, o GI, superiores para o mesmo período. No segundo dia após o parto, não se verificou diferença significativa entre os grupos estudados.

Riolett et al. (2000), após a indução de mastite experimental em vacas holandesas saudáveis, observaram valores médios semelhantes aos encontrados (1040 ± 360 mg/dL). Segundo Bounous (2000), o aumento dessa fração proteica está intimamente ligado à presença do processo inflamatório na glândula

mamária, já que essa molécula participa da defesa do úbere, apresentando função antioxidante, por agir nos radicais livres oriundos do processo inflamatório. Portanto, existiria correlação direta entre a sua concentração e a CCS nas secreções mamíferas, fato observado nos grupos estudados ($p < 0,05$; $r = 0,41$).

A molécula de albumina encontrada no leite é a mesma do sangue (KANEKO, 2008). Sua concentração aumenta em algumas situações que a glândula mamária enfrenta, como por exemplo, durante a mastite assintomática e sintomática (RIOLLET et al., 2000).

Sant'ana (2004) observou elevados teores séricos de albumina nos animais com mastite sintomática quando comparado com os animais sadios. Esse mesmo autor, contudo, não percebeu diferenças significativas entre secreções lácteas de animais sadios e com isolamento microbiológico. As mesmas observações foram constatadas no presente estudo.

Tabela 6- Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (S) do teor de albumina (mg/dL) em amostras de colostro e leite de vacas primíparas saudáveis (GI, $n=10$), vacas pluríparas saudáveis (GII=10), vacas com mastite assintomática (GIII, $n=10$) e vacas com mastite clínica (GIV, $n=10$), imediatamente após o parto (0), às 24 e às 48 horas após o referido evento. Araçatuba-SP, 2013.

Grupo	Albumina ($\bar{x} \pm S$)		
	0 h	24 h	48 h
GI	456,37 \pm 318,49 Ab	529,18 \pm 284,25Aa	56,02 \pm 68,89 Ba
GII	560,09 \pm 121,59 Ab	151,51 \pm 79,63 Bb	36,52 \pm 17,50 Ba
GIII	646,17 \pm 210,34 Ab	158,08 \pm 122,99 Bb	61,05 \pm 56,40 Ba
GIV	1307,52 \pm 309,15Aa	369,63 \pm 253,49 Bab	100,53 \pm 44,42 Ba

Médias seguidas de letras distintas, maiúscula na linha e minúscula na coluna, diferem entre si ($p < 0,05$).

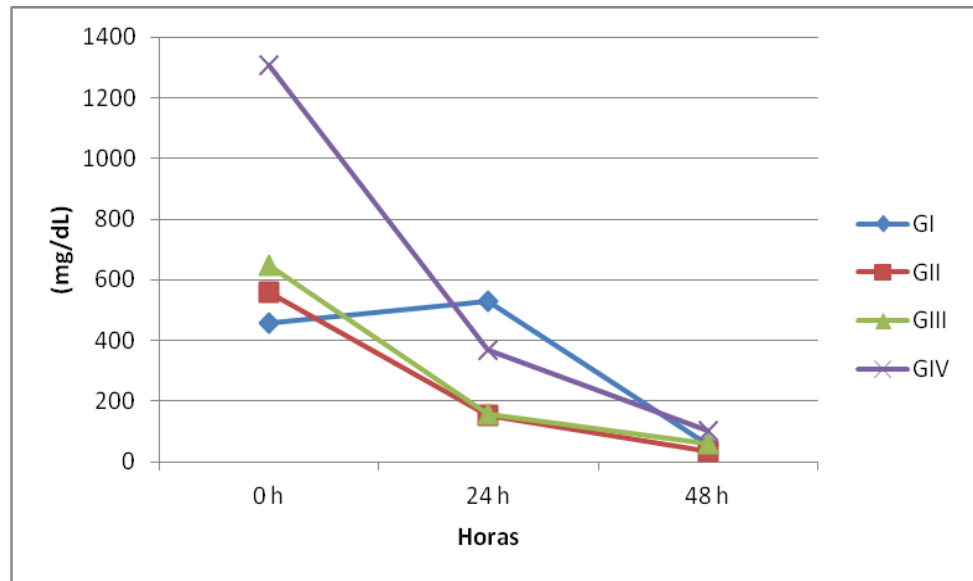


GRÁFICO 6 - Representação gráfica do teor de albumina (mg/dL) no soro lácteo de vacas primíparas saudáveis (GI), vacas pluríparas saudáveis (GII), vacas com mastite assintomática (GIII) e vacas com mastite clínica (GIV), imediatamente após o parto (0), às 24 e às 48 horas após o referido evento. Araçatuba-SP, 2013.

4.2.5 Teor de imunoglobulina G total no soro lácteo

O teor de imunoglobulina G total (IgG) no soro lácteo foi superior nos animais do GIV quando comparado aos demais grupos no momento do parto. Constataram-se maiores concentrações desta proteína à parição e redução gradativa até o segundo dia de lactação, em todos os grupos estudados. Segundo Godden (2008), animais com duas ou mais lactações apresentam maior concentração de IgG no colostro quando comparados aos de primeira lactação. Porém, no presente estudo não foram observadas diferenças entre os animais do GI e GII. Sant'ana (2004) verificou valores superiores de imunoglobulinas em animais de quatro ou mais lactações, valores intermediários em animais de

primeira lactação, e valores inferiores em animais de duas ou três lactações. Rocha (2010) não denotou diferença significativa entre animais de primeira cria com animais de duas crias ou mais.

A IgG é a porção mais representativa dos anticorpos presentes no colostro bovino, representando cerca de 85-90% do total de imunoglobulinas. Esse isótopo atravessa a barreira existente entre a glândula mamária e a corrente sanguínea, onde se origina, para incorporar-se ao colostro (LARSON et al., 1980). Essa imunoglobulina tem papel principal na transferência de imunidade passiva devido à sua ação de identificar e destruir os patógenos aos quais o neonato é exposto nos primeiros momentos de vida (TIZARD, 2008).

Sordillo et al. (1997) relataram maior produção dessas proteínas durante a mastite. Esses mesmos autores afirmaram que as elevadas concentrações dependiam da quantidade de células produtoras dessas moléculas na glândula mamária e do grau de permeabilidade da barreira do parênquima glandular. Sant'ana (2004) observou valores de imunoglobulinas superiores em animais com mastite sintomática quando comparado a animais sadios. Maunsell et al. (1998) não denotaram diferenças significativas entre os valores de animais com e sem infecção persistente na glândula mamária.

Vacas de alta produção podem produzir colostro com menor concentração de imunoglobulinas mesmo na primeira lactação (MAUNSELL, et al., 1998). O número de lactações, duração do período seco e a raça desses animais, influenciam tanto o volume quanto a concentração de imunoglobulinas no colostro (MAUNSELL et al., 1998; MULLER; ELLINGER, 1981). Outros fatores que podem causar a diminuição da concentração de imunoglobulinas no colostro são o gotejamento de colostro, antes e/ou durante o parto (PETRIE, 1984), atraso na primeira ordenha pós-parto (KRUSE, 1970), deficiência de selênio (SWEKER et al., 1995) e estresse calórico (NARDONE et al., 1997); entretanto, a grande variação da concentração de imunoglobulinas colostrais entre as vacas ainda continua permeada de dúvidas.

O teor de IgG total no soro lácteo das vacas no dia do parto correlacionou-se com o teor de proteína total no soro lácteo no dia do parto ($r=0,73$, $p<0,01$).

Tabela 7- Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (S) do teor de imunoglobulina G total (mg/dL) em amostras de colostro e leite de vacas primíparas saudáveis (GI, n=10), vacas pluríparas saudáveis (GII=10), vacas com mastite assintomática (GIII, n=10) e vacas com mastite clínica (GIV, n=10), imediatamente após o parto (0), às 24 e às 48 horas após o referido evento. Araçatuba-SP, 2013.

Grupo	IgG ($\bar{x} \pm S$)		
	0 h	24 h	48 h
GI	7530,18±1363,54Ab	3697,36±978,21 B	771,98±250,77 C
GII	8020,25±1210,22Ab	3014,90±1584,44 B	913,68±437,15 C
GIII	8668,18±976,28Aab	2483,99±985,58 B	1187,98±515,57 C
GIV	10193,11±619,50Aa	2885,56±1651,24 B	893,67±253,39 C

Médias seguidas de letras distintas, maiúscula na linha e minúscula na coluna, diferem entre si ($p < 0,05$).

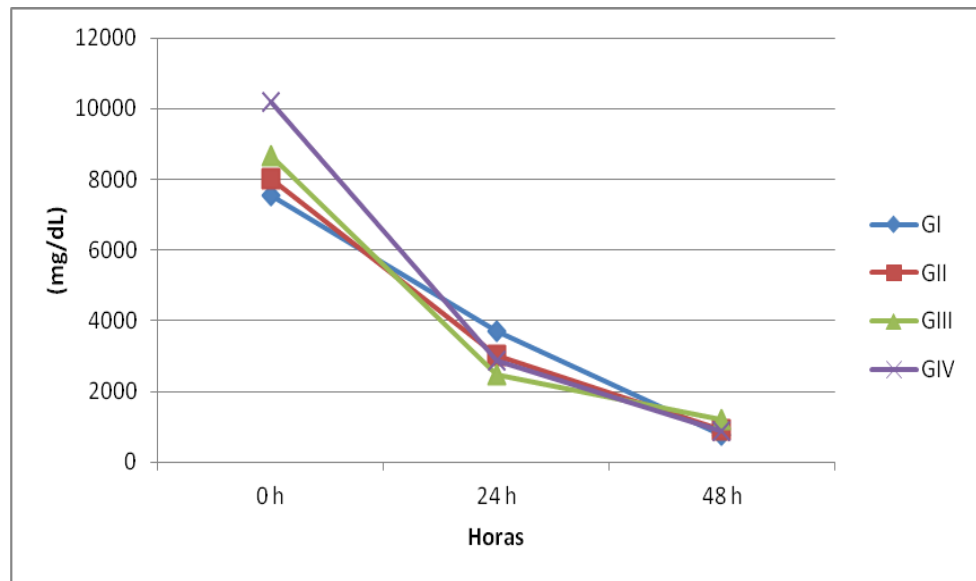


GRÁFICO 7 - Representação gráfica do teor de imunoglobulina G total (mg/dL) no soro lácteo de vacas primíparas saudáveis (GI), vacas pluríparas saudáveis (GII), vacas com mastite assintomática (GIII) e vacas com mastite clínica (GIV), imediatamente após o parto (0), às 24 e às 48 horas após o referido evento. Araçatuba-SP, 2013.

4.2.6 Teor de β -lactoglobulina no soro lácteo

Não se constatou diferença significativa entre os grupos no decorrer do período experimental. As maiores concentrações foram verificadas no dia do parto. A mesma tendência foi observada por Rocha (2010). Sant'ana (2004) não denotou diferença significativa entre animais com mastite sintomática e animais saudáveis. Porém, relatou maior elevação dessa proteína em animais de primeira cria quando comparados às vacas de quatro ou mais lactações.

O presente estudo mostrou que o isolamento de um agente microbiano em uma glândula sem sinais de processo inflamatório não é fundamental para alterar as variantes proteicas de origem glandular, tais como a β -lactoglobulina e α -lactoalbumina. O mesmo resultado foi corroborado por Sant'ana (2004). Porém, Randolph et al. (1974) e Boehmer et al. (2010), observaram declínio dessa fração

proteica na secreção láctea de animais com mastite experimental. Essa divergência de resultados pode ser explicada pelo método utilizado por esses autores e pelo microrganismo utilizado para a indução experimental do processo inflamatório na glândula mamária.

Rocha (2010) relatou concentrações de β -lactoglobulina superiores às apresentadas no presente estudo. Folch et al. (1999) relataram que essa proteína apresenta diferença proporcional e qualitativa nas diferentes raças de bovinos. A β -lactoglobulina é a proteína mais abundante no soro do leite maduro. Essa molécula é sintetizada exclusivamente na glândula mamária (MEZA-NIETO et al., 2007). Sua função ainda não está totalmente esclarecida, mas acredita-se que ela seja responsável por transmitir o retinol para o neonato (HOGARTH et al., 2004). Essa proteína apresenta duas variantes genéticas A e B (MEZA-NIETO et al., 2007). Segundo Rocha (2010), a técnica de eletroforese permite a separação de uma ou ambas variantes.

Tabela 8- Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (S) do teor de β -lactoglobulina (mg/dL) em amostras de colostro e leite de vacas primíparas saudáveis (GI, n=10), vacas pluríparas saudáveis (GII=10), vacas com mastite assintomática (GIII, n=10) e vacas com mastite clínica (GIV, n=10), imediatamente após o parto (0), às 24 e às 48 horas após o referido evento. Araçatuba-SP, 2013.

Grupo	β -lactoglobulina ($\bar{x} \pm S$)		
	0 h	24 h	48 h
GI	3603,87 \pm 1122,82 A	1683,48 \pm 728,65 B	824,14 \pm 266,53 B
GII	3422,20 \pm 514,60 A	1515,88 \pm 796,65 B	664,12 \pm 317,75 B
GIII	3312,79 \pm 1488,29 A	1191,36 \pm 774,34 B	670,29 \pm 184,20 B
GIV	3665,64 \pm 1734,14 A	1062,49 \pm 437,78 B	536,99 \pm 120,28 B

Médias seguidas de letras distintas, na linha, diferem entre si ($p < 0,05$)

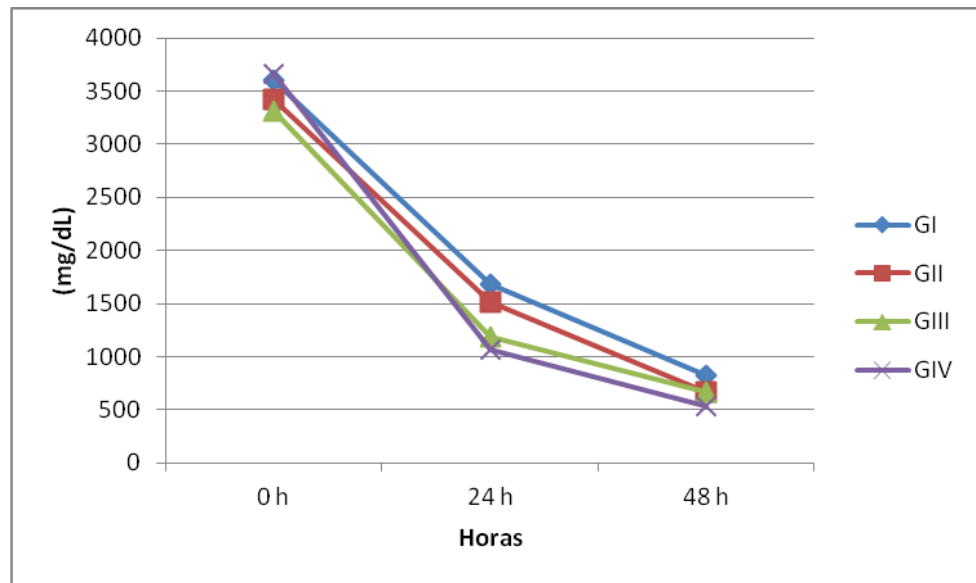


GRÁFICO 8 - Representação gráfica do teor de β -lactoglobulina (mg/dL) no soro lácteo de vacas primíparas saudáveis (GI), vacas pluríparas saudáveis (GII), vacas com mastite assintomática (GIII) e vacas com mastite clínica (GIV), imediatamente após o parto (0), às 24 e às 48 horas após o referido evento. Araçatuba-SP, 2013.

4.2.7 Teor de α -lactoalbumina no soro lácteo

O teor de α -lactoalbumina no soro lácteo não diferiu entre os diferentes grupos estudados ao longo das 48 horas. Porém, em todos os grupos e ao longo do tempo, houve decréscimo na sua concentração, sendo significativamente inferior no último período avaliado.

A α -lactoalbumina, assim como a β -lactoglobulina, é uma fração proteica sintetizada pela glândula mamária (SANT'ANA, 2004). A α -lactoalbumina apresenta papel essencial na biossíntese da lactose sendo de importância para o neonato (MAO et al., 1991). É também importante fonte de proteína e ajuda na produção e secreção do leite (FARRELL JÚNIOR et al., 2004).

Boehemer et al. (2010) relataram menores concentrações dessa proteína em animais com infecções mamárias, o que difere dos resultados apontados no

presente estudo. Contudo, Sant'ana (2004) também não observou diferenças significativas entre os teores séricos dessa proteína em animais com mastite sintomática. Talvez a intensidade da inflamação e a espécie do microrganismo responsável pelo processo inflamatório possam justificar a discrepância entre os diferentes resultados.

Rocha (2010) reportou maiores concentrações de α -lactoalbumina em vacas pluríparas quando comparado a vacas primíparas. Diferindo desses autores, o presente estudo não denotou diferenças entre animais do GI e GII. Porém, nos resultados aqui apresentados, observou-se tendência de maiores valores em amostras de vacas pluríparas quando comparados àquelas de animais de primeira cria.

Tabela 9- Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (S) do teor de α -lactoalbumina (mg/dL) em amostras de colostro e leite de vacas primíparas saudáveis (GI, n=10), vacas pluríparas saudáveis (GII=10) vacas com mastite assintomática (GIII, n=10) e vacas com mastite clínica (GIV, n=10), imediatamente após o parto (0), às 24 e às 48 horas após o referido evento. Araçatuba-SP.

Grupo	α -lactoalbumina ($\bar{x} \pm S$)		
	0 h	24 h	48 h
GI	491,03 \pm 84,57 A	403,41 \pm 287,87 A	158,33 \pm 81,24 B
GII	703,53 \pm 155,73 A	258,52 \pm 135,86 B	147,53 \pm 70,58 B
GIII	612,43 \pm 157,21 A	208,39 \pm 72,62 B	173,83 \pm 55,33 B
GIV	559,80 \pm 176,98 A	219,40 \pm 57,21 B	117,34 \pm 21,09 B

Médias seguidas de letras distintas, na linha, diferem entre si ($p < 0,05$)

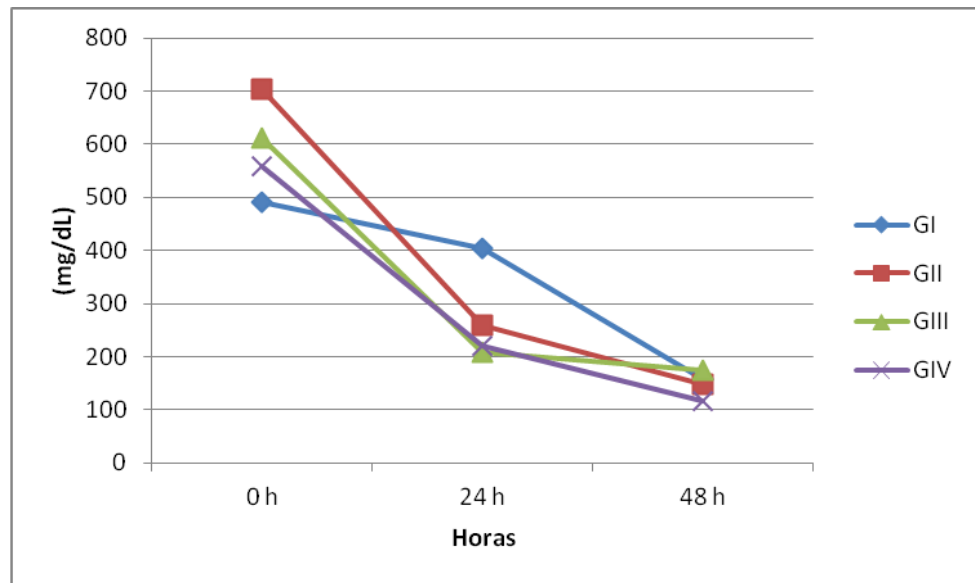


GRÁFICO 9 - Representação gráfica do teor de α -lactoalbumina (mg/dL) no soro lácteo de vacas primíparas saudáveis (GI), vacas pluríparas saudáveis (GII), vacas com mastite assintomática (GIII) e vacas com mastite clínica (GIV), imediatamente após o parto (0), às 24 e às 48 horas após o referido evento. Araçatuba-SP, 2013.

4.2.8 Teor de citocinas no sobrenadante do colostro e do leite das vacas

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos no que se refere às concentrações de IL-6 e TNF- α . No entanto, os animais do GI apresentaram os menores valores medianos de TNF- α ao parto e os valores máximos 24 horas após o referido evento. Os valores medianos e médios para as citocinas IL-6 e TNF- α no sobrenadante do colostro foram inferiores aos observados por Madureira (2011). Esses autores encontraram valores séricos medianos de 31,3 e 39,2 pg/mL e valores médios de 33,4 e 80,0 pg/mL para IL-6 e TNF- α , respectivamente, para colostro de animais sadios. Foram encontrados valores médios de 2,24 e 13,58 pg/mL de IL-6 e 18,0 e 17,80 pg/mL de TNF- α , para vacas saudáveis primíparas e pluríparas, respectivamente.

Hagiwara et al. (2000) observaram a presença de RNAm para diferentes tipos de citocinas, incluindo o TNF- α e IL-6, em células isoladas do colostro de bovinos sadios. Ou seja, a presença dessas moléculas no colostro independe da presença de agente patogênico. Esses mesmos autores, usando kits de ELISA para bovinos, encontraram valores para IL-6 e TNF- α de 770,0 e 9260,5 pg/mL, respectivamente. Esses valores foram superiores aos obtidos na presente pesquisa. Enfatiza-se que esses autores utilizaram citocinas purificadas, as quais atuam como imunógenos, estimulando, assim, maior liberação dessas moléculas.

Segundo Vels et al. (2009) a presença de processo inflamatório na glândula mamária estimula a produção das citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6. Hisaeda et al. (2001) determinaram os valores de TNF- α no colostro de vacas naturalmente acometidas por mastite causada por *E. coli* por meio da técnica de ELISA sanduíche, com imunoglobulinas purificadas específicas para bovinos. O valor médio da citocina supracitada foi de 20.000pg/mL, ou seja, superior ao encontrado para os animais do GIV. Uma explicação plausível para essa discrepância de resultados pode estar fundamentada no tipo de agente isolado. O presente trabalho apresentou isolamento majoritário de bactérias Gram-positivas (*Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp.). Wenz et al. (2010), estudando vacas naturalmente infectadas por mastite, não observaram níveis detectáveis de TNF- α em 71% dos animais que apresentaram cultura positiva para microrganismos Gram-positivos. Segundo Bannerman (2009), o aumento na concentração de TNF- α em animais acometidos por mastite por *S. uberis*, somente foi evidente em cerca de 66 horas após o estímulo inflamatório. De acordo com esse autor, a concentração máxima obtida dessa citocina estava muito aquém daquela obtida por uma mastite causada por uma bactéria Gram-negativa.

No que concerne a IL-6, há grande discrepância de valores observados na literatura. Hagiwara et al. (2001) descreveram valores entre 30000-90000pg/mL em vacas com mastite naturalmente infectadas por *E. coli*. Esses teores foram também superiores aos observados no presente estudo. A expressão da IL-6 é marcante tanto em infecções mamárias por agentes Gram-

positivos e Gram-negativos, principalmente *E.coli*, *S. aureus* e em algumas espécies de *Streptococcus* (BANNERMAN, 2009).

Inúmeros fatores podem estar associados às diferenças dos teores de citocinas no sobrenadante do colostro e do leite dos bovinos estudados. Essas moléculas são de vida curta e possuem receptores altamente especializados e diversificados (TIZARD, 2008). Além do mais, as diferentes concentrações identificadas nos trabalhos avaliados podem existir em decorrência de fatores relacionados ao manejo do animal e ambiente onde são mantidos. Entretanto, os manejos nutricional e sanitário dos animais são extremamente importantes por refletirem a quantidade de células presentes no colostro bovino e também a sua qualidade, fazendo com que haja enorme variabilidade de todos os componentes celulares presentes, incluindo as citocinas.

Tabela 10- Valores medianos das concentrações de IL-6 (pg/mL) em amostras de colostro e leite de vacas primíparas saudáveis (GI, n=10), vacas pluríparas saudáveis (GII=10), vacas com mastite assintomática (GIII, n=10) e vacas com mastite clínica (GIV, n=10), imediatamente após o parto (0), às 24 e às 48 após o referido evento. Araçatuba-SP, 2013.

GRUPO	0h		24h		48h	
	Md	Mín-Max	Md	Mín-Max	Md	Mín-Max
GI	1,40 A	1,40-8,12	52,48 A	1,40-96,54	57,77 A	1,40-79,25
GII	1,40 A	1,40-86,65	1,99 A	1,40-45,88	5,04 A	1,40-39,66
GIII	1,40 A	1,40-40,71	44,80 A	1,40-80,87	3,94 A	1,40-50,98
GIV	1,40 A	1,40-86,65	32,60 A	1,40-58,50	37,23 A	6,35-122,90

Médias seguidas de letras distintas, na linha, diferem entre si ($p < 0,05$)

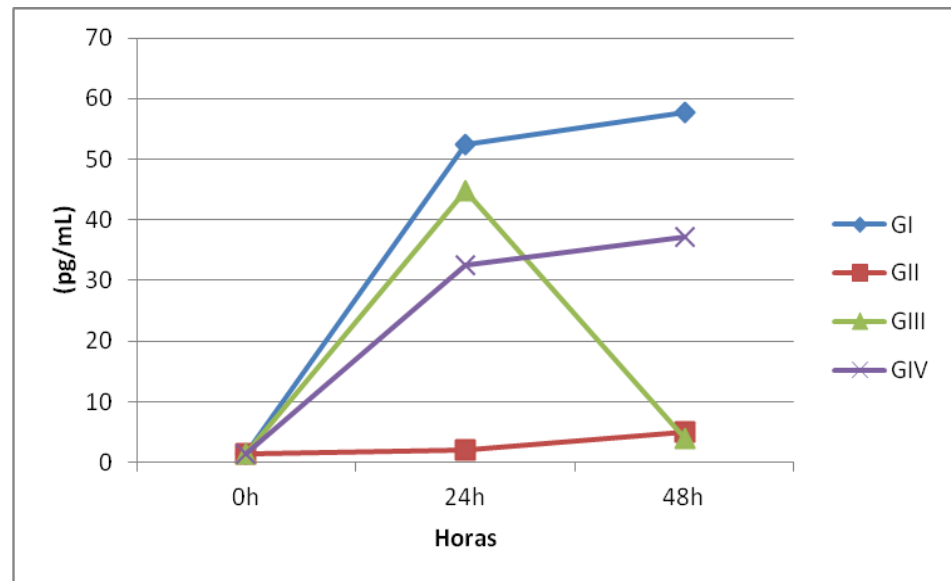


GRÁFICO 10 - Representação gráfica do teor mediano de IL-6 (pg/mL) no soro lácteo de vacas primíparas saudáveis (GI), vacas pluríparas saudáveis (GII), vacas com mastite assintomática (GIII) e vacas com mastite clínica (GIV), imediatamente após o parto (0), às 24 e às 48 horas após o referido evento. Araçatuba-SP, 2013.

Tabela 11- Valores medianos das concentrações de TNF- α (pg/mL) em amostras de colostro e leite de vacas primíparas saudáveis (GI, n=10), vacas pluríparas saudáveis (GII=10), vacas com mastite assintomática (GIII, n=10) e vacas com mastite clínica (GIV, n=10), imediatamente após o parto (0), às 24 e às 48 h após o referido evento. Araçatuba-SP, 2013.

GRUPO	0h		24h		48h	
	Md	Mín-Max	Md	Mín-Max	Md	Mín-Max
GI	2,50 B	2,50-80,0	119,97 A	13,95-348,06	83,82 AB	2,50-301,46
GII	2,50 A	2,50-124,86	2,50 A	2,50-185,72	7,95 A	2,50-83,82
GIII	2,50 A	2,50-117,43	94,00 A	0,98-327,11	2,50 A	2,50-112,04
GIV	2,50 A	2,50-635,25	141,24 A	2,50-411,04	93,31 A	9,49-495,90

Médias seguidas de letras distintas, na linha, diferem entre si ($p < 0,05$)

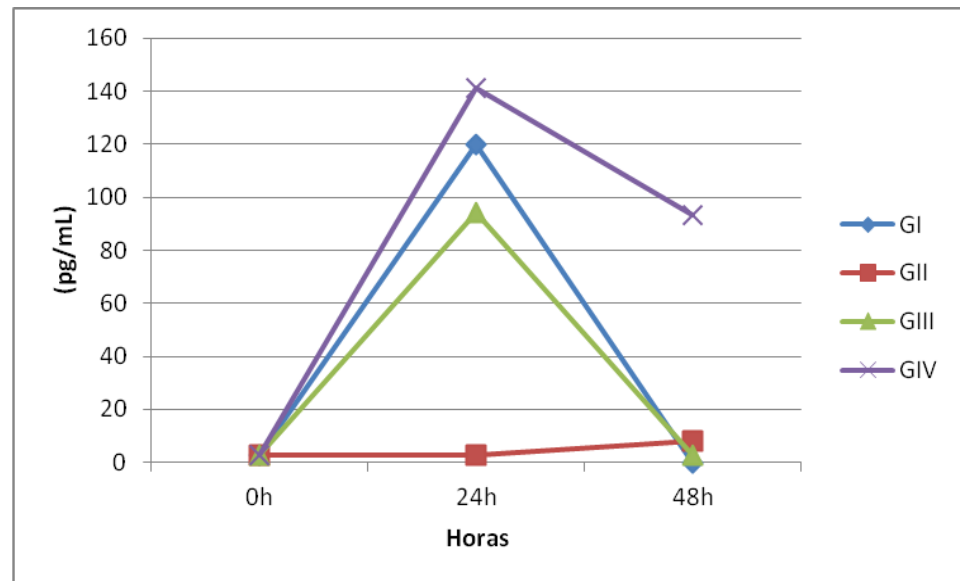


GRÁFICO 11 - Representação gráfica do teor mediano de TNF- α (pg/mL) no soro lácteo de vacas primíparas saudáveis (GI), vacas pluríparas saudáveis (GII), vacas com mastite assintomática (GIII) e vacas com mastite clínica (GIV), imediatamente após o parto (0), às 24 e às 48 horas após o referido evento. Araçatuba-SP, 2013.

4.3 Teores de proteína total e fracionamento eletroforético séricos

4.3.1 Proteína sérica total

O objetivo desse experimento foi de verificar se a ingestão do colostro, oriundo de vacas que pariram com mastite, causaria FTIP. A avaliação da transferência de imunidade passiva colostrar deve ser feita, preferencialmente, entre 24 e 48 horas de vida, período em que ocorre maior concentração das imunoglobulinas maternas no soro sanguíneo de bezerros (BARRINGTON; PARISH, 2001). A determinação da ocorrência ou não de FTIP neste período é importante do ponto de vista clínico, já que viabilizaria a imediata intervenção veterinária, minimizando os possíveis riscos de infecções. A não ingestão de colostro em bezerros recém-nascidos é a principal causa de FTIP, podendo atingir

ate 40% dos bezerros (BARRAGRY, 1997). A proteína total pode ser usada como ferramenta a fim de avaliar a eficiência da transferência de imunidade passiva. Borges et al. (2001) encontraram valores de proteína total variando de 4,08 a 4,75g/dl, em bezerros da raça Holandesa, antes da ingestão de colostro, valores semelhantes aos encontrados no presente estudo. Segundo Perino et al. (1993), animais que apresentam valor de proteína próximo de 4,2g/dL, com 48 horas de idade, não possuem absorção adequada de imunoglobulinas.

Verificou-se diferença significativa nos valores de proteína total ao nascimento com os demais momentos. Da mesma forma, não houve diferença significativa entre os grupos nos respectivos momentos (Tabela 12 e Gráfico 12). Johnson et al. (2007) observaram valores de proteína total em animais que ingeriram colostro com isolamento microbiológico significativamente menores quando comparado aos que ingeriram colostro estéril, diferindo dos achados obtidos no presente estudo. No entanto, esses autores mensuraram a concentração sérica de proteína total pelo método de refratometria, diferentemente do método utilizado nessa pesquisa. Outro aspecto importante deve-se ao fato que os bezerros do GIII e GIV ingeriram tanto colostro oriundo de quartos infectados como sadios, uma vez que nenhuma vaca apresentou mastite assintomática ou clínica em todos os quartos mamários diagnosticada imediatamente após a parição.

Porém, como observado no gráfico abaixo, os valores de proteína total desses bezerros seguiram a mesma tendência dos resultados observados pelos autores supracitados, apesar de não ter sido notada diferença significativa entre os valores apresentados.

O teor de proteína total apresentou correlação com os valores de IgG ($r=0,83$, $p<0,01$), as 24 horas de vida confirmando-a como meio para a avaliação da transferência de imunidade passiva.

Tabela 12- Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (S) do teor sérico de proteína total (g/dL) em amostras de sangue de bezerros, filhos vacas primíparas saudáveis (GI, n=10), vacas pluríparas saudáveis (GII=10), vacas com mastite assintomática (GIII, n=10) e vacas com mastite clínica (GIV, n=10), ao nascimento (0), às 24 e às 48 horas de vida. Araçatuba-SP, 2013.

Grupo	Proteína Total ($\bar{x} \pm S$)		
	0 h	24 h	48 h
GI	4,05±0,38 B	7,14±1,78 A	7,38±0,52 A
GII	4,38±0,31 B	7,28±1,20 A	7,45±1,22 A
GIII	4,30±0,44 B	6,89±0,74 A	7,02±0,83 A
GIV	4,24±0,38 B	6,16±0,64 A	6,21±0,68 A

Médias seguidas de letras distintas, na linha, diferem entre si ($p < 0,05$)

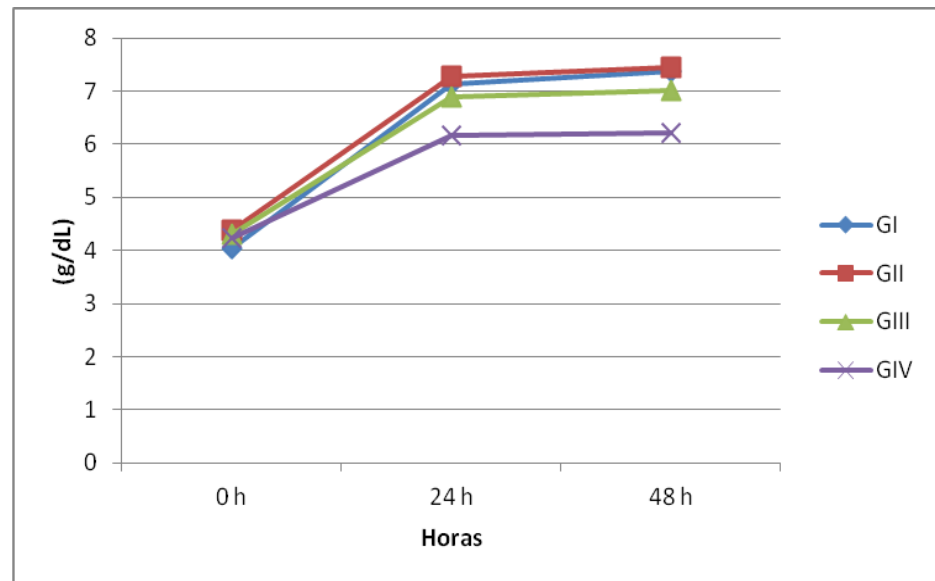


GRÁFICO 12 - Representação gráfica do teor sérico de proteína total (g/dL) de bezerras, filhos vacas primíparas saudáveis (GI), vacas pluríparas saudáveis (GII), vacas com mastite assintomática (GIII) e vacas com mastite clínica (GIV), ao nascimento (0), às 24 e às 48 horas de vida. Araçatuba-SP, 2013.

4.3.2 Teor sérico de imunoglobulina A (IgA)

As concentrações séricas de IgA foram superiores às 24 horas, permanecendo constante até às 48 horas, em todos os grupos avaliados. Não foi observada diferença significativa entre os grupos ao longo do período experimental para os níveis circulantes dessa imunoglobulina. Johnson et al. (2007) constataram padrão sérico similar, às 24 horas de vida, em bezerras alimentados com colostro contaminado e estéril. A IgA representa cerca de 5% do total de anticorpos presentes no colostro (TIZARD, 2008). Por representar uma pequena parcela, as alterações em sua concentração mostram-se pouco significante do ponto de vista clínico (JOHNSON et al., 2007).

Johnson et al. (2007) descreveram valores séricos de IgA, mensurados por ELISA, às 24 horas, em animais que ingeriram colostro estéril e contaminado, de

378mg/dL e 406mg/dL, respectivamente. Esses valores foram superiores aos encontrados no presente estudo. Essas diferenças podem ser explicadas devido ao tipo de técnica aplicada na mensuração da proteína e também às características inerentes da secreção colostrar que esses animais ingeriram. Fagliari et al. (2006) utilizando a técnica de SDS-PAGE, observaram valores séricos de bezerros saudáveis da raça holandesa de vida entre 262,60-409,86 mg/dL, às 48 horas. Os resultados apresentados nessa pesquisa estão inseridos nesse intervalo de valores.

Tabela 13- Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (S) da concentração de imunoglobulina A (mg/dL) em amostras de sangue de bezerros, filhos vacas primíparas saudáveis (GI, n=10), vacas pluríparas saudáveis (GII=10), vacas com mastite assintomática (GIII, n=10) e vacas com mastite clínica (GIV, n=10), ao nascimento (0), às 24 e às 48 horas de vida. Araçatuba-SP, 2013.

Grupo	IgA ($\bar{x} \pm S$)		
	0 h	24 h	48 h
GI	98,87±57,89 B	279,36±76,73 A	292,20±125,81 A
GII	117,77±48,62 B	302,42±51,93 A	300,29±64,74 A
GIII	98,87±31,28 B	270,58±74,56 A	282,08±68,93 A
GIV	102,51±31,70 B	235,16±90,15 A	264,62±82,61A

Médias seguidas de letras distintas, na linha, diferem entre si ($p < 0,05$)

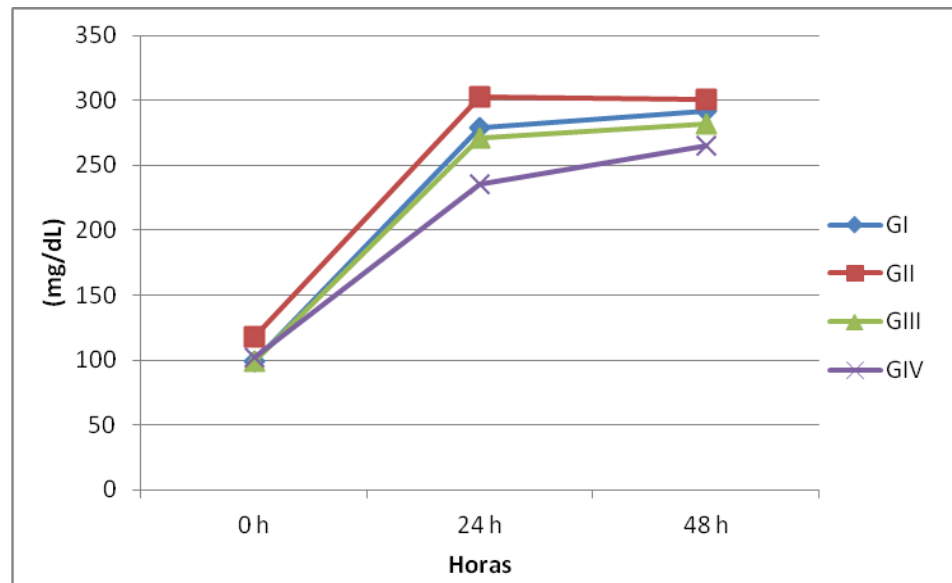


GRÁFICO 13 - Representação gráfica do teor sérico de imunoglobulina A (mg/dL) de bezerros, filhos vacas primíparas saudáveis (GI), vacas pluríparas saudáveis (GII), vacas com mastite assintomática (GIII) e vacas com mastite clínica (GIV), ao nascimento (0), às 24 e às 48 horas de vida. Araçatuba-SP, 2013.

4.3.3 Teor sérico de ceruloplasmina

A ceruloplasmina é uma proteína de fase aguda positiva. Segundo Gruys et al. (2005), a sua concentração aumenta após estímulo inflamatório ou infeccioso. O mesmo foi observado por Conner et al. (1988), porém a sua elevação foi considerada retardada quando comparada com outras proteínas mais específicas envolvidas no processo inflamatório, como a haptoglobina. Essa tendência foi verificada no presente experimento, em bezerros oriundos de animais que pariram com mastite sintomática e assintomática, no que concerne à diferença na dinâmica das proteínas supracitadas.

O aumento de sua concentração sérica foi constatado em animais submetidos à infecção experimental e natural (CONNER et al., 1988; FAGLIARI et al., 2003). Thomas (2000) cita que mesmo em condições aonde há aumento de

outras proteínas agudas, a ceruloplasmina pode apresentar-se elevada ou em níveis normais. Em um estudo aonde os animais foram submetidos à inflamação experimental, a concentração dessa proteína duplicou entre seis e sete dias após o estímulo. Em outra infecção experimental com *M. haemolytica* o aumento foi menor do que 20% (CONNER et al., 1988). Portanto, sua mensuração como meio diagnóstico de enfermidades nos bovinos ainda é muito controversa.

Notou-se aumento gradativo nos teores séricos de ceruloplasmina do nascimento até os dois dias de idade em todos os grupos avaliados, sem diferenças significativas entre os grupos e os momentos estudados. A dinâmica dessa proteína não se alterou entre os grupos.

Tabela 14- Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (S) da concentração de ceruloplasmina (mg/dL) em amostras de sangue de bezerros, filhas vacas primíparas saudáveis (GI, n=10), vacas pluríparas saudáveis (GII=10) vacas com mastite assintomática (GIII, n=10) e vacas com mastite clínica (GIV, n=10), ao nascimento (0), às 24 e às 48 horas de vida. Araçatuba-SP, 2013.

Grupo	Ceruloplasmina ($\bar{x} \pm S$)		
	0 h	24 h	48 h
GI	6,09±1,26 B	9,77±1,96 AB	12,43±4,62 A
GII	4,26±3,40 B	11,78±9,80 AB	15,42±13,53 A
GIII	10,05±4,67 B	11,28±11,04 AB	17,83±11,14 A
GIV	6,70±4,16 B	9,88±6,15 AB	17,97±14,71 A

Médias seguidas de letras distintas, na linha, diferem entre si ($p < 0,05$).

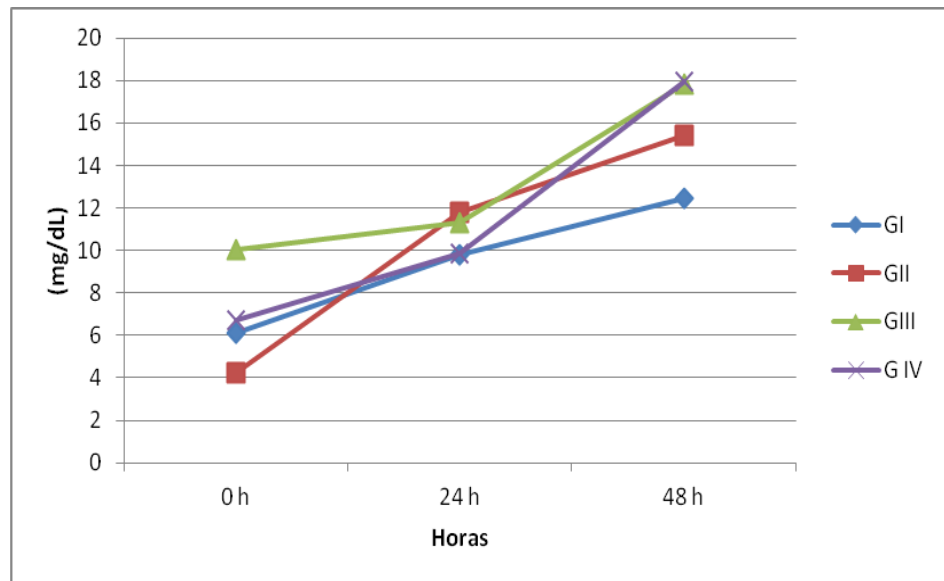


GRÁFICO 14 - Representação gráfica do teor sérico de ceruloplasmina (mg/dL) de bezerros, filhos vacas primíparas saudáveis (GI), vacas pluríparas saudáveis (GII), vacas com mastite assintomática (GIII) e vacas com mastite clínica (GIV), ao nascimento (0), às 24 e às 48 horas de vida. Araçatuba-SP, 2013

4.3.4 Teor sérico de transferrina

Verificou-se que somente o GI apresentou concentração significativamente menor logo após o nascimento, entre os diferentes momentos estudados. Contudo, às 24 horas de vida, notou-se maior concentração dessa proteína nos animais do GI, quando comparado aos demais animais no mesmo momento. Rocha (2010) não observou diferenças significativas no teor dessa proteína entre bezerros oriundos de novilhas e vacas pluríparas da raça Canchim nem em diferentes momentos durante as primeiras 48 horas de vida desses animais. Da mesma forma, Knowles et al. (2000) avaliando 14 bezerros sadios de diferentes raças de corte, verificaram diminuição gradual em torno de 25% a 15% ,nos níveis séricos de transferrina, do nascimento aos três dias de vida, contrariando a cinética dessa proteína no experimento apresentado. No entanto, Carvalho et al.

(2008) observaram marcante diminuição nas concentrações séricas dessa proteína em animais infestados por carrapatos.

A transferrina é uma proteína de fase aguda negativa, produzida pelos hepatócitos, e apresenta concentração diminuída após infecção. Sua baixa secreção pelas células hepáticas acarreta na redução dos níveis séricos de ferro, essencial para a replicação bacteriana (GRUYS et al., 2005). Infecções crônicas, neoplasias, anemias e inflamações podem causar redução em seus níveis (FUHRMAN et al., 2004). Além de estar presente no soro sanguíneo, essa proteína também aparece no colostro das espécies ruminantes e realiza a mesma função que a descrita para o sangue (SANCHEZ et al., 1992).

Tabela 15- Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (S) da concentração de transferrina (mg/dL) em amostras de sangue de bezerros, filhos vacas primíparas saudáveis (GI, n=10), vacas pluríparas saudáveis (GII=10), vacas com mastite assintomática (GIII, n=10) e vacas com mastite clínica (GIV, n=10), ao nascimento (0), às 24 e às 48 horas de vida. Araçatuba-SP, 2013.

Grupo	Transferrina ($\bar{x} \pm S$)		
	0 h	24 h	48 h
GI	207,14±56,13 Ba	368,02±154,74 Aa	336,00±68,94 Aa
GII	274,65±59,63 Aa	307,12±88,58 Ab	354,07±82,35 Aa
GIII	260,99±60,25 Aa	240,14±67,13 Ab	262,33±46,50 Aa
GIV	239,84±49,59 Aa	205,77±64,72 Ab	240,42±65,77 Aa

Médias seguidas de letras distintas, maiúscula na linha e minúscula na coluna, diferem entre si ($p < 0,05$)

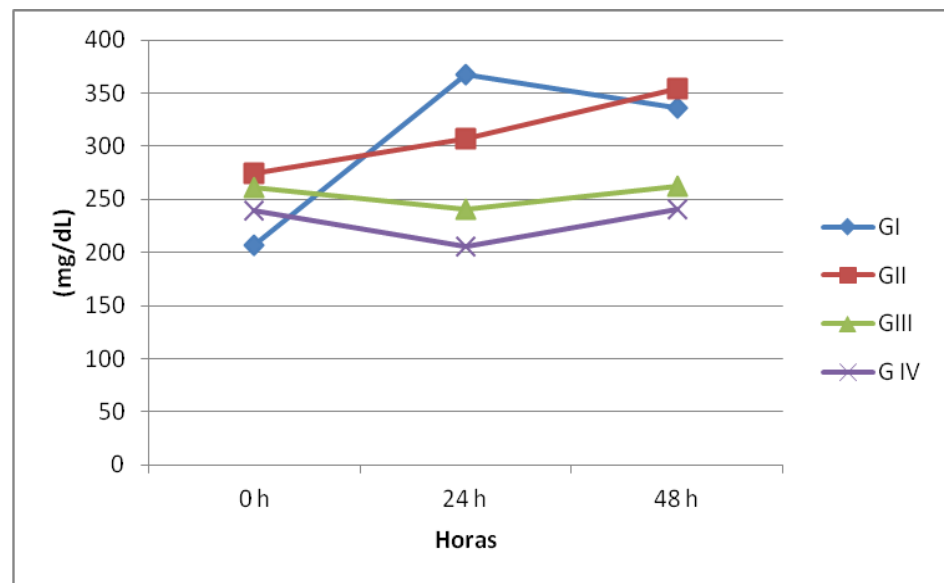


GRÁFICO 15 - Representação gráfica do teor sérico de transferrina (mg/dL) de bezerros filhos vacas primíparas saudáveis (GI), vacas pluríparas saudáveis (GII), vacas com mastite assintomática (GIII) e vacas com mastite clínica (GIV), ao nascimento (0), às 24 e às 48 de vida. Araçatuba-SP, 2013.

4.3.5 Teor sérico de albumina

Não foi denotada diferença significativa entre os grupos quanto aos teores de albumina sérica. Os valores de albumina, ao nascimento, foram menores quando comparados aos demais momentos, exceto no GIV, aonde a concentração dessa proteína manteve-se constante ao longo do período experimental. Nos demais grupos houve aumento às 24 horas, permanecendo constante aos dois dias de vida. González et al. (2008) observaram redução dos valores séricos de albumina em cabras submetidas à inflamação experimental dois dias após a indução do estímulo, e o retorno à sua concentração normal no terceiro dia, contrariando os resultados descritos nesse trabalho. Tendo em vista que as PFA apresentam respostas diferentes entre as espécies animais, é

provável que a cinética da referida proteína seja diferente em pequenos ruminantes quando comparado aos bovinos (TIZARD, 2008).

A albumina é uma proteína de fase aguda negativa, com peso molecular de aproximadamente 66,4kDa. Sua concentração sérica diminui em resposta aos processos inflamatórios crônicos. Sua concentração é cerca de 35 a 50% do total de proteínas séricas. Devido à sua abundância no soro, é responsável, também, pela pressão osmótica (ECKERSALL, 2008).

Tabela 16- Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (S) da concentração de albumina (mg/dL) em amostras de sangue de bezerros, filhos vacas primíparas saudáveis (GI, n=10), vacas pluríparas saudáveis (GII=10), vacas com mastite assintomática (GIII, n=10) e vacas com mastite clínica (GIV, n=10), ao nascimento (0), às 24 e às 48 horas de vida. Araçatuba-SP, 2013.

Grupo	Albumina ($\bar{x} \pm S$)		
	0 h	24 h	48 h
GI	3054,08±415,93 B	3451,56±632,35 A	3675,38±337,72 A
GII	3201,30±213,77 B	3563,21±329,22 A	3670,33±291,13 A
GIII	3107,55±281,82 B	3554,89±381,31 A	3624,84±369,03 A
GIV	3188,94±286,70 A	3052,53±155,07 A	3257,56±361,86 A

Médias seguidas de letras distintas, na linha, diferem entre si ($p < 0,05$)

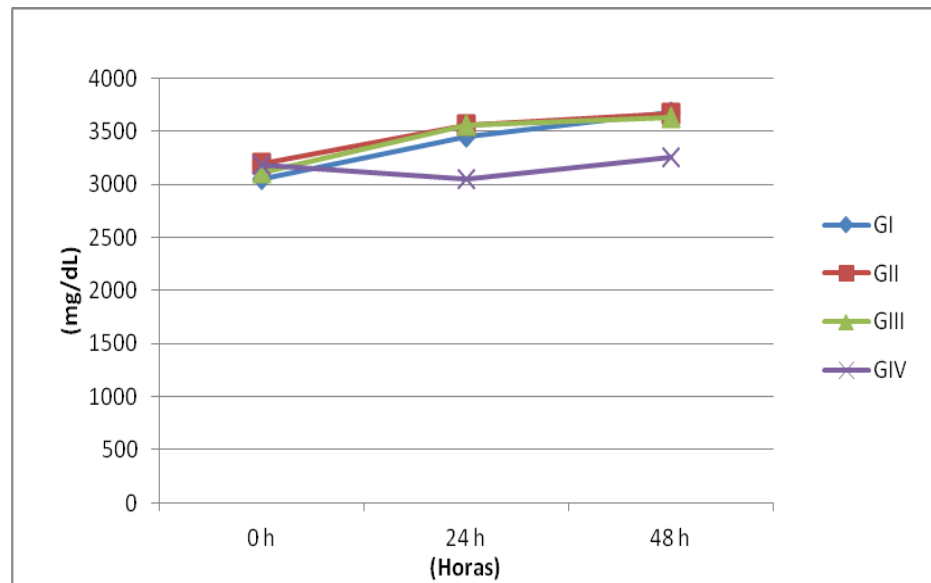


GRÁFICO 16 - Representação gráfica do teor sérico de albumina (mg/dL) de bezerros, filhos vacas primíparas saudáveis (GI), vacas pluríparas saudáveis (GII), vacas com mastite assintomática (GIII) e vacas com mastite clínica (GIV), ao nascimento (0), às 24 e às 48 horas de vida. Araçatuba-SP, 2013.

4.3.6 Teor sérico de imunoglobulina G total

Os bezerros são agamaglobulinêmicos ao nascimento e dependem das imunoglobulinas presentes no colostro (GODDEN, 2008). Portanto, este é extremamente importante na transferência da imunidade passiva (CORTESE, 2009). Somente poucas horas após a ingestão do colostro é que suas concentrações elevam-se (ECKERSALL, 2008). A ingestão do colostro não implica em transferência de anticorpos adequada, pois aspectos como a qualidade colostrada e tempo entre o nascimento e a ingestão do colostro são fatores relevantes a serem considerados (BESSER; GAY, 1994).

Não foi observada diferença entre os grupos quanto as concentrações de IgG. Após 24 horas do período experimental denotou-se aumento no nível sérico dessa imunoglobulina, indicando que a ingestão do colostro é fundamental para a sua aquisição.

O teor de proteína total do soro lácteo das vacas no dia do parto não denotou correlação com o teor de IgG ($r=0,039$, $p>0,05$) e de proteína total ($r=0,006$, $p>0,05$) dos bezerros, às 24 horas de vida. Verificou-se que os bezerros oriundos de vacas sadias possuíam, às 24 horas, maiores concentrações de IgG, sugerindo que o processo inflamatório na glândula mamária implica em maior concentração de proteínas no colostro e menor taxa de transferência de IgG para o recém-nascido.

Johnson et al. (2007) constataram valores de IgG de 1810 ± 120 mg/dL às 24 horas de vida em bezerros da raça holandesa que ingeriram colostro com cultivo microbiano semelhante aos observados no presente estudo. Acredita-se que os microrganismos se liguem aos receptores de anticorpos presentes nos enterócitos, reduzindo, assim, o número de estruturas responsáveis pela captação e absorção das imunoglobulinas (JOHNSON et al., 2007).

Segundo Feitosa et al. (2010), bezerros com teores de IgG < 800 mg/dL, às 24 horas de vida, apresentam taxa de anticorpos circulantes muito baixa, caracterizando, portanto, FTIP. Níveis séricos de IgG >1500 mg/dL indicariam transferência efetiva. Waldner e Rosengren (2009) observaram que níveis séricos de IgG maiores que 2400mg/dL conferiam proteção efetiva e redução do risco de morte até os três meses de idade.

Segundo os dados supracitados e observando os valores médios encontrados às 24 horas de vida, constatou-se que não houve FTIP em nenhum grupo avaliado, corroborando os achados de Johnson et al. (2007) quando afirmaram que a ingestão de colostro contaminado resulta em menor absorção de imunoglobulinas, porém a quantidade ingerida é suficiente para a proteção imunológica do bezerro nos primeiros dias de vida. Igualmente, deve ser considerado que secreções sem isolamento microbiológico também foram ingeridas pelos bezerros do GIII e GIV.

Tabela 17- Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (S) da concentração de Imunoglobulina G total (mg/dL) em amostras de sangue de bezerros, filhos vacas primíparas saudáveis (GI, n=10), vacas pluríparas saudáveis (GII=10), vacas com mastite assintomática (GIII, n=10) e vacas com mastite clínica (GIV, n=10), ao nascimento (0), às 24 e às 48 horas de vida. Araçatuba-SP, 2013.

Grupo	IgG ($\bar{x} \pm S$)		
	0 h	24 h	48 h
GI	378,97 \pm 189,27 Ba	2738,87 \pm 298,00 Aa	2919,09 \pm 449,70 Aa
GII	394,63 \pm 229,31 Ba	2742,83 \pm 588,50 Aa	2613,92 \pm 414,93 Aab
GIII	463,57 \pm 62,46 Ba	2251,21 \pm 88,02 Aab	2274,90 \pm 156,96 Abc
GIV	418,26 \pm 112,32 Ba	1876,24 \pm 99,48 Ab	1898,11 \pm 362,78 Ac

Médias seguidas de letras distintas, maiúscula na linha e minúscula na coluna, diferem entre si ($p < 0,05$).

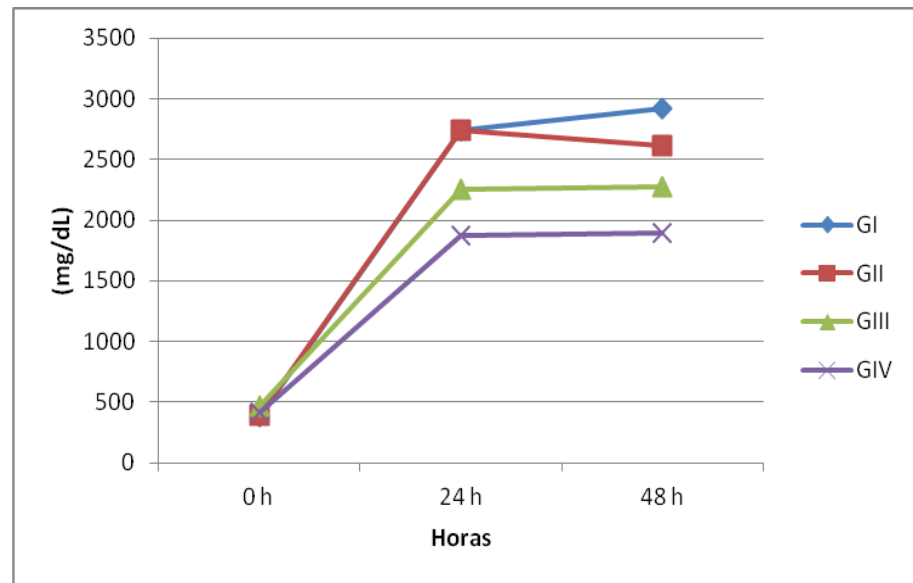


GRÁFICO 17 - Representação gráfica do teor sérico de imunoglobulina G total (mg/dL), de bezerros filhos vacas primíparas saudáveis (GI), vacas pluríparas saudáveis (GII), vacas com mastite assintomática (GIII) e vacas com mastite clínica (GIV), ao nascimento (0), às 24 e às 48 horas de vida. Araçatuba-SP, 2013.

4.3.7 Teor sérico de haptoglobina (Hp)

Observou-se, ao longo das primeiras 24 horas de vida, aumento gradual na concentração de Hp, coincidindo com o comportamento descrito por Rocha (2010). Fagliari et al. (2006) relataram valores médios de haptoglobina (53,12 - 87,36 mg/dL) em bezerros da raça holandesa às 48 horas de vida muito superiores aos observados no presente estudo. Segundo Conner et al. (1988), o rápido aumento em sua concentração pode ser detectada entre 10 e 24 horas após a resposta inflamatória. A mesma tendência foi verificada no presente estudo, aonde os valores de Hp no GIII e GIV, às 24 horas, apresentavam-se significativamente maiores. Porém, os resultados obtidos discordaram da literatura consultada. Eckersall et al. (2001) utilizando o método de ligação de

hemoglobina constataram valores séricos de 47mg/dL em vacas com mastite branda e 74mg/dL em animais com mastite moderada. Eckersall e Conner (1988) afirmaram que o aumento dessa proteína é inerente à gravidade da lesão inflamatória.

Talvez o número de bactérias que ingressaram na circulação sistêmica tenha sido pequeno o suficiente ao ponto de não causar graves danos inflamatórios, uma vez que, parte das bactérias presentes na secreção colostrada pode ter ficado aderida aos receptores de imunoglobulinas presentes nos enterócitos (JOHNSON et al., 2007).

A haptoglobina é a glicoproteína de fase aguda mais utilizada em ruminantes como preditora de processos inflamatórios agudos. Sua concentração pode aumentar em até 100 vezes nessas ocasiões (ECKERSALL, 2001). Em animais sadios seus níveis são nulos ou quase inexistentes; por esse motivo, sua mensuração é amplamente usada (ECKERSALL, 2000). Sua função é de se ligar à hemoglobina livre, inibindo, assim, a proliferação bacteriana e reduzindo a concentração de ferro disponível (HUZZEY et al., 2009). Em bezerros é extremamente útil na determinação de doenças clínicas ou assintomáticas (GANHEIM et al., 2003). Suas baixas concentrações no sangue de bezerros após o nascimento poderia, portanto, ser indicativo para avaliar possíveis complicações durante o parto, tais como infecções intrauterinas (SCHROEDL et al., 2003). As baixas concentrações avaliadas nesses animais no momento do parto suportam a afirmação supracitada.

Tabela 18- Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (S) da concentração de haptoglobina (mg/dL) em amostras de sangue de bezerros, filhos vacas primíparas saudáveis (GI, n=10), vacas pluríparas saudáveis (GII=10), vacas com mastite assintomática (GIII, n=10) e vacas com mastite clínica (GIV, n=10), ao nascimento (0), às 24 e às 48 horas de vida. Araçatuba-SP, 2013.

Grupo	Haptoglobina ($\bar{x} \pm S$)		
	0 h	24 h	48 h
GI	2,52±1,89 Ba	4,49±0,84 Bc	7,25±3,76 Ab
GII	2,34±0,77 Ba	5,06±0,97 Bc	6,47±1,34 Ab
GIII	3,80±2,32 Ca	15,24±3,76 Aa	10,89±2,24 Ba
G IV	2,68±0,70 Ba	11,68±0,73 Ab	12,19±2,55 Aa

Médias seguidas de letras distintas, maiúscula na linha e minúscula na coluna, diferem entre si ($p < 0,05$).

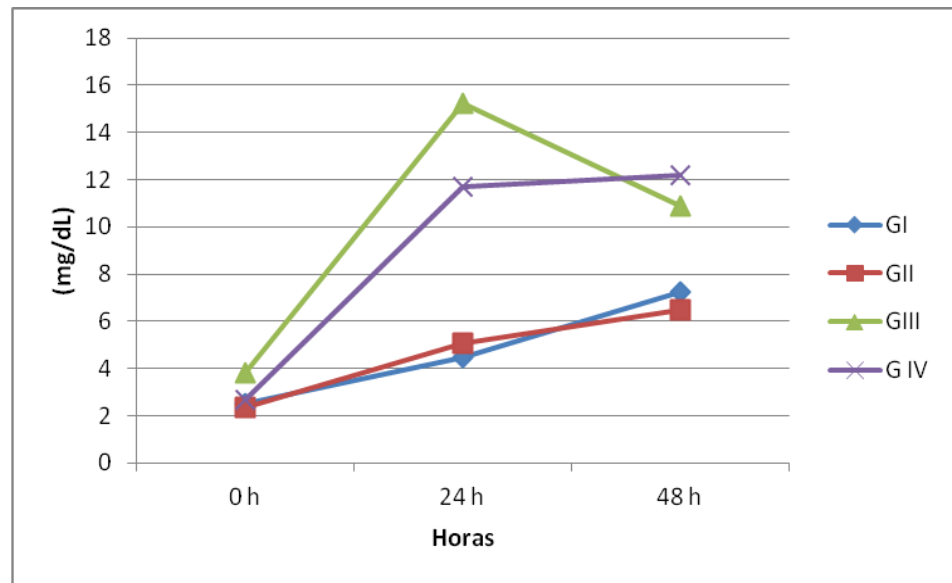


GRÁFICO 18 - Representação gráfica do teor sérico de haptoglobina (mg/dL) de bezerros, filhos vacas primíparas saudáveis (GI), vacas pluríparas saudáveis (GII), vacas com mastite assintomática (GIII) e vacas com mastite clínica (GIV), ao nascimento (0), às 24 e às 48 horas de vida. Araçatuba-SP, 2013.

4.3.8 Teor sérico de α_1 -glicoproteína ácida

No presente estudo foram observados valores semelhantes aos de Rocha (2010) para bezerros saudáveis, às 24 horas de vida. Verificou-se que não houve alteração na concentração sérica de α_1 -glicoproteína ácida nos animais do GI e GIII ao longo do período experimental. Por sua vez, animais do GII e GIV apresentaram menores concentrações ao nascimento, atingindo concentrações maiores no primeiro dia de vida, não sendo constatada, porém, diferença entre os grupos.

A α_1 -glicoproteína ácida é uma proteína de fase aguda positiva que aumenta sua concentração, frente aos processos inflamatórios crônicos, em cerca de duas a três vezes (ECKERSALL et al., 2001; HORADAGODA et al., 1999). Sabe-se que age sobre as células T, possui propriedades imunossupressoras em

bovinos e liga-se a hormônios esteroides, como a progesterona (GRUYS et al., 2005). Horadagoda et al. (1999) estudando 81 bovinos acometidos por diferente tipos de enfermidades reportaram valores médios semelhantes, tanto em animais acometidos por processos agudos quanto crônicos, sugerindo que suas concentrações permanecem por mais tempo elevadas. Esses mesmos autores sugeriram que a elevação e a diminuição da haptoglobina são mais rápidas do que a proteína em questão.

Tabela 19- Valores médios (\bar{x}) e desvios-padrão (S) da concentração de α_1 -glicoproteína ácida (mg/dL) em amostras de sangue de bezerras, filhos vacas primíparas saudáveis (GI, n=10), vacas pluríparas saudáveis (GII=10), vacas com mastite assintomática (GIII, n=10) e vacas com mastite clínica (GIV, n=10), ao nascimento (0), 24 e 48 horas de vida. Araçatuba-SP, 2013.

Grupo	α_1 -glicoproteína ácida ($\bar{x} \pm S$)		
	0 h	24 h	48 h
GI	2,96 \pm 2,01 A	6,04 \pm 2,62 A	6,84 \pm 2,97 A
GII	2,69 \pm 0,61 B	7,14 \pm 3,10 A	7,65 \pm 1,60 A
GIII	8,22 \pm 7,40 A	8,80 \pm 4,92 A	10,59 \pm 5,98 A
GIV	2,78 \pm 1,07 B	8,90 \pm 6,99 A	8,93 \pm 4,17 A

Médias seguidas de letras distintas, na linha, diferem entre si ($p < 0,05$)

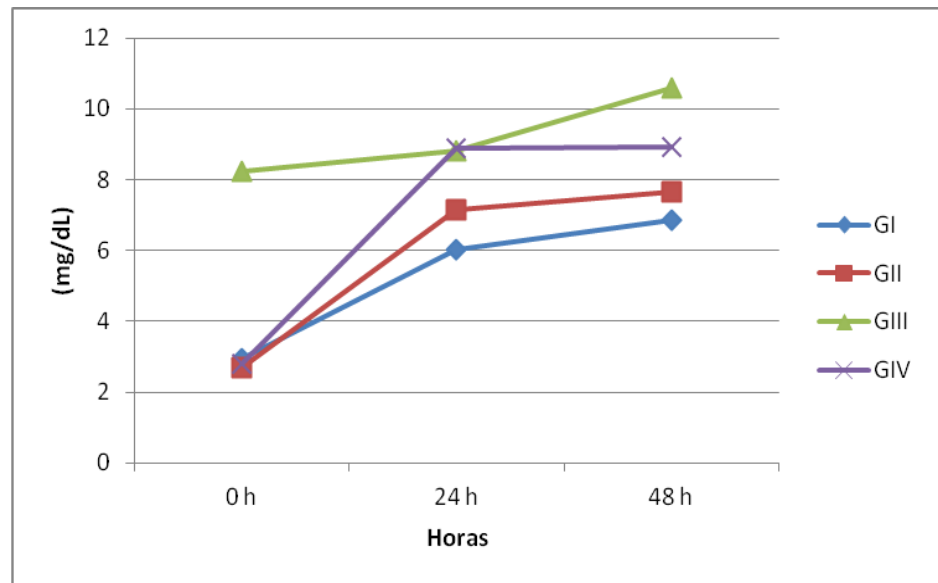


GRÁFICO 19 - Representação gráfica do teor sérico de α_1 -glicoproteína ácida (mg/dL) de bezerros, filhos vacas primíparas saudáveis (GI), vacas pluríparas saudáveis (GII), vacas com mastite assintomática (GIII) e vacas com mastite clínica (GIV), ao nascimento (0), às 24 e às 48 horas de vida. Araçatuba-SP, 2013.

4.3.9 Teor sérico de citocinas

As citocinas não foram detectadas em amostras sanguíneas dos bezerros estudados antes que ocorresse a ingestão de colostro (momento zero). Porém, às 24 horas de vida, as concentrações séricas dessas moléculas se mostravam presentes. Yamanaka et al. (2003) também não constataram a presença de citocinas em animais antes da ingestão do colostro. Isso possibilita afirmar que essas citocinas foram obtidas após a ingestão da secreção colostrar. Como essas moléculas são produzidas pelo sistema imune, os recém-nascidos não têm competência imunológica para a produção autógena dessas células nos primeiros dias de vida (TIZARD, 2008). Não foram observadas diferenças significativas nos níveis circulantes tanto de IL-6 como de TNF- α às 24 e às 48 horas de vida.

Segundo Barrington e Parish (2001), com o passar do tempo há diminuição das concentrações séricas dessas moléculas, seguindo a mesma tendência das demais células de defesa, na dependência da ingestão de colostro pelos neonatos. Acredita-se que haja diminuição das células responsáveis pela produção dos receptores dessas proteínas na mucosa intestinal ao longo do tempo, após o nascimento.

Poucos autores mensuraram as concentrações citocinas, provenientes do colostro bovino, no sangue dos respectivos conceptos. Madureira (2011) observou valores medianos de 1,08 pg/mL para a IL-6 aproximadamente 24 horas após a ingestão de colostro. Esse mesmo autor descreveu valores de 2,30pg/mL para TNF- α no referido período. Yamaka et al. (2003) reportaram valores de IL-6 e TNF- α em bezerros saudáveis 24 horas após terem ingerido o colostro de 1023 e 190 pg/mL, respectivamente. No presente estudo foram verificados valores médios de IL-6 de 1,39 e 1,85pg/mL para bezerros oriundos de vacas primíparas e pluríparas respectivamente, às 24 horas de vida e de 15,37 e 5,68pg/mL para TNF- α , em bezerros oriundos de vacas primíparas e pluríparas no período supracitado. Porém, não houve diferenças significativas entre os conceptos dos diferentes grupos. Contudo, os valores medianos permaneceram imutáveis entre os grupos e os momentos estudados.

Na literatura parece não existir consenso entre a gravidade da lesão inflamatória e as concentrações séricas de IL-6. Animais que morreram devido à mastite clínica severa apresentaram teores séricos maiores do que animais que sobreviveram (HAGIWARA et al., 2001). Contudo, outros autores reportaram tendência inversa nas concentrações séricas (NAKAJIMA et al., 1997) ou não observaram diferenças nas concentrações sanguíneas de IL-6 em animais com mastite branda e severa (OHTSUKA et al., 2001).

A diferença de valores obtidos no presente estudo e na literatura compulsada pode ter várias explicações. Segundo Abbas e Lichtman (2005), as citocinas, uma vez sintetizadas, são rapidamente secretadas e consumidas. Por serem absorvidas pelos neonatos a partir da disponibilidade presente no colostro, sua produção e consumo podem ter ocorrido antes da obtenção das amostras sanguíneas. O kit utilizado pode também ter interferência nos diferentes

resultados obtidos. O kit de ELISA utilizado no presente estudo é de origem humana. Este kit, em particular, a IL-6 e TNF- α apresentam, respectivamente, 68% e 77% de homologia. Segundo Scheerlinck (1999), a homologia entre as citocinas de diferentes espécies existe quando essas possuírem pelo menos 60% de similaridade na sequência de aminoácidos. Outra questão de fundamental importância se refere ao colostro. Como afirmado anteriormente, as citocinas presentes no sangue são oriundas do colostro ingerido. Portanto, a concentração sérica dessas moléculas está intimamente ligada aos níveis existentes na secreção colostrada.

As células de defesa dos neonatos possuem atividade fagocítica diminuída, e, devido ao estresse do parto, suas ações bactericidas se tornam ainda mais deprimidas (BARRINTON, PARISH; 2001). Com tal comprometimento, ocorre diminuição da resposta imune mediada por células que secretam algumas citocinas, como, por exemplo, o TNF- α (MADUREIRA, 2011).

Tabela 20- Valores medianos da concentração de IL-6 (pg/mL) em amostras de sangue de bezerros, filhos vacas primíparas saudáveis (GI, n=10), vacas pluríparas saudáveis (GII=10), vacas com mastite assintomática (GIII, n=10) e vacas com mastite clínica (GIV, n=10), ao nascimento (0), às 24 e às 48 horas de vida. Araçatuba-SP, 2013.

Grupo	0h		24h		48h	
	Md	Mín-Max	Md	Mín-Max	Md	Mín-Max
GI	0 B	0-0	1,40 A	1,35-1,40	1,40 A	1,40-1,98
GII	0 B	0-0	1,40 A	1,40-5,00	1,40 A	1,04-1,40
GIII	0 B	0-0	1,40 A	1,40-22,18	1,40 A	1,40-61,63
GIV	0 B	0-0	1,40 A	0,37-1,40	1,40 A	1,40-5,14

Médias seguidas de letras distintas, na linha, diferem entre si ($p < 0,05$)

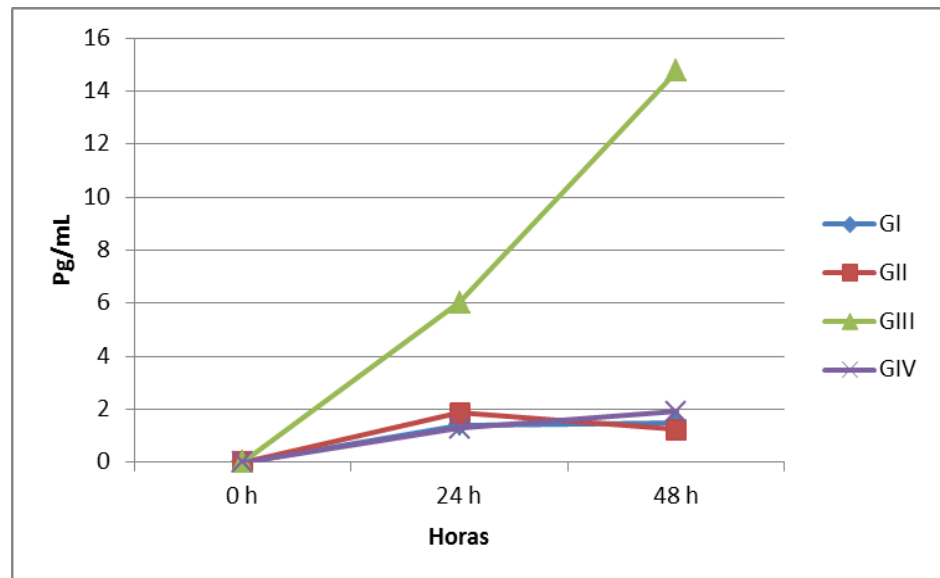


GRÁFICO 20 - Representação gráfica do teor sérico médio de IL-6 (pg/mL) de bezerros, filhos vacas primíparas saudáveis (GI), vacas pluríparas saudáveis (GII), vacas com mastite assintomática (GIII) e vacas com mastite clínica (GIV), ao nascimento (0), às 24 e às 48 horas de vida. Araçatuba-SP, 2013.

Tabela 21- Valores medianos da concentração de TNF- α (pg/mL) em amostras de sangue de bezerros, filhos vacas primíparas saudáveis (GI, n=10), vacas pluríparas saudáveis (GII=10), vacas com mastite assintomática (GIII, n=10) e vacas com mastite clínica (GIV, n=10), ao nascimento (0), às 24 e às 48 horas de vida. Araçatuba-SP, 2013.

Grupos	0h		24h		48h	
	Md	Mín-Max	Md	Mín-Max	Md	Mín-Max
GI	0 B	0-0	2,50 A	2,50-79,73	2,50 A	2,50-108,32
GII	0 B	0-0	2,50 A	2,50-28,01	2,50 A	2,30-2,50
GIII	0 B	0-0	2,50 A	2,50-85,60	2,50 A	2,50-252,40
GIV	0 B	0-0	2,50 A	2,50-51,88	2,50 A	2,50-124,13

Médias seguidas de letras distintas, na linha, diferem entre si ($p < 0,05$)

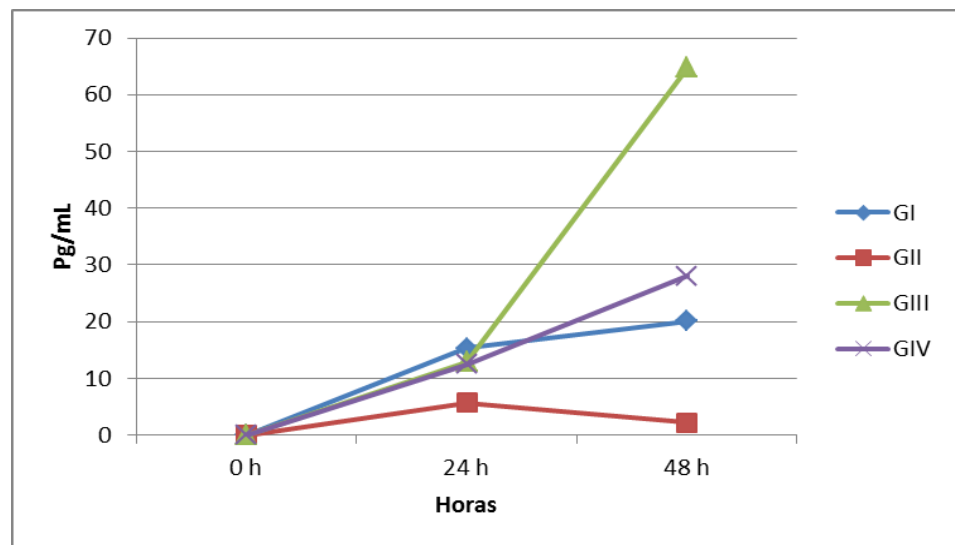


GRÁFICO 21- Representação gráfica do teor sérico médio de TNF- α (pg/mL) de bezerros, filhos vacas primíparas saudáveis (GI), vacas pluríparas saudáveis (GII), vacas com mastite assintomática (GIII) e vacas com mastite clínica (GIV), ao nascimento (0), às 24 e às 48 horas de vida. Araçatuba-SP, 2013.

5 CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos pode-se concluir que:

- 1) A ingestão voluntária de secreções colostrais, de um mesmo animal, que apresentaram cultivo bacteriano negativo, em alguns quartos, e que apresentaram mastite assintomática e clínica, em outro(s), não acarreta em falha na transferência de imunidade passiva;
- 2) Não há diferenças entre os valores de imunoglobulinas, proteínas de fase aguda e proteína total no colostro de vacas primíparas e pluríparas;
- 3) As concentrações das proteínas nas secreções colostrais de vacas com mastite são mais intensas nas glândulas oriundas de animais com mastite clínica;
- 4) O California Mastitis Test (CMT) pode ser utilizado no diagnóstico de mastite imediatamente após o parto;
- 5) O *Streptococcus* sp. e o *Staphylococcus* sp. são os agentes mais isolados nas amostras de secreção colostrar de vacas holandesas com mastite assintomática e clínica, respectivamente;
- 6) O exame ultrassonográfico em associação com o exame físico do parênquima glandular é ferramenta importante para o estabelecimento do diagnóstico;

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia celular e molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 580p.

ARNOLD, R.R.; BREWER, M.; GAUTHIER, J. J. Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms. **Infection and Immunity**, v. 28, n.3, p. 893-898, 1980.

ARNOLD, R.R.; COLE, M.F.; MCGHEE JÚNIOR, A. A bactericidal effect for human lactoferrin. **Science**, v.197, n.4300, p. 263-265, 1977.

BANNERMAN, D. D. Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. **Journal of Animal Science**, v.87, n. 13, p.10–25, 2009.

BARKEMA, H.W.; GREEN, M.J.; BRADLEY, A.J.; ZADOKS, R.N. Invited review: The role of contagious disease in udder health. **Journal of Dairy Science**, v.92, n.10, p.4717–4729, 2009.

BARRAGRY, T. Calf diarrhea. **Irish Veterinary Journal**, v.50, p.49-58, 1997

BARRINGTON, G. M. ; PARISH, S. M. Bovine neonatal immunology. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v.17, n.3, p.463-476.2001

BESSER, T.E.; GAY, C.C. The importance of colostrum to the health of the neonatal calf. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v.10, n.1, p.107- 117, 1994.

BIRGEL, E. H. Semiologia da glândula mamária de ruminantes. In: FEITOSA, F. L. F. **Semiologia veterinária: A arte do diagnóstico**. São Paulo: Roca, 2004. p. 353-399.

BIRGEL JUNIOR, E. H. **Características físicoquímicas, celulares e microbiológicas do leite de bovinos das raças Holandesa, Gir e Girolando criados no Estado de São Paulo**. 2006. 335 f. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

BOEHMER, J. L.; WARD, J. L.; R. R. PETERS, R. R.; SHEFCHECK, K. J.; McFARLAND, M. A.; BANNERMAN, D. D. Proteomic analysis of the temporal expression of bovine milk proteins during coliform mastitis and label-free relative quantification **Journal of Dairy Science**, v. 93, n.2, p. 593–603. 2010.

BORGES, A.S.; FEITOSA, F.L.F; BENESI, F.J.; BIRGEL, E.H.; MENDES, L.C.N. Influência da forma de administração e da quantidade fornecida de colostro sobre a concentração de proteína total e de suas frações eletroforeticas no soro sanguíneo de bezerros da raça Holandesa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.5, p.629-634, 2001.

BOUNOUS, G. Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. **Anticancer Research**, v.20, n. 6C, p.4785–4792. 2000.

BRASIL. ministério da agricultura, pecuária e abastecimento: instrução normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Legislativo, Brasília, D.F, 29 de Dezembro de 2011, seção 1, p.6.

BREEN, E. C.; REYNOLDS, S. M.; COX, C.; JACOBSON, L. P.; MAGPANTAY, L.; MULDER, C. B.; DIBBEN, O.; MARGOLICK, J. B.; BREAM, J. H.; SAMBRANO, E.; MARTÍNEZ-MAZA, O.; SINCLAIR, E.; BORROW, P.; LANDAY, A. L.; RINALDO, C.R.; NORRIS, P. J. Multisite comparison of high-sensitivity multiplex cytokine assays. **Clinical and vaccine immunology**, v. 18, n.8, p. 1229–1242, 2011.

BRITO, J.R.F.; CALDEIRA, G.A.V.; VERNEQUE, R.S.; BRITO, M.A.V.P. Sensibilidade e especificidade do "California Mastitis Test" como recurso diagnóstico da mastite subclínica em relação à contagem de células somáticas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.17, n.2, p.49-53, 1997.

CARVALHO W. A.; BECHARA G. H.; MORE, D.D.; FERREIRA B. R.; SILVA J. S.; SANTOS, I. K. F. M. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Distinct acute phase proteins vary during infestations according to the genetic composition of the bovine hosts, *Bos taurus* and *Bos indicus*. **Experimental Parasitology**, New York, v.118, p. 587–591, 2008.

CONNER, J.G.; ECKERSALL, P. D.; WISEMAN, A.; AITCHISON, T. C.; DOUGLAS, T. A. Bovine acute phase response following turpentine injection. **Research in Veterinary Science**, v.44, n.1, p. 82-88, 1988.

CORTESE, V.S. Neonatal immunology. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v 25, n.1 p.221-227. 2009.

COSTA, E.O. Importância da mastite na produção leiteira do Brasil. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, v.1, p. 3-9, 1998.

COSTA, E.O.; MELEVILLE, P.A.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T.; WHITE, C.R.; PARDO, R.B. Índices de mastite bovina clínica e subclínica nos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.17, p. 215-217, 1995.

CHENG, J.B.; WANG, J.Q.; BU, D. P.; LIU, G. L.; ZHANG, C. G.; WEI, H. Y.; ZHOU, L. Y.; WANG, J.Z. Factors affecting the lactoferrin concentration in bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v.91, n.3, p.970–976, 2008.

DEMEU, F. A.; LOPES, M.A.; COSTA, G.M.; ROCHA, C.M.B.M.; SANTOS, G.; NETO, A.F. Influência do descarte involuntário de matrizes no impacto econômico da mastite em rebanhos leiteiros. **Ciência agrotecnica**, v.35, n.1, p.195-202, 2001.

DOHOO, I. R. An evaluation of the validity of individual cow somatic cell counts from cows in early lactation. **Preventive Veterinary Medicine**, v.16, n.2, p.103-110,1993.

ECKERSALL, P.D. Proteins, proteomics, and the dysproteinemias. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clínical biochemistry of domestic animals**. 6. ed. San Diego: academic press, 2008. p. 117-155.

ECKERSALL, P.D. Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. **Revue Médecine Vétérinaire**, v.151,n.7, p.577-584. 2000.

ECKERSALL, P. D.; CONNER, J. G.; BOVINE AND CANINE ACUTE PHASE PROTEINS, **Veterinary Research Communications**, v.12, n.2, p.169-178, 1988.

ECKERSALL, P. D.; YOUNG, F. J.; MCCOMB, C.; HOGARTH,C. J.; SAFI,S.; WEBER, A.; T. McDONALD, T.; NOLAN,A.M.; FITZPATRICK, J.L. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. **Veterinary Record**, v.148, n.2, 35-41. 2001.

ECKERSALL, P. D.; YOUNG, F. J.; NOLAN, A.M.; KNIGHT, C.H.; MCCOMB, C.; WATERSTON, M. M.; HOGARTH, C. J.; SCOTT, E. M.; FITZPATRICK, J.F. Acute Phase Proteins in Bovine Milk in an Experimental Model of Staphylococcus aureus Subclinical Mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.89, n.5, p.1488–1501. 2006.

FARRELL, JÚNIOR., H. M.; JIMENEZ-FLORES, R.; BLECK, G. T.; BROWN, E. M.; BUTLER, J. E.; CREAMER, L. K.; HICKS, C. L.; HOLLAR, C. M.; NG-KWAI-HANG, K. F.; SWAISGOOD, H. E. Nomenclature of the proteins of cows' milk - sixth revision. **Journal of Dairy Science**, v.87, n.6, p.1641–1674. 2004

FAGAN, E.P.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; JOBIM, C.C. Avaliação de padrões físico-químicos e microbiológicos do leite em diferentes fases de lactação nas estações do ano em granjas leiteiras no Estado do Paraná – Brasil. **Semina**, v. 29, n.3, p. 651-660, 2008.

FAGLIARI, J.J.; SILVA, S.L. Hemograma e proteinograma plasmático de eqüinos hípidos e de eqüinos acometidos por abdômem agudo, antes e após laparotomia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, n.6, p.559-567, 2002

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

FAGLIARI, J.J.; WEISS, D.J.; McCLENEHAN, D.; EVANSON, O. A. Serum protein concentrations in calves with experimentally induced pneumonic pasteurellosis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.4, p.383-387, 2003.

FERDOWSKI NIA, E.; GHORBANI, G. R.; RAHMANI, H. R.; ALIKHANI, M.; MOHAMMAD ALIPOUR, M.; NIKKHAH, A. Increased colostrum somatic cell counts reduce pre-weaning calf immunity, health and growth. **Journal of Animal Physiology & Animal Nutrition**, v. 94, n.5, p.628-634, 2010.

FEITOSA, F. L. F.; CAMARGO, D.G.; YANAKA, R.; MENDES, L.C.N.; PEIRÍ, J.R.; BOVINO, F.; LISBOA, J.A.N.; PERRI, S.H.V; GAPARELLI, E.R.F. Índices de falha de transferência de imunidade passiva (FTIP) em bezerros holandeses e nelores, às 24 e 48 horas de vida: valores de proteína total, de gamaglobulina, de imunoglobulina G e da atividade sérica de gamaglutamiltransferase, para o diagnóstico de FTIP. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.8, p.96-704, 2010.

FRANCIOSI, C.; ROCHA, T.G.; ERNANDES, P.P.; NOGUEIRA, C.A.S.; BARBOSA, J.C.; FAGLIARI, J.J. Teores de minerais e atividade da enzima gamaglutamiltransferase no soro colostrar de vacas das raças canchim e holandesa e influência do número de lactações. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 8., 2009, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Ciência Animal Brasileira, 2009. p. 232-237.

FRANZ, S.; FLOEK, M.; HOFMANN-PARISOT, M. Ultrasonography of the bovine udder and teat. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v. 25, n.3, p. 669–685, 2009

FOLCH, J. M.; DOVC, P.; MEDRANO, J. F. Differential expression of bovine b-lactoglobulin A and B promoter variants in transiently transfected HC11 cells. **Journal of Dairy Research**, v.66, n.4, p. 537-544, 1999.

FUHRMAN, M.P.; CHARNEY,P.; MUELLER, C.M. Hepatic proteins and nutrition assessment. **Journal of the American Dietetic Association**. v.104, n.8 ,p.1258-1264, 2004

GANHEIM, C.; HULTEN, C.; CARLSSON, U.; KINDAHL, H.; NISKANEN, R.; WALLER, K.P. The acute phase response in calves experimentally infected with bovine viral diarrhoea virus and/or Mannheimia haemolytica. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v.50, n.4, p.183–190. 2003.

GODDEN, S. Colostrum management for dairy calves. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v.24, n.1, p. 19-39, 2008.

GONZÁLEZ, F.H.D.; TECLES, F.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; TVARIJONAVICIUTE, A.; SOLER, L.; CERÓN, J.J. Acute Phase Protein Response in Goats. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v.20, n.5, p. 580-584, 2008.

GROUNLUND, U.; SANDGREN, C.H.; WALLER, K.P. Haptoglobin and serum amyloid A in Milk from dairy cows with chronic sub-clínical mastitis. **Veterinary Research**, v. 36, n.2, p. 191-198, 2005.

GRUNERT, E. Sistema genital feminine In: DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H-D.; STÖBER, M. **Rosenberger. Exame Clínico dos Bovinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. 419p.

GRUYS, E.; TOUSSAINT, M.J.M.; NIEWOLD T.A.; KOOPMANS S.J. Acute phase reaction and acute phase proteins. **Journal of Zhejiang University**. v.6B, n.11, p.1045-1056, 2005.

HAGIWARA, K.; KATAOKA, S.; YAMANAKA, H.; KIRISAWA, R.; IWAI, H. Detection of cytokines in bovine colostrum. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.76, n.3-4, p. 183-190, 2000.

HAGIWARA, K., YAMANAKA, H.; HISAEDA, K.; TAHARAGUCHI, S.; KIRISAWA, R.; IWAI, H. Concentrations of IL-6 in serum and whey from healthy and mastitic cows. **Veterinary Research Communication**, v.25, n.2, p.99–108, 2001.

HEESCHEN, W.; REICHMUTH, J. Mastitis: influence on qualitative and hygienic properties of milk. In: IDF INTERNATIONAL MASTITS SEMINAR, 3. 1995, Tel Aviv. **Proceedings....** Haifa: M. Lanchman Printers, 1995. p. 3-13.

HISAEDA, K.; HAGIWARA, K.; EGUCHI, J.; YAMANAKA, H.; KIRISAWA, R.; IWAI, H. Interferon- γ and tumor necrosis factor- α levels in serum and whey of cattle with naturally occurring Coliform mastitis. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.63, n.9, p.1009-1011, 2001.

HOGARTH, C.J.; FITZPATRICK, J.L.; NOLAN, A. M.; YOUNG, F.J.; PITT, A.; ECKERSALL, P.D.; Differential protein composition of bovine whey: a comparison of whey from healthy animals and from those with clinical mastitis. **Proteomics**, 2004, v.4, n.7, p. 2094–2100, 2004.

HOLANDA JUNIOR, E.V.; MADALENA, F.E.; HOLANDA, E.D.; MIRANDA, W.M.; SOUZA, M.R. Impacto econômico da mastite em seis fazendas de Araxá, Minas Gerais, Brasil. **Archivos Latinoamericanos de Produção Animal**, v.13, n.2, p.63-69, 2005.

HORADAGODA, N.U.; KNOX, K.M.G.; GIBBS, H.A.; REID, S.W.J.; HORADAGODA, A.; EDWARDS, S.E.R.; ECKERSALL, P.D. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. **The Veterinary Record**, v.144, n.6, p.437-441, 1999.

HUZZEY, J.M.; DUFFIELD, T.F.; LEBLANC, S. J.; VEIRA, D.M.; WEARY, D.M.; VON KEYSERLINGK, M.A.G. Short communication: haptoglobin as an early indicator of metritis. **Journal of Dairy Science**, v.92, n.2, p.621–625, 2009.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Laboratory methods for use in mastitis work. **Bulletin of IDF**, v. 132, p. 1-27, 1981

KATO, K.; MORI, K.; KATIH, N. Different protein patterns in normal and mastitic milks as revealed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **The Japanese Journal of veterinary Science**, v.51, n.6, p. 1275-1278, 1989.

JOHNSON, J. L.; GODDEN, S. M.; MOLITOR, T.; AMES, T.; HAGMAN, D. Effects of Feeding Heat-Treated Colostrum on Passive Transfer of Immune and Nutritional Parameters in Neonatal Dairy Calves. **Journal of Dairy Science**, v.90, n.11, p.5189–5198, 2007.

KAWAI, K.; HAGIWARA, S.; ANRI, A.; NAGAHATA, H. Lactoferrin Concentration in Milk of Bovine Clinical Mastitis. **Veterinary Research Communications**, v.23, n.7, p. 391–398, 1999.

KEHOE, S.I.; JAYARAO, B.M.; HEINRICHS, A.J. A survey of bovine colostrum composition and colostrum management practices on pennsylvania dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v.90, n.9, p.4108–4116. 2007

KITCHEN, B. J. Review of the progress of dairy science: bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. **Journal of Dairy Research**, v.48, n.1, p.167-188, 1981.

KNOWLES, T. G.; EDWARDS, J. E.; BAZELEY, K. J.; BROWN, S. N.; BUTTERWORTH, A.; WARRISS, R. D. Changes in the blood biochemical and haematological profile of neonatal calves with age. **Veterinary Record**, v.147, n. 21, p. 593-598, 2000.

KRUSE, V. Yield of colostrum and immunoglobulin in cattle at the first-milking after parturition. **Animal Production**, v.12, n.4, p. 619–626, 1970.

LAEMLLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

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

MADUREIRA, K.M. **Citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α , e INF- γ no sangue e colostro de fêmeas bovinas da raça holandesa. Importância na transferência de imunidade passiva.** São Paulo, 2011. 106 f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

MAO, F.C.; BREMEL, R.D.; DENTINE, M.R. Serum Concentrations of the Milk Proteins α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin in Pregnancy and Lactation: Correlations with Milk and Fat Yields in Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, v.74, n.9., p.952-2958, 1991.

MAUNSELL, F.P.; MORIN, D.E.; CONSTABLE, P.D.; HURLEY, W.L.; McCOY, G.C. Use of mammary gland and colostrum characteristics for prediction of colostrum IgG1 concentration and intramammary infection in Holstein cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.214, n.12, p.1817–1823, 1999.

MAUNSELL, F.P.; MORIN, D.E.; CONSTABLE, P.D.; HURLEY, W.L.; McCOY, G.C.; KAKOMA, I.; ISAACSON, R.E. Effects of Mastitis on the volume and composition of colostrums produced by Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.5, p.1291- 1299. 1998.

MEZA-NIETO, M.A.; B. VALLEJO-CORDOBA, B.; GONZALEZ-CORDOVA, A. F.; FELIX, L.; GOYCOOLEA, F. M. Effect of β -Lactoglobulin A and B Whey Protein Variants on the Rennet-Induced Gelation of Skim Milk Gels in a Model Reconstituted Skim Milk System. **Journal of Dairy Science**, v.90, n.2, p.582–593. 2007.

MILLER, R.H.; PAAPE, M.J.; FULTON, L.A. Variation in Milk Somatic Cells of Heifers at First Calving. **Journal of Dairy Science**, v.74, n.11, p.3782-3790, 1991.

MÜLLER, E.E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. In: ANAIS DO SUL- LEITE: SIMPÓSIO SOBRE SUSTENTABILIDADE DA PECUÁRIA LEITEIRA NA REGIÃO SUL DO BRASIL,2. 2002, Maringá. **Anais...** Toledo, 2002. p. 206-217.

MULLER, L.D.; ELLINGER, D.K. Colostral immunoglobulin concentrations among breeds of dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.64, n.8, p.1727-1730. 1981.

NAKAJIMA, Y.; MIKAMI, O.; YOSHIOKA, M.; MOTOI, Y.; ITO, T.; ISHIKAWA, Y.; FUSE, M.; NAKANO, N.; YASUKAWA,K. Elevated levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and interleukin-6 (IL-6) activities in the sera and milk of cows with naturally occurring coliform mastitis. **Research in Veterinary Science**, v.62, n.3, p.297–298, 1997.

NARDONE, A.; LACETERA, N.; BERNABUCCI, U.; RONCHI, B. Composition of colostrum from dairy heifers exposed to high air temperatures during late pregnancy and the early postpartum period. **Journal of Dairy Science**, v.80, n.5, p.838–844. 1997.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Laboratory handbook on bovine mastitis**. Arlington: The National Mastitis Council-NCM, 1999.

OHTSUKA, H.; KUDO, K.; MORI, K.; NAGAI, F.; HATSUGAYA, A.; M. TAJI-MA,M.; TAMURA, K.; HOSHI, F.; KOIWA,M.; KAWAMURA, S. Acute phase response in naturally occurring coliform mastitis. **Journal of Veterinary Mededical Science**, v.63, n.6, p.675–678, 2001.

OLIVER, S.P.; SORDILLO, L.M. Udder health in the periparturient period. **Journal of Dairy Science**, v.71, n.9, p.2584-2606. 1988.

OSTRENSKY, A. **Efeitos de ambientes sobre a contagem de células somáticas no leite de vacas da raça holandesa no Paraná.** 1999. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999.

PERINO, L.J.; SUTHERLAND, R.L.; WOLLEN, N.E. Serum gammaglutamyltransferase activity and protein concentration at birth and after suckling in calves with adequate and inadequate passive transfer immunoglobulin G. **American Journal of Veterinary Research**, v.54, p.56-59, 1993

PETRIE, L. Maximizing the absorption of colostral immunoglobulins in the newborn dairy calf. **The Veterinary Record**, v.114, n.7, p.157–163. 1984.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. **Mastitis: counter attack.** A strategy to combat mastitis. Illinois: Babson Brothers Company, 150p, 1991.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B. Clinical veterinary microbiology. London: Wolfe, 1994. p.237-242.

RAIMONDO, R.F.S.; POGLIANI, F.C.; CYRILLO, F.C.; NOGUEIRA, J.S.; BIRGEL JUNIOR, E. H. Avaliação do número de células somáticas do leite de bovinos da raça Jersey durante o primeiro mês de lactação. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. 6, p. 443-450, 2008.

RANDOLPH, H. E.; ERWIN, R. E.; RICHTER, R. L. Influence of Mastitis on Properties of Milk. VII. Distribution of Milk Proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 57, n.1, p.15-18, 1974.

RIOLLET, C.; PASCAL, R.; POUTREL, B.. Differential Induction of Complement Fragment C5a and Inflammatory Cytokines during Intramammary Infections with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.7, n. 2, p.161-167, 2000.

ROBERSON, J. R.; FOX, L. K.; HANCOCK, D. D.; GAY, J. M.; BESSER, T. E. Sources of Intramammary Infections from *Staphylococcus aureus* in Dairy Heifers at First Parturition. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.3, p.687–693, 1998.

ROBBLEE, E. D.; ERICKSON, P. S.; NWHITEHOUSE, N. L.; MCLAUGHLIN, A.M.; SCHWAB, C. G.; REJMAN, J. J.; ROMPALA, R.E. Supplemental lactoferrin improves health and growth of Holstein calves during the preweaning phase. **Journal of Dairy Science**, v.86, n.4, p.1458–1464, 2003.

ROCHA, T.G. **Avaliação da transferência de imunidade passiva em bezerros de vacas da raça Canchim**. 2010, 108 f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de ciências agrárias e veterinárias de Jaboticabal- UNESP, Jaboticabal, 2010.

RUEGG, P. New perspectives in udder health management. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v.28, n.2, p.149-163, 2012.

SANCHEZ, L.; LUJAN, L.; ORIA, R.; CASTILLO, H.; PEREZ, D.; MANUELENA, J.; CALVO, H. Synthesis of Lactoferrin and Transport of Transferrin in the Lactating Mammary Gland of Sheep. **Journal of Dairy Science**, v.75, n.5, p.1257-1262, 1992.

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

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

SCHEERLINCK, J.P.Y. Functional and structural comparison of cytokines in different species. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 72, n. 1-2, p. 39-44, 1999.

SCHROEDL, W.; JAEKEL, L.; KRUEGER, M. J. C-Reactive protein and antibacterial activity in blood plasma of colostrum fed calves and the effect of lactulose. **Journal of Dairy Science**, v.86, n.10, p.3313–3320, 2003.

SCHUTZ, V. J.; BECK, K.; DJIRE, M. Effect of mastitis on bovine colostrum. **Monatshefte fur Veterinarmedizin**. v.40, p.256–259, 1985.

SELIM, S.A.; SMITH, B.P.; CULLOR, J.S.; BLANCHARD, P.; FARVER T.B.; HOFFMAN, R.; DILLING, G.; RODEN L.; WILGENBURG, B. Serum immunoglobulins in calves: their effects and two easy, reliable means of measurement. **Veterinary medicine**, v.90, n.4, p.387-404. 1995.

SORDILLO, L.M.; STREICHER, K.L. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 7, n. 2, p. 135-146, 2002.

SORDILLO, L. M.; NICKERSON, S.C.; AKERS.R. M. Pathology of Staphylococcus aureus mastitis during lactogenesis: relationships with bovine mammary structure and function. **Journal of Dairy Science**, v.72, n.1, p.228–240,1989.

SORDILLO, L. M.; SHAFER-WEAVER, K.; DeROSA, D. Immunobiology of the mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v.80, n.8, p. 1851–1865, 1997.

SMITH, K.L.; TODHUNTER, D. A.; SCHOENBERGER, P.S. Enviromental Mastitis: Cause, Prevalence, Prevention. **Journal of Dairy Science**, v.68, n.6, p.1531-1553, 1985.

STRUFALDI, B. **Prática de bioquímica clínica**. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 1987.p. 399.

SWANSON, E.W.; POFFENBARGER, J.I. Mammary gland development of dairy heifers during their first gestation. **Journal of Dairy Science**, v.62, n.5, p.702-714, 1979.

SWEKER, W. S.; THATCHER, C.D.; EVERSOLE, D.E.; BLODGETT, D.J.; SCHURING, G.G. Effect of selenium supplementation on colostral IgG concentration in cows grazing selenium-deficient pastures and on postsuckle serum IgG concentration in their calves. **American Journal of Veterinary Research**, v.56, n.4, p.450–453, 1995.

THOMAS, J. S.; Overview of plasma protein. In: FELDMAN, B. F., ZINKL, J. G., JAIN, N. C. (Eds.) **Schalm's veterinary hematology**. 5th ed. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 891-898.

TIZARD, I.R. Imunidade no feto e no recém-nascido In: TIZARD I.R, **Imunologia veterinária: uma introdução**. 6. ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 233-246.

TSUJI, S.; HIRATA,Y.; MUKAI, F.; OHTAGAKI, S. Comparison of lactoferrin content in colostrum between different cattle breeds. **Journal of Dairy Science**, v.73, n.1, p.125–128.1990.

URECH, E.; PUHAN, Z.;SCHALLIBAUM, M. Changes in Milk Protein Fraction as Affected by Subclínical Mastitis. **Journal of dairy science**, v.82, n.11, p.2402–2411, 1999.

VELS, L.; RØNTVED, C. M.; BJERRING, M.; INGVARTSEN,K. L. Cytokine and acute phase protein gene expression in repeated liver biopsies of dairy cows with a lipopolysaccharide-induced mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.92, n.3, p.922–934, 2009

VIANA, L. C. **Duração das infecções naturais por estafilococos coagulase negativos e contagem de células somáticas em vacas primíparas.** Londrina, 2000. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2000.

WALDNER, C.L.; ROSENGREN, L.B. Factors associated with serum immunoglobulin levels in beef calves from Alberta and Saskatchewan and association between passive transfer and health outcomes. **The Canadian Veterinary Journal**, v.50, n.3, p.275-281, 2009.

WENZ, J.R.; FOX, L. K.; MULLER, F.J.; RINALDI ,M.; ZENG, R. ; BANNERMAN, D. D. Factors associated with concentrations of select cytokine and acute phase proteins in dairy cows with naturally occurring clinical mastitis. **Journal of Dairy Science** v.93, n.6, p.2458–2470, 2010.

WITTUM, T. E.; PERINO, L. J. Passive immune status at postpartum hour 24 and long-term health and performance of calves. **American Journal of Veterinary Research**, v.56, n.9, p.1149- 1154, 1995.

YAMANAKA, H.; HAGIWARA, K.; KIRISAWA, R.; IWAI, H. Transient detection of proinflammatory cytokines in sera of colostrum-fed newborn calves. **The Journal Veterinary Medical Science**, v.65, n.7, p.813-816, 2003

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. 4. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1999. 930 p.