UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA-UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

ASPECTOS CLÍNICO-LABORATORIAIS E SONOGRÁFICOS NO DIAGNÓSTICO COMPLEMENTAR DE LESÕES FIBRÓTICAS EM PARÊNQUIMA MAMÁRIO DE FÊMEAS OVINAS

Yuri da Silva Bonacin

Médico Veterinário

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA-UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

ASPECTOS CLÍNICO-LABORATORIAIS E SONOGRÁFICOS NO DIAGNÓSTICO COMPLEMENTAR DE LESÕES FIBRÓTICAS EM PARÊNQUIMA MAMÁRIO DE FÊMEAS OVINAS

Discente: Yuri da Silva Bonacin

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Marques

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Aléscio Canola

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Cirurgia Veterinária.

2021

B697a

Bonacin, Yuri da Silva

Aspectos clínico-laboratoriais e sonográficos no diagnóstico complementar de lesões fibróticas em parênquima mamário de fêmeas ovinas / Yuri da Silva Bonacin. -- Jaboticabal, 2021

104 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, Jaboticabal

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Marques

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Aléscio Canola

1. Leite. 2. Mastite. 3. Leite Proteínas. 4. Ultrassonografia. 5. Doenças crônicas. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ASPECTOS CLÍNICO-LABORATORIAIS E SONOGRÁFICOS NO DIAGNÓSTICO COMPLEMENTAR DE LESÕES FIBRÓTICAS EM PARÊNQUIMA MAMÁRIO DE FÊMEAS OVINAS

AUTOR: YURI DA SILVA BONACIN
ORIENTADOR: JOSÉ ANTONIO MARQUES
COORIENTADOR: PAULO ALÉSCIO CANOLA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. PAULO ALÉSCIO CANOLA (Participaçao Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

p/ Prof. Dr. VALEXKA ARABICANO GHELLER (Participaçao Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária-UFMG / Belo Horizonte/MG

p/ Prof. Dr. ANDRÉ MARCO SANTANA (Participaçao Virtual)
Departamento de Medicina Veterinária-UEM / Umuarama/PR

p/ Pós-doutorando VICTOR JOSÉ CORREIA SANTOS (Participaçao Virtual)
Depto de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

p/ Pós-Doutoranda DANIELA GOMES DA SILVA (Participaçao Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV - UNESP Jaboticabal

Jaboticabal, 15 de março de 2021

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

YURI DA SILVA BONACIN – nascido em Santa Rosa de Viterbo /SP, em 1º de setembro de 1989, filho de Alvaro Antonio Bonacin e Carla Maria da Silva Bonacin. Ingressou no curso de Medicina Veterinária em 2008, pela Universidade Federal do Paraná, campus Palotina, recebendo o título de Médico Veterinário em 2012. Concluiu o Programa de Aprimoramento Profissional em Medicina Veterinária e Saúde Pública, na área de Clínica Cirúrgica e Anestesiologia de Grandes Animais, junto ao Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel", com início em fevereiro de 2013 até fevereiro de 2015. Mestre em Cirurgia Veterinária (2015 - 2017) pelo Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), bolsista CAPES, sob orientação do Prof. Dr. José Antonio Marques e coorientação do Prof. Dr. Sérgio Britto Garcia.

“A ciência consiste em substituir o saber que parecia seguro por uma teoria, ou seja, por algo problemático”

(José Ortega y Gasset)

A Deus

Aos Meus pais Carla e Alvaro

e minha irmã Nabila

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que iluminou meu caminho durante esta jornada e tornou a realização deste sonho possível.

À minha mãe Carla e meu pai Alvaro, pelo dom da vida, amor incondicional, bem como pelos conselhos e total apoio em todas minhas escolhas pessoais e profissionais. Sem vocês nada disto seria possível.

À minha irmã Nabila pelo amor fraterno e longas conversas sobre o futuro.

À Samara, a qual me acompanhou por um longo período da minha vida, me apoiando e contribuindo de forma imprescindível para que me tornasse uma pessoa melhor e conseguisse lidar com todos os intemperes.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. José Antonio Marques, por todos os ensinamentos, apoio, conselhos, amizade, paciência e pela oportunidade que me foi dada no ano de 2012, sem a qual não seria possível o caminho até aqui. Agradeço pela confiança em ceder sua sala para que eu pudesse continuar, mesmo que de forma modesta, o seu trabalho como docente e iniciar minha carreira.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Paulo Aléscio Canola, o qual considero um grande amigo. Agradeço por todo incentivo, pelas longas e produtivas conversas e grande auxílio na confecção deste trabalho. Não poderia deixar de agradecer as oportunidades e confiança em mim depositadas dentro da Universidade, sem as quais eu não seria metade do profissional que hoje sou. Muito obrigado.

Aos amigos André Santana e Daniela Silva, por toda a disponibilidade e empenho nas análises das amostras lácteas realizadas durante o experimento, bem como por toda contribuição teórica. Sem a ajuda de vocês este trabalho não seria realidade.

Ao Prof. Dr. José Jurandir Fagliari por ceder o laboratório, aparelhos e técnicos para análise das amostras lácteas.

Aos amigos Victor Santos e Marjury Maronezi por toda a paciência, companheirismo e perseverança na obtenção das imagens e dados da elastografia. Vocês foram essências para a qualidade deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcus Feliciano, o qual disponibilizou seus orientados, tempo, bem como equipamento para a realização da elastografia. Obrigado pela confiança.

À Roselia, Michele e Bia, as quais foram de grande auxílio durante a realização da fase prática deste trabalho, dispensando excelentes cuidados com os animais, além do companheirismo e amizade, este trabalho tem um pouco de vocês.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal por ter me acolhido e contribuído para minha formação profissional, bem como a todos os colegas do Departamento de Clinica e Cirurgia Veterinária.

A direção do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel e funcionários do Setor de Grandes Animais por ceder alimentação e estadia aos animais, contribuindo para o bem-estar de todos.

Ao Centro Universitário Moura Lacerda por ceder os animais utilizados e disponibilizar o laboratório para realização das análises microbiológicas, através do intermédio da Prof. Dra. Naiá Lago e sua orientada Ana Carolina.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigado.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

SUMÁRIO

Página

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS iii
RESUMO iv
ABSTRACT vi
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS 1
1. Introdução 1
2. Revisão de Literatura 2
2.1 Anatomia 3
2.2 Etiologia das mastites 6
2.3 Qualidade do leite e contagem de células somáticas 8
2.4 Proteinograma 11
2.5 Elastografia ARFI 14
3. Objetivo Geral 16
3.1 Objetivos específicos 16
4. Referências 16
CAPÍTULO 2 – Análise da composição láctea e avaliação por técnicas de imagem da glândula mamária de ovelhas. Parte 1: A presença de lesões fibrosas no parênquima pode alterar a resposta de proteínas de fase aguda na mastite subclínica?[1] **..... 31**
Resumo 31
1. Introdução 32
2. Material e Métodos 36
2.1 Animais 36
2.2 Colheita de amostras lácteas 37
2.3 Contagem de células somáticas 38
2.4 Proteína total e fracionamento eletroforético por gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 39
2.5 Análise Estatística 40
3. Resultados 41
3.1 Contagem de células somáticas 41
3.2 Proteína total e Fracionamento eletroforético (SDS-PAGE) 42
4. Discussão 46
5. Conclusão 54

6. Referências.....54
CAPÍTULO 3 – Análise da composição láctea e avaliação por técnicas de imagem da glândula mamária de ovelhas. Parte 2: A elastografia ARFI da glândula mamária e linfonodo supramamário pode ser utilizada como ferramenta auxiliar ao diagnóstico de mastite subclínica em fêmeas ovinas naturalmente infectadas?[1] **.....65**
Resumo.....65
1. Introdução.....67
2. Material e Métodos.....70
2.1 Animais.....70
2.2 Colheita de amostras lácteas.....70
2.3 Contagem de células somáticas.....71
2.4 Ultrassonografia modo B de lesões fibrosas e parênquima mamário.....71
2.5 Elastografia ARFI de lesões fibrosas e parênquima mamário.....72
2.6 Ultrassonografia modo B dos linfonodos supramamários.....72
2.7 Elastrografia ARFI dos linfonodos supra-mamários.....73
2.8 Análise estatística.....73
3. Resultados.....73
4. Discussão.....78
5. Conclusão.....82
6. Bibliografia.....83

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **"Uso da elastografia ARFI para diagnóstico complementar de lesões nodulares em parênquima mamário, induzidas por mastite infecciosa crônica em fêmeas ovinas"**, protocolo nº 017013/18, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Yuri da Silva Bonacin, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 06 de dezembro de 2018.

Vigência do Projeto	15/12/2018 a 15/09/2019
Espécie / Linhagem	*Ovis aries*/ Mista
Nº de animais	30
Peso / Idade	50kg/ 5 anos
Sexo	Fêmeas
Origem	Propriedade privada

Jaboticabal, 06 de dezembro de 2018.

Fabiana Pilarski

Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEU

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal/ SP - Brasil
tel 16 3209 7100 www.fcav.unesp.br

ASPECTOS CLÍNICO-LABORATORIAIS E SONOGRÁFICOS NO DIAGNÓSTICO COMPLEMENTAR DE LESÕES FIBRÓTICAS EM PARÊNQUIMA MAMÁRIO DE FÊMEAS OVINAS

RESUMO – O presente estudo avaliou 27 fêmeas ovinas e suas glândulas mamárias, no 60º dia de lactação. Os objetivos foram a detecção de alterações nas concentrações das proteínas do soro lácteo, contagem de células somáticas frente à mastite crônica e subclínica de ocorrência natural, bem como o possível uso da elastografia por impulso de força de radiação acústica (ARFI) como diagnóstico de mastite em glândulas com parênquima fibrosado. Os grupos experimentais foram divididos de acordo com a CCS em: GC com CCS < 500.000 cls/ml sem fibrose em parênquima; Baixa contagem de células somáticas (CB) com CCS < 500.000 cls/ml e presença de fibrose na glândula; CA com CCS > 500.000 cls/ml e presença de fibrose. Para a análise das proteínas e CCS, foram utilizadas 48 amostras de soro lácteo. A CCS obtida nos três grupos apresentou valores médios de 136,63 x 10^3 ± 98,09 cls/ml, 122,06 x 10^3 ± 94,83 cel/ml e 3.979,55 x 103 ± 2943,81 cls/ml. Através do método SDS-PAGE, foi possível identificar seis proteínas: Lactoferrina, Albumina Sérica, IgG Pesada, IgG Leve, β-lactoglobulina e α-lactoalbumina. Através da comparação entre grupos, notou-se aumento da Lactoferrina entre GC e CA, aumento da albumina sérica entre CB e CA e aumento da IgG de cadeia pesada entre GC e CA, bem como entre CB e CA. Acredita-se que o valor limite de CCS em 500.000 cls/ml seja seguro para a detecção de mastites subclínicas. O aumento da albumina sérica e IgG de cadeia pesada em animais que possuem lesões no parênquima e CCS alta, quando comparados aos demais grupos pode indicar a presença de mastite. Não houve diferenças na composição proteica avaliada que diferenciasse glândulas sadias de fibrosas, dentro da mesma faixa de CCS. Cabe ressaltar que há a necessidade de estudos avaliando outros componentes lácteos, bem como compará-los ao grau de fibrose da glândula. O parênquima mamário e linfonodos também foram submetidos à ultrassonografia em modo-B, com posterior elastografia ARFI, obtendo-se variáveis qualitativas (ecogenicidade e ecotextura) e quantitativas (velocidade de cisalhamento, profundidade e proporção eixo curto/longo) de 52 glândulas mamárias. Através da elastografia ARFI em áreas sadias da glândula nos grupos, foi possível observar aumento da velocidade de cisalhamento ($p<0,05$) no grupo CB quando comparado ao grupo GC, o que ocorreu também quando comparados CB e CA. Quando comparadas as áreas de fibrose nos grupos CB e CA, com suas respectivas áreas normais, a velocidade aumentou nos dois grupos: CB ($p<0,05$; $t= 4,07$) e CA ($p<0,05$; $t= 6,92$). Ao comparar as áreas de fibrose em CB e CA com o parênquima de GC, houve aumento em CB ($p<0,05$; $t=4,95$) e CA ($p<0,05$; $t=5,49$). Ao avaliar o linfonodo supramamário de cada glândula, a velocidade de cisalhamento aumentou quando comparados os grupos GC e CA ($p<0,05$, $T=2,11$), apresentando-se maior no último. Os resultados da ultrassonografia em modo-B apontam predomínio da ecogenicidade hipoecóica nos linfonodos, bem como redução da proporção do eixo curto/longo em casos de mastite subclínica ativa. A eslatografia ARFI pode indicar pontos de corte para que haja diferenciação de um processo de mastite ativa de mastites que já se curaram, seu uso é excelente ferramenta para diferenciação das áreas normais de

áreas fibrosadas em parênquima. A avaliação nos linfonodos supramamários, com altas velocidades de cisalhamento, podem indicar mastites, porém o comportamento no parênquima mamário é diferente, produzindo maiores valores em mastites já crônicas, necessitando de estudo com mais animais e mastites induzidas artificialmente, para padronização de valores de corte.

Palavras-chave: Fibrose, Leite, Modo-B, Proteinograma, Proteoma, Ultrassom

CLINICAL-LABORATORY AND SONOGRAPHIC ASPECTS IN THE COMPLEMENTARY DIAGNOSIS OF FIBROTIC LESIONS IN THE BREAST PARENCHY OF EWES

ABSTRACT – The present study evaluated 27 ewes and their mammary glands, on the 60th lactation day. The aims were the detection in whey proteins, somatic cell count against chronic and subclinical mastitis, as well as the possible use of ARFI elastography as a diagnosis tool of mastitis in glands with fibrous parenchyma. The experimental groups were divided according to the SCC into: GC with SCC<500,000 cls/ml without parenchyma fibrosis; CB with SCC <500, cls/ml and presence of fibrosis; CA with CCS> 500,000 cls/ml and fibrosis. For proteins and SCC, 48 samples of milk serum were used. The SCC obtained in the three groups showed mean values of 136.63 x 10^3 ± 98.09 cell / ml, 122.06 x 10^3 ± 94.83 cell / ml and 3,979.55 x 10^3 ± 2943.81 cls/ml. Through the SDS-PAGE method, it was possible to identify six proteins: Lactoferrin, Serum Albumin, Heavy IgG, Light IgG, β-lactoglobulin, and α-lactoalbumin. According to the group's analysis, there was an increase in lactoferrin between GC and CA, an increase in serum albumin between CB and CA, and an increase in heavy IgG between GC and CA, as well as between CB and CA. The CCS high limit value of 500,000 cls/ml is believed to be safe for the detection of subclinical mastitis. The increase in serum albumin and heavy IgG in animals with lesions in the parenchyma and high CCS, when compared to the other groups, may indicate the presence of active mastitis. There were no differences in the protein composition evaluated that differentiated healthy and fibrous glands, using the same CCS range. Major studies evaluating other whey components, as well as comparing them to the degree of gland fibrosis are needed. The mammary parenchyma and supramammary lymph node were also submitted to B-mode ultrasonography, with subsequent ARFI elastography, obtaining qualitative (echogenicity and echotexture) and quantitative (shear speed, depth and short/long axis ratio) variables from 52 mammary glands. Through ARFI elastography in healthy areas of the gland in the groups, it was possible to observe an increase in shear velocity ($p < 0.05$) in CB group when compared to the GC group, which also occurred when comparing CB and CA. When comparing the fibrous areas in the CB and CA groups, with their respective normal areas, the speed increased in the two groups: CB ($p < 0.05$; $t = 4.07$) and CA ($p < 0.05$; $t = 6.92$). When comparing the areas of fibrosis in CB and CA with the parenchyma of GC, there was an increase in CB ($p < 0.05$; $t = 4.95$) and CA ($p < 0.05$; $t = 5.49$). When assessing the supramammary lymph node of each gland, the shear velocity increased when the groups GC and CA were compared ($p < 0.05$, $T = 2.11$), being higher in the last one. The results of B-mode ultrasonography indicate a predominance of hypoechoic echogenicity in nodes, as well as a reduction in the proportion of the short/long axis in cases of active subclinical mastitis. ARFI elastography can indicate cut off points for differentiating an active mastitis process from mastitis that has already healed, its use is an excellent tool for differentiating normal areas from fibrous areas in the parenchyma. The evaluation in the supramammary lymph nodes, with high shear speeds, may indicate active mastitis, but the behavior in the mammary parenchyma is different, producing higher values in already chronic mastitis, Further studies are needed using more animals and artificially induced mastitis, for standardization cut off values.

Keywords: Fibrosis, Milk, B-mode, Proteinogram, Proteoma, Ultrassound

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. Introdução

A inflamação da glândula mamária, precedida ou não por processo infeccioso, é descrita como mastite, a qual é uma das mais importantes doenças em rebanhos leiteiros, podendo causar mortalidade e redução na produção leiteira, além de descarte antecipado dos animais (Bergonier e Berthelot, 2003). Quando quantificada a produção mundial de leite em todas as espécies animais, os ovinos contribuem com apenas 1,26% do montante final (FAO, 2018), porém é uma área em expansão no Brasil, o qual produziu 1.652.000 litros de leite em 2017, onde 60% é oriundo da agricultura familiar (IBGE, 2017). Em geral, o leite ovino é destinado à fabricação de queijos finos, com alto valor agregado (Manca et al., 2016), além de desempenhar importante papel na subsistência de comunidades carentes e países subdesenvolvidos (Wodajo et al., 2020).

De forma majoritária, as mastites são de origem infecciosa, onde frequentemente é possível isolar bactérias do gênero *Staphylococcus* spp., promovendo mastites clínicas (Contreras et al., 2007; Arsenault et al., 2008), além de bactérias do gênero *Streptococcus* e outras menos incidentes, causando mastites subclínicas (Bergonier et al., 2003; Gonzalo et al., 2004; Contreras et al., 2007).

Para o diagnóstico da mastite subclínica, utiliza-se a Contagem de Células Somáticas do leite (Gonzalo et al., 2010) e o California Mastits Test (Clements; Taylor; Fitzpatrick, 2003). Porém, o padrão ouro é resumido à cultura bacteriana das amostras lácteas (Fthenakis, 2004; Contreras et al., 2007; Fragkou; Boscos; Gonzalo et al., 2010; Fthenakis, 2014). Ademais, outras técnicas podem ser utilizadas no intuito de identificar componentes do leite, os quais possam determinar a ocorrência de um processo infeccioso ativo, tal como a identificação de proteínas inflamatórias em sangue e soro lácteo, dentre elas a técnica de fracionamento eletroforético em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (Gordon, 1985), a qual possui eficiência comprovada em medicina veterinária (Hogarth et al., 2004; Alonso-Fauste et al., 2011; Santana et al., 2018). Outros métodos de detecção em tempo real do processo inflamatório da glândula mamária, tal como a ultrassonografia em modo-

B, podem ser utilizados e também possuem eficácia comprovada, ao diferenciar mastites em ovelhas (Hussein, El-Khabaz, Malek, 2015; Barbagianni et al., 2016). Além do parênquima mamário, os linfonodos supramamários são importante local a ser escaneado e segundo Bradley e colaboradores (2001), são representativos de processo inflamatório, quando apresentam linfadenomegalia.

Hodiernamente, houve o aperfeiçoamento de técnicas ultrassonográficas, sendo possível, através de software e aparelho específico, a mensuração de forma qualitativa e quantitativa, da força de cisalhamento do impulso sônico, técnica descrita como elastografia por Força de Impulso de Radiação Acústica (ARFI) (Nightingale, 2011). Esta técnica é utilizada na medicina humana, para diferenciação em tempo real de tumores mamário malignos de benignos (Zhou et al., 2016), bem como para o mesmo propósito, em medicina veterinária (Feliciano et al., 2017).

De acordo com a literatura consultada (Bergonier, Berthelot, 2003; Radaelli et al., 2011), as mastites podem causar perdas quantitativas e qualitativa na produção leiteira, através da substituição do parênquima normal, por tecido fibroso, diminuindo assim a capacidade produtiva, porém não existem estudos comparando a qualidade do leite em ovinos portadores crônicos. No intuito de diagnosticar mastites crônicas em glândulas mamárias de fêmeas ovinas, bem como diferenciar este processo em animais que ainda apresentam processo inflamatório ativo, o proteoma de soro lácteo de glândulas com alta contagem de CCS e fibrose, comparado a glândulas com baixa CCS, pode prover importantes informações quanto à qualidade do leite. Auxiliar ao proteinograma, a elastografia ARFI, pode compor uma importante ferramenta diagnóstica auxiliar, em tempo real, no intuito de diferenciar processos crônicos ainda ativos, podendo auxiliar no acompanhamento de tratamentos e manutenção de animais no rebanho, evitando o descarte precoce.

2. Revisão de Literatura

2.1 Anatomia

O úbere da fêmea ovina é composto por duas metades, independentes, em formato hemisférico, ligeiramente demarcados externamente (Singh, 2018). As duas metades são denominada glândulas mamárias e se originam na embriogênese, através do espessamento bilateral da ectoderme, criando duas cadeias mamárias que se estendem da axila até a região inguinal. No entanto, nos ovinos ocorre o desenvolvimento apenas do último par de glândulas (Fails e Magee, 2018). As raças ovinas leiteiras possuem conformação do úbere mais próxima à das cabras, com apresentação pendulosa do aparato, possuindo algumas vezes partes do velo na porção mais proximal (Singh, 2018).

Cada glândula funciona de forma independente, atuando como um sistema túbulo-alveolar, separado da glândula adjacente por tecido conectivo (Delouis e Richard, 1991; Fails, Magee, 2018; Singh, 2018). Toda a glândula é composta por diferentes tecidos, com diferentes funções (Akers, 2017). O tecido epitelial da glândula mamária dos ovinos é composto, em sua maioria, por uma camada dupla de células não secretórias, interligadas, podendo conter macrófagos e linfócitos entre os espaços. A camada basal é composta por células achatadas e a camada superficial por células descritas como cubóides ou cuboidais. As células secretórias estão presentes, em sua maioria, no epitélio do seio da glândula, sendo raras nos tetos. Quando existem amontoados destas células, estes dão origem aos alvéolos, os quais compõe os lóbulos (Brooker, 1984), que sintetizam e secretam leite através da interação entre células específicas (Akers, 2017). O leite ejetado é transferido para o sistema de túbulos, descritos como ductos lactíferos (Singh, 2018), podendo conter de 10 a 15 túbulos (Tsioli e Fthenakis, 2019), os quais se conectam no seio da glândula (*sinus lactiferus*) e confluem migrando para o teto (Singh, 2018). O seio da glândula, na fêmea ovina, pode armazenar de 20 a 80 mL de leite, com produção contínua, o qual drena para o seio da papila mamária, esfíncter e assim chega ao exterior da glândula (Tsioli e Fthenakis, 2019). A proporção de células de tecido conectivo e secretório, são reguladas por hormônios endógenos, e se alteram quando ocorre a lactação, assim ocorre aumento de tecido secretório, retornando à maior proporção do conectivo ao final da lactação. O sistema endócrino ainda regula a mamogênese, lactogênese e galactopoiese (Knight e Peaker, 1984).

Os tetos ou papilas mamárias são inseridos em ângulos variáveis, de 37 a 46º em relação ao corpo da glândula ipsilateral, medindo de 3,2 a 4,2 cm de comprimento (Rovai et al., 2008). Em toda sua extensão, a papila mamária é composta por cinco camadas de tecido, iniciando-se externamente pela pele, a qual possui epitélio escamoso estratificado, mais internamente encontra-se a camada de tecido muscular, posteriormente a camada de tecido conectivo, seguida pela submucosa e por último a mucosa, a qual irá dar origem ao seio da papila (*sinus papillaris*) (Tsioli e Fthenakis, 2019). A divisão entre o seio da glândula e seio da papila possui leve elevação circular, chamada de *annulus*, o qual contém um vaso e células musculares (Fails e Magee, 2018). A última estrutura, distal, é o ducto papilar (*ductus papillaris*), o qual comunica o seio do teto com o orifício do teto, possuindo de 0,5 a 1cm de comprimento, compondo importante barreira fisiológica e anatômica frente a penetração de bactérias, o qual é delimitado dorsalmente pela roseta de Furstenberg (Plummer e Plummer, 2012). Esta estrutura possui ainda o esfíncter mamário, o qual é composto pobremente de músculos nos ovinos, sendo assim necessária sua barreira por tecido elástico ao final, compondo o orifício do teto (Fails e Magee, 2018). Algumas ovelhas podem apresentar politelia, a qual segundo Fails e Magee (2008), não possuem tecido conectivo com o resto da glândula, tal como ocorre em bovinos. Por outro lado, Hardwick et al. (2020) descrevem que este tipo de anomalia contempla células de defesa e algumas conexões com a glândula mamária adjacente, servindo como potencial causador de infecções.

O aparato mamário possui importante estrutura de fixação e sustentação, a qual contempla os ligamentos suspensores laterais (2) e mediais (2). Os ligamentos mediais são compostos por material fibroelástico e possuem origem na túnica flava e uma pequena parte se origina no tendão sinfiseano, se estendendo por toda região medial entre as duas metades mamárias. Já os laterais são compostos de tecido fibroso denso, conferindo menor elasticidade, e se originam de aponeuroses próximas ao canal inguinal, sínfise pélvica e tendão pré-púbico, se estendendo lateral às metades mamárias. Os ligamentos se conectam caudal e cranial aos ligamentos mediais, circundando toda a estrutura mamária (Fails e Magee, 2018; Singh, 2018; Tsioli e Fthenakis, 2019). A conexão entre as duas glândulas mamárias

independentes forma o sulco do úbere, estrutura visível caudal e cranial, sobre a qual os ligamentos mediais se adelgam no sentido dorso-ventral (Fails e Magee, 2018).

A irrigação presente no local é numerosa e necessária, possuindo várias origens, iniciando-se pela artéria pudenda externa, a qual se origina na veia cava caudal e nutre a glândula através do canal inguinal (Fails e Magee, 2018). Antes de adentrar o canal inguinal, a artéria se bifurca e origina o tronco pudendo epigástrico, do qual um ramo continua o trajeto ventral-cranial e origina a artéria epigástrica caudal profunda e outro ramo origina a artéria pudenda externa, que ao transpassar os anéis inguinais, se torna a artéria mamária. No interior da glândula, a artéria mamária se divide em dois ramos, o cranial e medial, ainda se subdividindo em artérias ventral labial, caudal basal e caudal, além de pequenos ramos que se comunicam com o sistema linfático (Adam et al., 2016). A artéria perineal ventral também auxilia na irrigação, porém com menor aporte, desta forma a irrigação se completa com a artéria epigástrica cranial superficial (Fails e Magee, 2018). As estruturas de drenagem são bastante complexas, iniciando-se no arranjo de vasos na base do úbere, os quais recebem o sangue da região mais distal e menos calibrosa (Singh, 2018). Inicia-se em ambos os lados pelas veias pudendas externas, as quais acompanham as artérias pudendas externas, através do canal inguinal, possuindo conexão cranial com a veia epigástrica caudal superficial do respectivo lado. Já a conexão caudal é realizada com as veias perineais (Fails e Magee, 2018; Singh, 2018). Por sua vez, a veia epigástrica caudal superficial segue o plano sagital sentido crânio-ventral, confluindo para a veia epigástrica cranial superficial, a qual adentra a cavidade abdominal, e posteriormente drena para a veia torácica interna e veia cava cranial (Fails e Magee, 2018; Tsioli e Fthenakis, 2019).

A drenagem linfática ocorre nas duas glândulas através dos linfonodos inguinais superficiais, localizados dorso-craniais, os quais se conectam à extensa rede de veias, que podem ser ou não visíveis macroscopicamente no aspecto dorso-caudal (Fails e Magee, 2018). Os canais linfáticos acompanham o caminho das veias pudendas externas bilateralmente, passando através do canal inguinal. Geralmente há uma ligação maior do canal linfático com a veia pudenda externa, porém podem ocorrem várias pequenas anastomoses, as quais seguem o mesmo caminho (Yen et al., 2016). O caminho eferente da linfa se conecta ao linfonodo iliofemoral e conseguinte ao ilíaco

femoral, chegando ao tronco lombar e consequentemente à veia subclávia (Yen et al., 2019).

Todo o úbere é inervado com derivações dos nervos lombar e, em menor número através dos nervos sacrais. O nervo pudendo pode emitir ramificações através das vértebras sacrais de dois a cinco, mais comumente da terceira, possuindo trajeto caudal ao úbere e inervando esta área (Linzell, 1959). O nervo genitofemoral possui ramificações da segunda à quinta vértebras lombares, inervando os tetos (Tsingotjidou e Papadopoulos, 2003), o qual atravessa o canal inguinal e emite ramos também nos tecidos mais profundos da glândula (Singh, 2018). Ademais, os ramos ventrais da segunda vértebra lombar, sensibilizam a região ventral do abdômen e cranial das glândulas (Linzell, 1959; Singh, 2018).

2.2 Etiologia das mastites

A mastite é descrita como a inflamação da glândula mamária, de etiologia multifatorial, a qual na maioria dos casos é causada por invasão de patógenos infecciosos, em menor número por traumas, reações de hipersensibilidade e neoplasias (Menzies e Ramanoon, 2001). Especificamente nos ovinos, de forma majoritária, as infecções intramamárias são causadas por bactérias descritas na literatura como “não específicas”, lentivírus e micoplasmas (Bergonier e Berthelot, 2003).

O agente etiológico habitual são as bactérias do gênero *Staphylococcus* spp., em sua maioria *Staphylococcus aureus*, os quais são responsáveis pela maioria das mastites clínicas. Não obstante, podem ser encontradas cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa, os quais promovem mastites subclínicas (Bergonier, Berthelot, 2003; Contreras et al., 2007; Arsenault et al., 2008) . Em menor número, porém responsáveis por manifestações clínica severas, aparecem as mastites causadas por *Streptococcus* spp., *Mannheimia haemolytica, Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosa, Corinebacterium, Aspergillus fumigatus, Serratia marcescens e Burkholdelia cepacia* (Bergonier et al., 2003; Gonzalo et al., 2004; Contreras et al., 2007).

De acordo com a epidemiologia e sintomatologia, as mastites podem ser divididas em clínicas e subclínicas (Bergonier et al., 2003). O acometimento clínico da glândula, por patógenos ascendentes, pode resultar em áreas palpáveis manualmente de consistência irregular, aparecimento de abscessos, alterações de tamanho do úbere e alteração das características organolépticas do leite, onde a maioria dos microrganismos isolados nestes casos são do gênero *Staphylococcus spp.* (Menzies, Ramanoon, 2001). As mastites causadas por bactérias do gênero *Staphylococcus* causam quadro clínico característico, com endurecimento do parênquima mamário, devido a invasão sistemática do tecido e formação de tecido fibroso, processo irreversível. Podem ocorrer pequenos abscessos e severa involução da cisterna mamária, causando redução na produção leiteira e produção de filhotes debilitados (Fthenakis et al., 2004). As alterações clínicas podem ser divididas em quatro categorias, descritas por Quinlivan (1968) e ainda utilizadas. Na categoria 1 o parênquima mamário possui pequenas lesões fibrosas, secreção de leite normal, aparentando lesões crônicas. Categoria 2 tem maior área de fibrose, secreção látea de aspecto variando entre normal a purulenta ou agalactia por fibrose do teto, demonstrando cronicidade. A categoria 3 inclui edema do úbere, produção de leite com aspecto variando de normal, diluído, seroso ou purulento; podem ocorrer abscessos ou degeneração do parênquima por ruptura, demonstrando caráter agudo. Categoria 4 contempla ainda severa inflamação do parênquima do úbere, secreção láctea serosa, com presença intermitente de conteúdo purulento e fibrinoso; aumento de volume em linfonodos supramamários e hipertermia generalizada, caracterizando quadro peri-agudo.

Já a mastite subclínica, promove aumento de células somáticas no leite, em menor número que as clínicas, promovendo também inflamação do parênquima mamário, a qual muitas vezes é identificada apenas com biópsias e sua característica marcante é a redução na produção leiteira (Fthenakis e Jones, 1990). Já as características organolépticas e qualidade do leite também podem ser influenciadas, gerando descarte na indústria (Alba et al., 2019).

2.3 Qualidade do leite e contagem de células somáticas

A qualidade do leite é um importante fator a ser analisado em uma cadeia produtiva, a qual é composta de inúmeros fatores, dentre eles as características organolépticas, nutricionais e relacionadas à higiene na obtenção e manipulação do leite, bem como definição da composição nutricional, pesquisa por resíduos químicos, além de investigação de práticas de adulteração (Moncayo et al., 2017). Pode-se mensurar a qualidade através da contagem e cultura bacteriológica, conjuntamente com a quantificação da contagem de células somáticas (CCS) (Park et al., 2013). Este último parâmetro está relacionado à invasão da glândula mamária por microrganismos, os quais promovem migração leucocitária local, promovendo significativo aumento de neutrófilos na secreção láctea, oriundos da extensa irrigação sanguínea local (Burvenich et al., 1995). Na glândula infectada, as células de defesa podem representar até 99% das células presentes no leite (Philpot, Nickerson, 1991). Desse modo, o aumento de CCS do leite pode indicar o grau de infecção da glândula mamária, expressando a gravidade da inflamação (Machado et al., 2000). Assim sendo, a CCS é utilizada para avaliar a saúde do úbere, a qualidade e higiene do leite e para o monitoramento em programas de controle de mastite (Pyörälä, 2003). A União Européia através da Legislação Nº 853/2004 do Parlamento, considera que o leite bovino aceitável deve ter CCS<400.000 cls/mL, sem descrição de valores para ovinos (UNIÃO EUROPEIA, 2004); o Código de Regulação Federal nos Estados Unidos da América, autoriza a utilização de leite caprino com até 1.000.000 cls/ mL, porém não limita o leite ovino, mantendo valores de até 750.000 para bovinos (USDA, 2006); no Brasil a Instrução normativa vigente (Nº 76/2018), define apenas a contagem de CCS máxima em bovinos para <500.000 cls/ mL (BRASIL, 2018).

Segundo Gonzalo e colaboradores (1994), a proporção da CCS é inversa à produção leiteira, já os valores considerados normais ou indicativos de mastite subclínica em ovinos, diferem amplamente na literatura. Contagem celular de até 500.000 cls/ mL é considerada normal para Berthelot et al. (2006), já González-Rodríguez et al. (1995) cita 300.000 cls/ mL como limite entre normal e mastites subclínicas, o que está próximo do valor de 400.000 cls/ mL, descrito por Kern et al. (2013) em ovelhas com aptidão para produção de carne.

A contagem de células somáticas (CCS) é uma importante ferramenta diagnóstica complementar, a qual pode ser afetada por características fenotípicas do úbere, tal como altura do chão e inserção das papilas mamárias (Legarra e Ugarte, 2005). O estado sanitário do rebanho pode ser uma característica importante no aumento da contagem celular, já que as amostras geralmente são coletadas em tanques de armazenamento (Gonzalo et al., 1994). Ainda pode ser considerado o estágio da lactação, onde naturalmente a CCS de ovelhas no dia do parto é alta, com contagem média de 596 x 10^3 cls/ mL, a qual diminui de forma gradativa, à medida que a produção de colostro cessa, atingindo 239 x10^3 cls/ mL ao quinto dia de lactação e 186 × 10^3 cls/ mL ao 12º dia (Paape et al., 2007). A partir do 75º dia de lactação até o fim, ocorre aumento expressivo da contagem (30 a 32,5%), o que segundo Gonzalo et al., (1994), pode ser natural ou mesmo indicar processo infeccioso/ inflamatório em desenvolvimento, destarte Paape e colaboradores (2007) descrevem que os índice caem de forma gradativa até o pico da lactação (quinta semana), atingindo valor médio de 30 x 10^3 cls/ mL, o qual se mantém até o final do ciclo produtivo. Em estudo realizado no Brasil, Zafalon et al. (2016) compara a contagem celular em ovelhas das raças Santa Inês e Morada Nova, ambas de aptidão para carne, notando maior incidência de mastites e maior número de CCS no período pós-parto, quando comparado ao período seco, em ambas raças.

Quando comparadas as diferentes aptidões, ovelhas de raças específicas para produção leiteira possuem menor contagem celular no leite, já as ovelhas para produção de carne tem maior número (Kern et al., 2013). Já Mioč et al. (2009), em estudo com raças de carne puras e cruzamentos com raças leiteiras, cita um índice maior de CCS nas raças leiteiras e cruzadas. A contagem pode sofrer adição de acordo com o número de lactações, podendo aumentar em 14% da segunda para a quarta, sendo que a partir desta última a saúde da glândula se encontra prejudicada, impactando negativamente na qualidade do leite e seus subprodutos (Pugliese et al., 1999).

Quando considerado o número de filhotes nascidos por cria, o nascimento de gêmeos promove aumento de 8,6% na CCS (Gonzalo et al., 1994), o que também ocorre dependente do período do ano em que a lactação se inicia. Segundo Zafalon et al. (2016), em estudo realizado no Brasil, ocorre maior número de CCS e incidência

de mastite no período chuvoso, já que os animais ao permanecerem maior tempo abrigados, aumentam a lotação dos abrigos e este fato possibilita o maior contágio ou contaminação ambiental.

Os estudos nacionais sobre mastite se iniciaram com o primeiro relato da doença, ainda descrita como mamite, através do relato de um surto ocorrido na região Sul, identificando-se *Staphylococcus aureus* como agente etiológico (Fernandes, Cardoso, 1985). A prevalência desta doença é variável em rebanhos nacionais e internacionais. Geralmente a incidência anual de mastite clínica não ultrapassa 5%, com prevalência de 5% a 30% tanto em rebanhos de carne quanto leiteiros, porém esse valor é dependente da presença ou não de fatores que possam desencadear a mastite (Bergonier, Berthelot, 2003; Contreras et al., 2007). Pereira et al. (2018) relatam a prevalência em um rebanho nacional com aptidão para carne, com dados variando entre 20% a 30,8%. Não existem dados sobre a incidência de mastite subclínica em rebanhos ovinos, já a prevalência alcança 5% a 30% em ovinos com aptidão para carne (Kirk, Gleen, 1996), Pereira e colaboradores (2018), relatam a média de um rebanho nacional com prevalência de 11,8% a 30,8%.

Em estudo com determinação de cepas bacterianas e CCS, Gonzalo e colaboradores (2002) relatam que infecções por *Staphylococcus* spp. produzem em média $2x10^6$ cls/ mL, comprovando a eficácia clínica da quantificação das células inflamatórias. No entanto, embora o aumento de CCS no leite possa indicar o grau de infecção da glândula mamária, métodos para detecção de mastite no leite, que possam predizer a CCS de forma qualitativa e indicar a severidade do quadro de forma rápida e precisa são de grande interesse. Dentre estes métodos está o estudo de proteínas do soro lácteo, as quais podem ser utilizadas como indicadores de inflamação do úbere durante a mastite, assim perfazem importante ferramenta pode na detecção de glândulas mamárias comprometidos (Pyörälä, 2003). Além do diagnóstico, as técnicas descritas, podem ser úteis no prognóstico da mastite instalada e no monitoramento e recuperação do animal convalescente.

Além da CCS, outra importante ferramenta diagnóstica indireta é o uso do púrpura de bromocresol em amostras de leite, teste descrito como California Mastitis Test (CMT), o qual causa quebra da parede de células inflamatórias e gelificação do

leite em casos positivos (McDougall et al., 2001). Esta gelificação pode ser mensurada e distribuída em uma escala de traços, onde 1 traço significa pouca reação, 2 traços média reação e 3 uma reação exagerada, indicando graus variados de mastite sub-clínica (Kandeel et al., 2018). Este teste é uma boa ferramenta para o diagnóstico indireto de mastites subclínicas, porém a sua aplicação isolada não é recomendada, visto que estágios iniciais de lactação podem induzir falsos resultados, assim a cultura e isolamento bacteriano e exame clínico da glândula mamária, são necessárias como diagnóstico confirmatório, podendo ser associados ao CMT (McDougall et al., 2001; Marogna et al., 2010).

2.4 Proteinograma

O leite ovino é composto por quantidade abundante de proteínas, o que segundo estudo de Ha et al. (2015), através de identificação destas proteínas, hodiernamente são conhecidas 669 proteínas do soro lácteo, o qual é composto em 80% por caseína (α-caseína, β-caseína e κ-caseína). Ainda em maior quantidade, podem ser encontradas a β-lactoglobulina, α-lactoalbumina, albumina sérica, lactoferrina, lactoperoxidase e imunoglobulinas (Ha et al., 2014). Além do soro lácteo, as membranas dos glóbulos de gordura do leite (MGGL), as quais são proteínas expressas em menor proporção, também podem ser analisadas, estas conferem textura e características sensoriais aos subprodutos lácteos. Podem ser citadas: lactoderina (fator EGF), butirofilina subfamília 1 (BTA1), xantina desidrogenase /oxidase (XDH), adipofilina (ADPH) e outras compondo frações ainda menores, a actina (ACT), anexina A1 (ANX1), anexina A2 (ANX2) e proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70) (Pisanu et al., 2012).

Quando ocorre a invasão da glândula mamária por qualquer patógeno, ocorre rápida resposta imunitária, a qual pode advir de duas vias, a primeira seria a resposta imune inata (neutrófilos, macrófagos, linfócitos natural killer, células dendríticas e células epiteliais mamárias - MEC), a qual ocorre mais rápido e demonstra nenhum contato anterior com o patógeno até então desconhecido, já a segunda via é a humoral, a qual é mais lenta (Rainard e Riollet, 2006). Algumas barreiras anatômicas impedem o fácil acesso ao seio da papila e posteriormente ao seio da glândula, tal

como o esfíncter da papila em bovinos, porém esta estrutura é pobre em tecido muscular nos ovinos, segundo Fails e Magee (2018). As barreiras químicas, tal como a lactoferrina, queratina e lisozimas também auxiliam neste processo (Rainard e Riollet, 2006). Quando ocorre a lesão inicial ou reconhecimento de lipopolissacarídeos presentes nas membranas bacterianas, tal como nas infecções experimentais por *Escherichia coli* em bovinos (Vels et al., 2009), há produção local de mediadores inflamatórios (citocinas, óxido nítrico e glicocorticóides), os quais são responsáveis pela modulação da resposta sistêmica de fase aguda e produção de proteínas hepáticas de fase aguda (Van Mierte, 1995). Segundo Petersen et al. (2004), durante o processo inflamatório mastítico, as proteínas de fase aguda, as quais se originam em reposta às citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF), são produzidas no fígado ou no local de inflamação e rapidamente inundam a circulação e podem aumentar de forma substancial no leite, através de troca entre a secreção e circulação local.

Em bovinos, a ocorrência de inflamação na glândula mamária leva a alterações tanto na concentração dos componentes proteicos do leite (albumina de origem plasmática, gamaglobulina, caseína, β-lactoglobulina e α-lactoalbumina), quanto o surgimento ou aumento das concentrações de compostos proteicos não elaborados ou produzidos em pequenas concentrações no processo de secreção láctea, como lactoferrina, haptoglobina, amiloide A sérica e α1-antitripsina. Tais alterações normalmente são caracterizadas por diminuição das concentrações das proteínas sintetizadas no parênquima da glândula mamária, devido à destruição do tecido, e aumento das proteínas de origem sanguínea, devido a aumento da permeabilidade capilar (Ceciliani et al., 2012). Cabe ressaltar que as proteínas de fase aguda, são produzidas tanto no fígado, quanto em tecidos extra-hepáticos, como a glândula mamária, podendo ser positivas quando o processo inflamatório induz seu aumento e negativas quando reduzem sua concentração, a exemplo da albumina sérica, de origem hepática, a qual diante do processo mastítico, diminui sua concentração no sangue e aumenta no leite, já que a resposta inflamatória, aumenta a permeabilidade vascular e promove esta transição (Shamay et al., 2005). A lactoferrina atua como proteína de fase aguda, produzida pelo parênquima mamário, onde através da elaboração de complexos com a hemoglobina e ferro livre, diminui a disponibilidade deste mineral na circulação, o qual é consumido por grande parte das bactérias, assim

atuando como bacteriostático, além de potencial bactericida, já que reage com a superfície de alguns microrganismos, levando à lise celular, atuando assim como bactericida (García-Montoya et al., 2012). Desta forma, diante do processo mastitico agudo, ocorre aumento desta fração proteica (Boehmer et al., 2010; Shimazaki e Kawai, 2017).

Ademais, dentre as proteínas, as quais compõe 3,3 % do leite, a beta-lactoglobulina (β-lactoglobulina) é a de maior proporção, compreendendo de 7 a 12% das proteínas no leite bovino, a qual atua como ligante ao retinol, contribuindo para o transporte de vitaminas no leite (Wong et al., 1996), além de auxílio no processo digestivo dos lipídeos (Pérez et al., 1992). Em bezerros recém nascidos, Pellegrini e colaboradores (2004) descrevem a ação bactericida de quatro peptídeos, os quais derivam da digestão enzimática da β-lactoglobulina pela tripsina, possuindo importância na manutenção da vida, no período pós-parto. A função desta proteína no leite, do ponto de vista das mastites, ainda não é bem elucidada, já que possui eficácia comprovada apenas em estudo *in vitro*, no qual combate apenas mastites por estafilococos e espretococos (Chaneton et al., 2011). Ainda assim, a junção desta proteína com outros componentes, formando compostos, tal como com a hipericina, tem grande potencial bactericida contra mastites por *Staphylococcus aureus* (Rodríguez-Amigo et al., 2015). Em experimento com mastite clínica, Nudda et al. (2017) notaram aumento pouco significativo na sua concentração láctea, porém correlacionam o aumento à queda na produção leiteira. Quando há destruição do parênquima, ocorre redução dos níveis desta proteína no leite (Randolph et al., 1974; Hogarth et al., 2004; Alonso-Fauste et al., 2011). A alfa-lactoalbumina (α-lactoalbumina), a qual compõe de 2% a 5% das proteínas lácteas, é sintetizada na glândula mamária, se ligando ao cálcio, sendo importante proteína no aleitamento (Wong et al., 1996), assim seus níveis séricos diminuem durante o processo mastítico (Hogarth et al., 2004), porém aumentam no leite, o que evidencia as lesões da glândula como locais de escape das proteínas para o sangue (Sordillo et al., 1989; Alonso-Fauste et al., 2011).

As imunoglobulinas são produzidas nos plasmócitos, dentre elas a IgG é a que apresenta maior porcentagem no leite dos ruminantes. A qual é transportada de forma seletiva do sangue para o leite quando não há processo infeccioso, possuindo

capacidade de opsonização, a qual auxilia no combate a patógenos intramamários, além de grande importância na colostragem dos recém-nascidos (Sordillo; Nickerson, 1988). Esta classe de imunoglobulinas, quando ocorrem as mastites infecciosas, rapidamente inundam a secreção láctea, na tentativa de auxiliar na contenção da infecção (Persson et al., 1992).

Uma das formas mais eficientes de estudar alterações proteicas durante enfermidades é utilizando a eletroforese, uma poderosa ferramenta para “escanear” o proteoma. A utilização de metodologias de proteômica para obter uma caracterização mais completa da resposta do hospedeiro durante a infecção pode levar à identificação de um padrão de biomarcadores indicativos de doenças (Ferreira et al., 2013). Desta forma, o fracionamento eletroforético representa um dos mais confiáveis métodos de identificação de proteínas (Eckersal, 2008). A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) é relativamente simples e de baixo custo e permite a detecção de concentrações protéicas extremamente baixas e a identificação de 20 a 30 proteínas de diferentes pesos moleculares, incluindo as imunoglobulinas, proteínas de fase aguda e proteínas ligadas a lesão tecidual, necessitando diminutas quantidades de amostra (Gordon, 1995). Assim sendo, é uma técnica que pode ser bastante utilizada para estudo de alterações proteicas durante processos inflamatórios, como o que ocorre durante a mastite.

2.5 Elastografia ARFI

Além dos métodos laboratoriais, o método ultrassonográfico em modo B, para avaliação do parênquima mamário em ovelhas, associado aos métodos descritos anteriormente, pode auxiliar na instituição do tratamento correto e determinação do grau de comprometimento da glândula mamária, impactando diretamente no descarte de animais. Durante o exame é possível avaliar o tecido do parênquima mamário, cisterna do teto, teto externo, linfonodos supramamários e úbere (tecido e vascularização) (Barbagianni et al., 2016). O método ultrassonográfico na avaliação do parênquima mamário e demais estruturas é descrito amplamente em bovinos

(Franz et al., 2009), porém poucos estudos foram realizados em ovinos (Franz et al., 2003; Wójtowski et al., 2006; Murawski et al., 2019).

Auxiliar ao método ultrassonográfico clássico, outras técnicas podem ser utilizadas hodiernamente, tal como a elastografia (Nightingale et al., 2002), a qual é fundamentada na referência de que tecidos, quando alterados por algum processo inflamatório, tem alterações nos valores originais de sua rigidez (Bamber et al., 2013). Deste modo, salienta-se que os tecidos que compõe as estruturas corporais possuem capacidade elástica, o que permite a deformação quando se aplica uma força externa, retornando posteriormente ao aspecto normal. Este processo de deformação e retorno a característica original varia de acordo com o tipo de tecido, assim, tecidos mais rígidos como tendões, demoram a se deformar e tem retorno lento, quando comparado ao tecido adiposo (Goddi et al., 2012). O grau de deformação pode ser avaliado por técnicas de elastografia de imagem, dentre elas: Elastografia quase-estática (QSE), Vibro-acoustografia (VA), Elastografia transitória (TE), Imagem de elasticidade de onda de cisalhamento (SWEI), Imagem de cisalhamento supersônico (SSI) e Força de Impulso de Radiação Acústica (ARFI) (Zaleska-Dorobisz et al., 2014).

Dentre as técnicas de elastografia, destaca-se a Força de Impulso de Radiação Acústica (ARFI), a qual através de impulsos gerados pelo ultrassom, promovem deformação do tecido. Através de software específico, é mensurada a rigidez, pela força de cisalhamento, a qual pode ser traduzida em valores quantitativos (m/s) ou qualitativos (soft ou hard), obtidos em tempo real (Nightingale et al., 2002). Este método de diagnóstico auxiliar é utilizado na medicina humana para diferenciação de tumores mamários malignos de benignos (Zhou et al., 2013), além de tumores na parótida (Chandramohan et al., 2018), glândulas salivares (Matsuda et al., 2021) e fígado (Lee et al., 2020). Já, em Medicina Veterinária, é utilizada também para a diferenciação de tumores mamários, possuindo alta especificidade (97,2%) e sensibilidade (94,7%) (Feliciano et al., 2017), além de uso no acompanhamento gestacional de cadelas (Simões et al., 2020) e diferenciação de tumores prostáticos (Cintra et al., 2020). Esta técnica tem eficiência comprovada em tecidos da espécie ovina (Silva et al., 2018), destarte, a detecção e padronização da rigidez do parênquima mamário em casos crônicos de mastite infecciosa ovina, pode conduzir a

um diagnóstico mais precoce, visto que pode ser realizada em tempo real e não demanda tempo como na cultura bacteriana.

3. Objetivo Geral

O presente estudo objetivou avaliar a viabilidade da técnica de elastografia ARFI, como ferramenta diagnóstica auxiliar à detecção de mastites, em fêmeas ovinas com lesões fibrosas em parênquima mamário. Outrossim, buscou-se a avaliação da deformação e rigidez dos linfonodos supramamários, como parte do exame e possível predileção do processo inflamatório local, bem como investigou-se alterações na composição do leite, que podem ser oriundas de processos crônicos.

3.1 Objetivos específicos

I- Quantificar as células somáticas em leite ovino, de ovelhas aos 60 dias de lactação, apresentando ou n'ao fibrose em parênquima.

II- Determinar proteínas de fase aguda, através da técnica de eletroforese contendo gel de eletroforese SDS-PAGE, em soro lácteo de ovelhas portadoras de mastite.

III- Realizar a Elastografia ARFI de lesões fribrosas em parênquima mamário de ovelhas.

IV- Realizar a Elastografia ARFI de linfonodos supramamários em ovelhas portadoras de mastite crônica.

4. Referências

ADAM, Z. A.; RAGAB, G. A.; AWAAD, A. S.; TAWFIEK, M. G.; MAKSOUD, M. K. M. Abdel. Anatomical and radiographical studies on the arterial supply of the udder in goat and their. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 5, n. 3, p. 291–298, 2016. DOI: 10.1016/j.bjbas.2016.08.001.

AKERS, E. M. A 100-Year Review: Mammary development and lactation. **Journal of Dairy Science**, v.100, n.12, p.10332-10352, 2017. doi: 10.3168/jds.2017-12983

ALBA, D. F.; ROSA, G.; HANAUER, D.; SALDANHA, T. F.; SOUZA, C. F.; BALDISSERA, M. D.; SANTOS, D. S.; PIOVEZAN, A. P.; GIRARDINI, L. K.; SILVA. A. S. Subclinical mastitis in Lacaune sheep : Causative agents , impacts on milk production , milk quality , oxidative pro fi les and treatment e ffi cacy of ceftiofur. **Microbial Pthogenesis**, v.137, p.103732, 2019. DOI: 10.1016/j.micpath.2019.103732.

ALONSO-FAUSTE, I.; ANDRÉS, M.; ITURRALDE, M.; LAMPREAVE, F.; GALLART, J.; ÁLAVA, M. A. Proteomic characterization by 2-DE in bovine serum and whey from healthy and mastitis affected farm animals. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 10, p. 3015–3030, 2011. DOI: 10.1016/j.jprot.2011.11.035.

ARSENAULT, J.; DUBREUIL, P.l; HIGGINS, R.; BÉLANGER, D. Risk factors and impacts of clinical and subclinical mastitis in commercial meat-producing sheep flocks in Quebec , Canada. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 87, p. 373–393, 2008. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2008.05.006.

BAMBER, J.; COSGROVE, D.; DIETRICH, C. F.; FROMAGEAU, J.; BOJUNGA, J.; CALLIADA, F.; CANTISANI, V.; CORREAS, J-M .; D'ONOFRIO, M.; DRAKONAKI, E. E.; FINK, M.; FRIEDRICH-RUST, M.; GILJA, O. H.; HAVRE, R. F.; JENSSEN, C.; KLAUSER, A. S.; OHLINGER, R.; SAFTOIU, A.; SCHAEFER, F.; SPOREA, I.; PISCAGLIA, F. EFSUMB guidelines and recommendations on the clinical use of ultrasound elastography. Part 1: Basic principles and technology. **Ultraschall in der Medizin**, v.34, n.2, p.169-184, 2013. DOI: 10.1055/s-0033-1335205.

BARBAGIANNI, M. S.; MAVROGIANNI, V. S.; VASILEIOU, N. G. C.; FTHENAKIS, G. C.; PETRIDIS, I. G. Ultrasonographic examination of the udder in sheep. **Small Ruminant Research**, p. 1–14, 2016. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2016.12.009.

BERGONIER, D.; BERTHELOT, X. New advances in epizootiology and control of ewe

mastitis. **Livestock Production Science**, v. 79, n. 1, p. 1–16, 2003. DOI: 10.1016/S0301-6226(02)00145-8. Disponível em:

BERGONIER, D.; CRÉMOUX, R.; RUPP, R.; LAGRIFFOUL, G.; BERTHELOT, X.. Review article Mastitis of dairy small ruminants. **Veterinary Research**, v. 34, n. 5, p. 689–716, 2003. DOI: 10.1051/vetres:2003030 689.

BERTHELOT, X.; LAGRIFFOUL, G.; CONCORDET, D.; BARILLET, F.; BERGONIER, D. Physiological and pathological thresholds of somatic cell counts in ewe milk. **Small Ruminant Research**. v.6, n. 1-2, p.27-31, 2006.

BOEHMER, J. L.; WARD, J. L.; 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. DOI: 10.3168/jds.2009-2526.

BRADLEY, K. J.; BRADLEY, A. J.; BARR, F. J. Ultrasonographic appearance of the superficial supramammary lymph nodes in lactating dairy cattle. **Veterinary Record**, n. 148, p. 497–502, 2001. DOI: 10.1136/vr.148.16.497

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 76, de 26 de novembro de 2018. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, ano 2018, n. 230, p. 9, 30 nov. 2018.

BROOKER, B. E. An ultrastructural study of the sinus epithelium in the mammary gland of the lactating ewe. **Journal of anatomy**, v. 138, p. 287–96, 1984.

BURVENICH, C.; GUIDRY, A. J.; PAAPE, M. J. Natural defense mechanisms of the lactating and dry mammary gland. *In*: Third IDF International Mastitis Seminar: Tel-Aviv. **Proceedings of the Third IDF International Mastitis Seminar: Tel-Aviv**. Israel, 1995. p.1.3-1.13

CECILIANI, F.; CERON, J. J.; ECKERSALL, P. D.; SAUERWEIN, H. Acute phase proteins in ruminants. **Journal of Proteomics**, v.75, n.14, p. 4207–4231, 2012. doi: 10.1016/j.jprot.2012.04.004.

CHANDRAMOHAN. A.; THERESE, M.; ABHRAHAM, D.; PAUL, T. V.; · JACOB MAZHUVANCHARY, P. Can ARFI elastography be used to differentiate parathyroid from thyroid lesions? **Journal of Endocrinological Investigation**, v.41, p.111-119, 2018. DOI: 10.1007/s40618-017-0694-y.

CHANETON, L.; PÉREZ SÁEZ, J. M.; BUSSMANN, L. E. Antimicrobial activity of bovine β-lactoglobulin against mastitis-causing bacteria. **Journal of Dairy Science**, v.94, n.1, p.138-145, 2011. DOI: 10.3168/jds.2010-3319.

CINTRA, C. A.; FELICIANO, M. A. R.; SANTOS, V. J. C.; MARONEZI, M. C.; CRUZ, I. K.; GASSER, B.; SILVA, P.; CRIVELLENTI, L.Z.; USCATEGUI, R.A.R. Applicability of ARFI elastography in the evaluation of canine prostatic alterations detected by b-mode and Doppler Ultrasonography. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 72, n. 6, p. 2135-2140, 2020. DOI: 10.1590/1678-4162-12116

CLEMENTS, A. C. A.; TAYLOR, D. J.; FITZPATRICK, J. L. Evaluation of diagnostic procedures for subclinical mastitis in meat-producing sheep. **Journal of Dairy Research**, v. 70, n. 2, p. 139–148, 2003. DOI: 10.1017/S0022029903006022.

CONTRERAS, A.; SIERRA, D.; SÁNCHEZ, A.; CORRALES, J. C.; MARCO, J. C.; PAAPE, M. J.; GONZALO, C. Mastitis in small ruminants. **Small Ruminant Research**, v. 68, n. 1–2, p. 145–153, 2007. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2006.09.011.

DELOUIS C.; RICHARD, P. La Lactation. In: THIBAULT, C.; LEVASSEUR, M. C. **La reproduction chez les mammifères et l'homme**. Paris: INRA, 1991. p. 487-514.

ECKERSAL, P. D. Proteins, Proteomics, and the Dysproteinemias. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6.ed. San Diego: Academic, 2008.p.125-129.

FAILS, A. D.; MAGEE, C. **Anatomy and physiology of farm animals**. 8 ed. Hoboken: Wiley & Sons, 2018. p. 501-516.

FAO. Livestock Primary Data. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>. Acesso em: 27 mai. 2020.

FELICIANO, M. A. R.; USCATEGUI, R. A. R.; MARONEZI, M. C.; SIMÕES, A. P. R.; SILVA, P.; GASSER, B.; PAVAN, L.; CARVALHO, C. F. ; CANOLA, J. C.; VICENTE, W. R. R. Ultrasonography methods for predicting malignancy in canine mammary tumors. **PLoS ONE**, p. 1–14, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0178143

FERNANDES, J. C. T.; CARDOSO, M. R. I. Mamite ovina causada por *Staphylococcus aureus*. Primeira observação no Brasil. **Arquivo da Faculdade de Veterinária, UFRGS**, v.13, p.71-74, 1985.

FERREIRA, A. M.; BISLEV, S. L.; BENDIXEN, E.; ALMEIDA, A. M. The mammary gland in domestic ruminants: A systems biology perspective. **Proteomics**, v. 94, p. 110-123, 2013. doi: 10.1016/j.jprot.2013.09.012

FRAGKOU, I. A.; BOSCOS, C. M.; FTHENAKIS, G. C. Diagnosis of clinical or subclinical mastitis in ewes. **Small Ruminant Research**, v. 118, n. 1–3, p. 86–92, 2014. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2013.12.015

FRANZ, S.; FLOEK, M.; HOFMANN-PARISOT, M. Ultrasonography of the bovine udder and teat. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.25, p.669-685, 2009. doi: 10.1016/j.cvfa.2009.07.007

FRANZ, S.; HOFMANN-PARISOT, M.; GÜTLER, S.; BAUMGARTNER, W. Clinical and ultrasonographic findings in the mammary gland of sheep. **New Zealand Veterinary Journal**, v.51, p.238–243, 2003. doi: 10.1080/00480169.2003.36373

FTHENAKIS, G. C.; JONES, J. E. T. The Effect of Inoculation of Coagulase-negative Staphylococci into the Ovine Mammary Gland. **Journal of Comparative Pathology**, v. 102, n. 2, p. 211–219, 1990. DOI: 10.1016/S0021-9975(08)80126-0.

FTHENAKIS, G. C.; LEONTIDES, L.; SKOUFOS, J.; TAITZOGLOU, I. A.; TZORA, A. Case report : high prevalence rate of ovine mastitis , caused by coagulase-negative staphylococci and predisposed by increased gossypol consumption. **Small Ruminant Research**, v. 52, n. 1–2, p. 185–189, 2004. DOI: 10.1016/S0921-4488(03)00232-3.

GARCÍA-MONTOYA, I. A.; CENDÓN, T. S.; ARÉVALO-GALLEGOS, S.; RASCÓN-CRUZ, Q. Lactoferrin a multiple bioactive protein : An overview. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1820, n. 3, p. 226–236, 2012. DOI: 10.1016/j.bbagen.2011.06.018.

GODDI. A.; BONARDI, M.; ALESSI, S. Breast elastography: a literature review. **Journal of Ultrasound**, v.15, p.192-198, 2012. doi: 10.1016/j.jus.2012.06.009

GONZALEZ-RODRIGUEZ, M. C.; GONZALO, C.; SAN PRIMITIVO, F.; CÁRMENES, P. Relationship between somatic cell count and intra-mammary infection of the half udder in dairy ewes. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 2753–2759, 1995.

GONZALO, C.; ARIZNABARRETA, A.; CARRIEDO, J. A.; SAN PRIMITIVO, F. Mammary Pathogens and Their Relationship to Somatic Cell Count and Milk Yield Losses in Dairy Ewes. **Journal of Dairy Science**, v.85, n.6, p.1460-1467, 2002.

GONZALO, C.; BOIXO, J. C.; CARRIEDO, J. A.; PRIMITIVO, F. S. Evaluation of Rapid Somatic Cell Counters Under Different Analytical Conditions in Ovine Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 11, p. 3623–3628, 2004. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73500-6.

GONZALO, C.; CARRIEDO, J. A.; BARO, J. A.; SAN PRIMITIVO, F.. Factors Influencing Variation of Test Day Milk Yield, Somatic Cell Count, Fat, and Protein in Dairy Sheep. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 6, p. 1537–1542, 1994. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(94)77094-6.

GONZALO, C.; CARRIEDO, J. A.; GARCÍA-JIMENO, M. C.; PÉREZ-BILBAO, M.; DE LA FUENTE, L. F. Factors influencing variation of bulk milk antibiotic residue occurrence, somatic cell count, and total bacterial count in dairy sheep flocks. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 4, p. 1587–1595, 2010. DOI: 10.3168/jds.2009-2838.

GORDON, A. H. **Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels** .1. ed. New York: Elsevier, 1985, 231 p.

HA, M.; BEKHIT, A. E. D.; MCCONNELL, M.; MASON, S.; CARNE, A.. Fractionation of whey proteins from red deer (Cervus elaphus) milk and comparison with whey

proteins from cow, sheep and goat milks. **Small Ruminant Research**, v. 120, n. 1, p. 125–134, 2014. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2014.04.012.

HA, M.; SABHERWAL, M.; DUNCAN, E.; STEVENS, S.; STOCKWELL, P.; MCCONNELL, M.; EL-DIN BEKHIT, A.; CARNE, A.. In-depth characterization of sheep (Ovis aries) milk whey proteome and comparison with cow (Bos taurus). **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0139774.

HARDWICK, L. J. A.; PHYTHIAN, C. J.; FOWDEN, A. L.; HUGHES, K.. Size of supernumerary teats in sheep correlates with complexity of the anatomy and microenvironment. **Journal of Anatomy**, v. 236, n. 5, p. 954–962, 2020. DOI: 10.1111/joa.13149.

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**, v. 4, n. 7, p. 2094–2100, 2004. DOI: 10.1002/pmic.200300723.

HUSSEIN, A. H.; EL-KHABAZ, K. A. S.; MALEK, S. S. Is udder ultrasonography a diagnostic tool for subclinical mastitis in sheep ? **Small Ruminant Research**, 2015. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2015.05.010.

IBGE. **Censo Agropecuário**: SIDRA 2017. Rio de Janeiro. 2017.

KANDEEL, S. A.; MORIN, D. E.; CALLOWAY, C. D.; CONSTABLE, P. D. Association of California Mastitis Test Scores with Intramammary Infection Status in Lactating Dairy Cows Admitted to a Veterinary Teaching Hospital. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.32, n,1, p. 497-505, 2018. DOI: 10.1111/jvim.14876

KERN, G.; TRAULSEN, I.; KEMPER, N.; KRIETER, J. Analysis of somatic cell counts and risk factors associated with occurrence of bacteria in ewes of different primary purposes. **Livestock Science**, v. 157, n. 2–3, p. 597–604, 2013. DOI: 10.1016/j.livsci.2013.09.008.

KIRK, J.H.; GLENN, J.S. Mastitis in ewes. **Compendium on Continuing Education for the Practising**, v.18, p.582–591, 1996.

KNIGHT, C. H.; PEAKER, M. Mammary Development and Regression During Lactation in Goats in Relation To Milk Secretion. **Quarterly Journal of Experimental Physiology**, v. 69, n. 2, p. 331–338, 1984. DOI: 10.1113/expphysiol.1984.sp002809.

LEE, P.-C.; CHIOU, Y.-Y.; CHIU, N.-C.; CHEN, P.-H.; LIU, C.-A.; KAO, W.-Y.; HUO, T.-I.; HUANG, Y.-H.; HOU, M.-C.; LIN, H.-C.; WU, J.-C.; SU, C.-W. Liver stiffness measured by acoustic radiation force impulse elastography predicted prognoses of hepatocellular carcinoma after radiofrequency ablation. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-58988-3

LEGARRA, A.; UGARTE, E. Genetic parameters of udder traits, somatic cell score, and milk yield in Latxa sheep. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p.2238–2245, 2005. DOI: 10.3168/jdsS0022-0302(05)72899-X

LINZELL, J. L. The innervation of the mammary glands in the sheep and goat with some observations on the lumbo-sacral autonomic nerves. **Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences**, v. 44, n. 2, p. 160–176, 1959. DOI: 10.1113/expphysiol.1959.sp001382.

MACHADO, P. F.; PEREIRA, A. R.; SARRIES, G. A. Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos segundo sua contagem de células somáticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p. 1883-1886, 2000. DOI: 10.1590/S1516-35982000000600038.

MANCA, M. G.; SERDINO, J.; GASPA, G.; URGEGHE, P.; IBBA, I.; CONTU, M.; FRESI, P.; MACCIOTTA, N. P. P. Derivation of multivariate indices of milk composition, coagulation properties, and individual cheese yield in dairy sheep. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 6, p. 4547–4557, 2016. DOI: 10.3168/jds.2015-10589.

MAROGNA, G.; ROLESU, S.; LOLLAI, S.; TOLA, S.; LEORI, G.. Clinical findings in sheep farms affected by recurrent bacterial mastitis. **Small Ruminant Research**, v. 88, n. 2–3, p. 119–125, 2010. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2009.12.019.

MATSUDA, E.; FUKUHARA, T.; DONISHI, R.; TAIRA, K.; KOYAMA. S.; MORISAKI, T.; FUJIWARA, K.; TAKEUCHI, H. Clinical Utility of Qualitative Elastography Using

Acoustic Radiation Force Impulse for Differentiating Benign from Malignant Salivary Gland Tumors. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 47, n.2, p. 279-287, 2021. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2020.10.007

McDOUGALL, S.; MURDOUGH, P.; PANKEY, W.; DELANEY, C.; BARLOW, J.; SCRUTON, D. Relationships among somatic cell count, California mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. **Small Ruminant Research**, v.40, p.245-254, 2001. doi:10.1016/S0921-4488(01)00185-7

MENZIES, P. I.; RAMANOON, S. Z. Mastitis of sheep and goats. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 17, n. 2, p. 333–358, 2001. DOI: 10.1016/S0749-0720(15)30032-3.

MIOČ, B.; PRPIĆ, Z.; ANTUNAC, N.; ANTUNOVIĆ, Z.; SAMARŽIJA, D.; VNUČEC, I.; PAVIĆ, V.. Milk yield and quality of Cres sheep and their crosses with Awassi and East Friesian sheep. **Mljekarstvo**, v. 59, n. 3, p. 217–224, 2009.

MONCAYO, S.; MANZOOR, S.; ROSALES, J. D.; ANZANO, J.; CACERES, J. O. Qualitative and quantitative analysis of milk for the detection of adulteration by Laser Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS). **Food Chemistry**, v. 232, p. 322–328, 2017. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.04.017.

MURAWSKI, M.; SCHWARZ, T.; JAMIESON, M.; AHMADI, B.; BARTLEWSKI, P. M.. Echotextural characteristics of the mammary gland during early lactation in two breeds of sheep varying in milk yields. **Animal Reproduction**, v. 16, n. 4, p. 853–858, 2019. DOI: 10.21451/1984-3143-AR2019-0025.

NUDDA, A.; CORREDDU, F.; ATZORI, A.; MARZANO, A.; BATTACONE, G.; NICOLUSSI, P.; BONELLI, P.; PULINAA, G. Whole exhausted berries of *Myrtus communis L.* supplied to dairy ewes: Effects on milk production traits and blood metabolites. **Small Ruminant Research**, v.155, p.33–8, 2017. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2017.08.020

NIGHTINGALE, K.. Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI) Imaging : A Review.

Current Medical Imaging Reviews, v. 7, p. 328–339, 2011. DOI: 10.2174/157340511798038657

NIGHTINGALE, K.; SOO, M. S.; NIGHTINGALE, R.; TRAHEY, G. Acoustic radiation force impulse imaging: in vivo demonstration of clinical feasibility. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v.28, n.2, p.227-235, 2002.

PAAPE, M. J.; WIGGANS, G. R.; BANNERMAN, D. D.; THOMAS, D. L.; SANDERS, A. H.; CONTRERAS, A.; MORONI, P.; MILLER, R. H. Monitoring goat and sheep milk somatic cell counts. **Small Ruminant Research**, v. 68, n. 1–2, p. 114–125, 2007. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2006.09.014.

PARK, Y. W.; ALBENZIO, M.; SEVI, A.; HAENLEIN, G.F.W. Milk quality standards and controls. In: Park, Y.W.; Haenlein, G. **Milk and Dairy Products in Human Nutrition: Production, Composition and Health**. Oxford: Wiley, 2013. p. 261–287.

PELLEGRINI, A.; HULSMEIER, A. J.; HUNZIKER, P.; THOMAS, U. Proteolytic fragments of ovalbumin display antimicrobial activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1672, n.2, p.76–85, 2004.

PEREIRA, P. F. V.; REWAY, A.P.; FÉLIX, A.; BEUTEMMÜLLER, E. A.; PRETTO-GIORDANO, L. G.; ALFIERI, A. A.; LISBÔA, J. A. N.; MÜLLER, E. E. Mammary gland health of Santa Inês ewes at the drying and puerperium and evaluation of a dry-off terapy with gentamicin. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 38, n. 12, p. 2194–2200, 2018. DOI: 10.1590/1678-5150-PVB-5563.

PÉREZ, M. D.; SANCHEZ, L.; ARANDA, P.; ENA, J. M.; ORIA, R.; CALVO, M. Effect of beta-lactoglobulin on the activity of pregastric lipase. A possible role for this protein in ruminant milk. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1123, n.2. p.151–155, 1992.

PERSSON, K.; CARLSSON, A.; HAMBLETON, C.; GUIDRY, A. J. Immunoglobulins , Lysozyme and Lactoferrin in the Teat and Udder of the Dry Cow during Endotoxin-Induced Inflammation. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 39, p. 165–174, 1992. DOI: 10.1111/j.1439-0450.1992.tb01154.x

PETERSEN, H. H.; NIELSEN, J. P.; HEEGAARD. P. M. H. Application of Acute Phase Protein Measurements in Veterinary Clinical Chemistry. **Veterinary research**, v.35, n.2, p.163-187, 2004. doi:10.1051/vetres:2004002

PHILPOT, W. N.; NICKERSON S. C **Mastitis Counter Attack: A Strategy to Combat Mastitis**. Illinois: Babson Bros., 1991. 150 p.

PISANU, S.; GHISAURA, S.; PAGNOZZI, D.; FALCHI, G.; BIOSA, G.; TANCA, A.; ROGGIO, T.; UZZAU, S.; ADDIS, M. F.. Characterization of sheep milk fat globule proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis/mass spectrometry and generation of a reference map. **International Dairy Journal**, v. 24, p. 78–86, 2012. DOI: 10.1016/j.idairyj.2011.05.009.

PLUMMER, P.; PLUMMER, C.. Diseases of the Mammary Gland. *In*: PUGH, D. G.; BAIRD, A. N. **Sheep and Goat Medicine**. 2ed. Misouri: Elsevier, 2012. p. 442–465.

PUGLIESE, C.; ACCIAIOLI, A.; RAPACCINI, S.; PARISI, G.; FRANCI, O. Evolution of chemical composition, somatic cell count and renneting properties of the milk of Massese ewes. **Small Ruminant Research**, v. 35, n. 1, p. 71–80, 1999. DOI: 10.1016/S0921-4488(99)00070-X.

PYÖRÄLÄ, S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. **Veterinary Research**, v. 34, p. 565-578, 2003. DOI:10.1051/vetres:2003026

QUINLIVAN, T. D. Survey observations on ovine mastitis in New Zealand stud Romney flocks. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 16, n. 10–11, p. 149–153, 1968. DOI: 10.1080/00480169.1968.33765.

RADAELLI, E.; CASTIGLIONI, V.; LOSA, M.; BENEDETTI, V.; PICCININI, R.; NICHOLAS, R. A. J.; SCANZIANI, E.; LUINI, M. Outbreak of bovine clinical mastitis caused by Mycoplasma bovis in a North Italian herd. **Research in Veterinary Science**, v. 91, n. 2, p. 251–253, 2011. DOI: 10.1016/j.rvsc.2011.01.006.

RAINARD, P.; RIOLLET, C.. Innate immunity of the bovine mammary gland. **Veterinary Research**, v. 37, n. 3, p. 369–400, 2006. DOI: 10.1051/vetres:2006007.

RANDOLPH, H. E.; ERWLN, R. E.; RICHTER, R. L. Influence of Mastitis on Properties of Milk . VII . Distribution of Milk Proteins 1. **Journal of Dairy Science**, v. 57, n. 1, p. 15–18, 1974. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(74)84824-1.

RODRÍGUEZ-AMIGO, B.; DELCANALE, P.; ROTGER G.; JUÁREZ-JIMÉNEZ, J.; ABBRUZZETTI, S.; SUMMER, A.; AGUT, M.; LUQUE, F. J.; NONELL, S.; VIAPPIANI, C.The complex of hypericin with β-lactoglobulin has antimicrobial activity with potential applications in dairy industry. Journal of Dairy Science, v.98, n.1, p.89–94, 2015. DOI: 10.3168/jds.2014-8691.

ROVAI, M.; CAJA, G.; SUCH, X. Evaluation of udder cisterns and effects on milk yield of dairy ewes. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 12, p. 4622–4629, 2008. DOI: 10.3168/jds.2008-1298.

SANTANA, A. M.; THOMAS, F. C.; SILVA, D. G.; MCCULLOCH, E.; VIDAL, A. M. C.; BURCHMORE, R. J. S.; FAGLIARI, J. J.; ECKERSALL, P. D. Reference 1D and 2D electrophoresis maps for potential disease related proteins in milk whey from lactating buffaloes and blood serum from buffalo calves (Water buffalo, Bubalus bubalis). **Research in Veterinary Science**, v. 118, p. 449–465, 2018. DOI: 10.1016/j.rvsc.2018.04.010.

SHAMAY, A.; HOMANS, R.; FUERMAN, Y.; LEVIN, I.; BARASH, H.; SILANIKOVE, N.; MABJEESH, S. J. Expression of Albumin in Nonhepatic Tissues and its Synthesis by the Bovine Mammary Gland. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 2, p. 569–576, 2005. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(05)72719-3.

SHIMAZAKI, K. I.; KAWAI, K.. Advances in lactoferrin research concerning bovine mastitis. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 95, n. 1, p. 69–75, 2017. DOI: 10.1139/bcb-2016-0044.

SILVA, P. D. A.; USCATEGUI, R. A. R.; SANTOS, V. J. C.; TAIRA, A. R.; MARIANO, R. S. G.; RODRIGUES, M. G. K.; SIMÕES, A. P. R.; MARONEZI, M. C.; AVANTE, M. L.; VICENTE, W. R. R.; FELICIANO, M. A. R. Qualitative and quantitative ultrasound attributes of maternal-foetal structures in pregnant ewes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, n. 3, p. 725-732, 2018. doi: 10.1111/rda.13163

SIMÕES, A. P. R.; MARONEZI, M. C.; USCATEGUI, R. A. R.; RODRIGUES, M. G. K.; MARIANO, R. S. G.; ALMEIDA, V. T.; SANTOS, V. J. C.; DA SILVA, P. D. A.; VICENTE, W. R. R.; FELICIANO, M. A. R. Placental ARFI elastography and biometry evaluation in bitches. **Animal Reproduction Science**, v. 214, p. 106289. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2020.106289

SINGH, B. 2018. **Dyce, Sack, and Wensing's Textbook of Veterinary Anatomy**, 5 ed. New York: Elsevier, 2018. p.609-611.

SORDILLO, L. M.; NICKERSON, S. C. Quantification and Immunoglobulin Classification of Plasma Cells in Nonlactating Bovine Mammary Tissue. **Journal of d**, v. 71, p. 84–91, 1988. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(88)79528-4.

SORDILLO, L. M.; NICKERSON, S. C.; AKERS, R. M. Pathology of Staphyloccus aureus Mastitis During Lactogenesis : Relationships with Bovine Mammary Structure and Function. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 1, p. 228–240, 1989. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(89)79101-3

TSINGOTJIDOU, A. S.; PAPADOPOULOS, G. C. Anatomic organization of the ascending branch of the milk-ejection reflex in sheep: Primary afferent neurons. **Journal of Comparative Neurology**, v. 460, n. 1, p. 66–79, 2003. DOI: 10.1002/cne.10641.

TSIOLI, V.; FTHENAKIS, G. C. Udder surgery in ewes. **Small Ruminant Research**, v. 181, n. April, p. 76–84, 2019. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2019.06.019.

UNIÃO EUROPÉIA (2004). European Parliament and Council. **Regulation (EC) No. 853/2004 of the European Parliament and of the Council, laying down specific hygiene rules for food of animal origin.** Official Journal of the European Union L226, ano 2004, p.22–82, 29 abr. 2004.

USDA (2006). Department of Agriculture. **Regulations of the Department of Agriculture Code of Federal Regulations**. Office of the Federal Register Nation Archives and Record Administration, parte 53-209, ano 2006, n. 7, p.107, 01 jan. 2006.

VAN MIERT, A. S. Pro-inflammatory cytokines in a ruminant model: pathophysiological, pharmacological, and therapeutic aspects**. Veterinary Quarterly**, v. 17, n. 2, p. 41-50, 1995. DOI: 10.1080/01652176.1995.9694530

VELS, L.; RØNTVEDM, C. M.; BJERRINGK, 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. DOI: 10.3168/jds.2008-1209.

WODAJO, H. D.; GEMEDA, B. A.; KINATI, W.; MULEM, A. A.; VAN EERDEWIJK, A.; WIELAND, B. Contribution of small ruminants to food security for Ethiopian smallholder farmers. **Small Ruminant Research**, v. 184, p. 106064, 2020. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2020.106064.

WÓJTOWSKI, J.; ŚLÓSARZ, P.; JUNKUSZEW, A.; MILERSKI, M.; SZYMANOWSKA, A.; SZYMANOWSKI, M. Application of ultrasound technique for cistern size measurement in dairy goats (short communication), **Archives Animal Breeding**, v.49, p.382–388, 2006. doi: 10.5194/aab-49-382-2006.

WONG, D. W. S.; CAMIRAND, W. M.; PAVLATH, A. E.; PARRIS, N.; FIEDMAN, M. Structures and functionalities of milk proteins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 36, n. 8, p. 807–844, 1996. DOI: 10.1080/10408399609527751.

YEN, H. H.; MURRAY, C. M.; WASHINGTON, E. A.; KIMPTON, W. G.; DAVIES, H. M. S. Characterisation of ovine lymphatic vessels in fresh specimens. **PLoS ONE**, v. 14, n. 1, p. 1–12, 2019. DOI: 10.1371/journal.pone.0209414.

YEN, H. H.; WASHINGTON, E.; KIMPTON, W.; HALLEIN, E.; ALLEN, J.; LIN, S. Y.; BARBER, S. Development of an ovine efferent mammary lymphatic cannulation model with minimal tissue damage. **BMC Veterinary Research**, v. 12, n. 1, p. 1–10, 2016. DOI: 10.1186/s12917-016-0908-0.

ZAFALON, L. F.; JÚNIOR, G. A. F.; VASO, C. O.; LOPES, N. S. S.; VESCHI, J. L. A.; SANTANA, R. C. M. Influence of lactation stages and rain periods on subclinical mastitis in meat producing ewes | Influência dos estágios de lactação e ocorrência de

chuvas sobre a mastite subclínica em ovelhas com aptidão para produção de carne. **Ciencia Rural**, v. 46, n. 10, p. 1797–1803, 2016. DOI: 10.1590/0103-8478cr20151068.

ZALESKA-DOROBISZ, U.; KACZOROWSKI, K.; PAWLUŚ, A.; PUCHALSKA, A.; INGLOT, M. Ultrasound Elastography – Review of Techniques and its Clinical Applications. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v.23, n.4, p. 645-655, 2014.

ZHOU, J.; YANG, Z.; ZHAN, W.; ZHANG, J.; HU, N.; DONG, Y.; WANG, Y.. Original Contribution BREAST LESIONS EVALUATED BY COLOR-CODED ACOUSTIC RADIATION FORCE IMPULSE (ARFI) IMAGING. **Ultrasound in Medicine and Biology**, p. 1–9, 2016. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2016.02.014.

CAPÍTULO 2 – ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO LÁCTEA E AVALIAÇÃO POR TÉCNICAS DE IMAGEM DA GLÂNDULA MAMÁRIA DE OVELHAS. PARTE 1: A PRESENÇA DE LESÕES FIBROSAS NO PARÊNQUIMA PODE ALTERAR A RESPOSTA DE PROTEÍNAS DE FASE AGUDA NA MASTITE SUBCLÍNICA?[1]

Yuri da Silva Bonacin[1*], André Marcos Santana[2], Daniela Gomes da Silva[1], Naiá Carla Marchi de Rezende Lago[3], Michele Pereira Machado[3], Carolina Aparecida Ramos[3], José Jurandir Fagliari[1], Paulo Aléscio Canola[1], José Antonio Marques[1]

**ysbonacin@gmail.com*

[1]Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp - Jaboticabal, SP, Brasil

[2]Universidade Estadual de Maringá, Campus Regional de Umuarama – Umuarama, PR, Brasil

[3]Centro Universitário Moura Lacerda, Unidade Campus – Ribeirão Preto, SP, Brasil

Resumo

As mastites bacterianas podem levar à redução da produção leiteira, bem como produzir fibroses em parênquima mamário e alterar a composição láctea. O presente estudo avaliou 48 amostras de soro lácteo, oriundas de 27 fêmeas ovinas, raça mista, ao 60º dia de lactação. Os animais foram divididos em três grupos experimentais de acordo com a presença de fibrose na glândula mamária e contagem de células somáticas (CCS), além de dois grupos com lesões crônicas em parênquima, sendo: o grupo controle (GC) com glândulas sadias e baixa contagem de células somáticas, CB com fibroses no parênquima mamário e baixa contagem, e CA com fibroses e alta contagem celular. Realizou-se contagem de c[células somáticas (CCS) e proteinograma, visando a detecção de proteínas de fase aguda e imunoglobulinas de soro lácteo. A CCS obtida nos três grupos apresentou valores médios de 136,63 x 10^3 ± 98,09 cls/ mL, 122,06 x 10^3 ± 94,83 cls/ mL. Através do método SDS-PAGE,

evidenciou-se aumento da Lactoferrina entre GC e CA, aumento da albumina sérica entre CB e CA e aumento da IgG de cadeia pesada entre GC e CA, bem como entre CB e CA. Acredita-se que o valor limite de CCS em 500.000 cls/ mL seja seguro para a detecção de mastites subclínicas. A presença de lesões no parênquima mamário em glândulas com CCS baixa, quando comparados ao mesmo valor e presença de fibrose, não possui alterações significativas das proteínas avaliadas, cabe ressaltar que há a necessidade de estudos avaliando outros componentes lácteos, bem como compará-los ao grau de fibrose da glândula.

Palavras chave: Infecção, Leite, Ovinos, Proteinograma, Proteoma, SDS-PAGE

1. Introdução

A produção mundial de leite de origem animal é composta por várias espécies, em sua maioria pelo leite bovino (81,04%), seguido pelo leite bubalino (15,10%), caprino (2,22%) e leite ovino, este último responsável por 1,26% da produção mundial, com aproximadamente 10.631.057 toneladas/ano (FAO, 2018). O panorama nacional possui literatura escassa de dados absolutos, não obstante, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, no ano de 2017 o Brasil produziu 1.652.000 litros de leite de origem ovina, onde aproximadamente 60% tem sua origem na Agricultura Familiar (IBGE, 2017). A maior porcentagem do leite é destinada à produção de queijos finos, pois possui propriedades físico-químicas diferentes das outras espécies (Manca et al., 2016). Além de prover o leite e seus respectivos derivados, os ovinos

podem ser fonte de carne, couro e lã, compondo interessante alternativa para as culturas de subsistência ao redor do mundo, já que a carne e leite possuem excelente valor nutricional. Ademais, possuem custo de produção e manutenção baixos, integrando similarmente uma fácil e imediata moeda de troca (Wodajo et al., 2020).

Ao analisarmos as cadeias produtivas leiteiras ovinas, quando ocorre queda na produção leiteira, o primeiro fator a ser ponderado é a contaminação do aparato mamário por patógenos, o que pode ocorrer em até mais de 85% dos casos de queda brusca na produtividade do rebanho (Giadinis et al., 2012). O processo infeccioso é a etiologia majoritária, levando à inflamação da glândula, a qual é descrita como mastite. Não obstante, os traumas, reações de hipersensibilidade e neoplasias podem dar origem ao processo (Menzies e Ramanoon, 2001). Dentre os patógenos mais comuns, destacam-se as bactérias do gênero *Staphylococcus* spp., em sua maioria *Staphylococcus aureus*, os quais geralmente promovem mastites clínicas (Contreras et al., 2007; Arsenault et al., 2008;). Com menor ocorrência, podem ser isoladas cepas de *Streptococcus* spp., *Mannheimia haemolytica, Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosa, Corinebacterium, Aspergillus fumigatus, Serratia marcescens e Burkholdelia cepacia* (Bergonier et al., 2003; Gonzalo et al., 2004; Contreras et al., 2007).

As mastites podem ser divididas de acordo com a sintomatologia em clínica ou subclínica. A mastite subclínica promove aumento das células somáticas do leite, com leve inflamação do parênquima mamário (Fthenakis e Jones, 1990), podendo gerar alteração das características organolépticas e qualidade do leite, gerando descarte na indústria ou produto de baixa qualidade (Alba et al., 2019). As mastites clínicas, geralmente causadas por bactérias do gênero *Staphylococcus* spp., as quais

penetram no parênquima mamário e causam destruição tecidual irreversível, em níveis variados, gerando áreas de fibrose palpáveis e diminuição na capacidade produtiva leiteira (Fthenakis et al., 2004). A classificação deste tipo de mastite é descrita por Quinlivan (1968) em quatro graus, dependendo da severidade, com o grau 1 no início do processo inflamatório, evoluindo até grau 4 com comprometimento sistêmico e posterior morte.

No desígnio de inibir as contaminações do aparato mamário, quando a glândula é exposta a alguma patógeno, existem barreiras mecânicas que impedem o acesso ao seio da papila e seio da glândula, tal como o esfíncter da papila, o qual, segundo Fails e Magee (2018), é desprovido de tecido muscular, especificamente na espécie ovina, o que os torna mais predispostos a infecções ascendentes do aparato mamário. As barreiras químicas, tal como a lactoferrina, queratina e lisozimas também auxiliam neste processo (Rainard e Riollet, 2006).

Após a irrupção dos patógenos no interior da glândula mamária, instaura-se a resposta imunitária fisiológica, advinda da resposta inata (neutrófilos, macrófagos, linfócitos natural killer, células dendríticas e células epiteliais mamárias – MEC) ou resposta imune adquirida (Rainard e Riollet, 2006). Ainda, segundo Petersen et al. (2004), durante a mastite, após a inflamação e destruição do parênquima, as proteínas de fase aguda, as quais se originam em reposta às citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF), rapidamente inundam a circulação mamária e podem aumentar de forma substancial a sua concentração no leite. Este processo advém da maior permeabilidade da irrigação local, em contato com a secreção láctea (Ceciliani et al., 2012). Através de estudo realizado com soro lácteo em bovinos, Ceciliani et al. (2012) destacam que o processo mastítico leva a alterações nas concentrações de albumina

de origem plasmática, gamaglobulina, caseína, β-lactoglobulina e α-lactoalbumina, bem como surgimento ou aumento das concentrações de compostos proteicos não elaborados ou produzidos em pequenas concentrações no processo de secreção láctea, como lactoferrina, haptoglobina, amiloide A sérica e α1-antitripsina. Dessarte, devido à destruição do parênquima mamário, as proteínas produzidas na glândula diminuem sua concentração no leite, já as proteínas séricas aumentam (Ceciliani et al., 2012). Existem poucos estudos na literatura com a descrição das principais proteínas de fase aguda no soro lácteo em ovinos (Le Maréchal et al., 2009; Le Maréchal et al., 2011), dentre eles, são avaliados apenas animais com mastite subclínica e/ou mastite clínica aguda, não havendo comparações de animais portadores crônicos que apresentem lesões em parênquima mamário.

No desígnio de diagnosticar alterações na composição das proteínas do leite, inúmeras técnicas são descritas para a determinação do proteinograma, dentre elas a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), a qual possui exíguo custo de implantação e fácil realização, proporcionando a detecção de concentrações proteicas extremamente baixas e viabilizando a identificação de 20 a 30 diferentes proteínas, incluindo as imunoglobulinas, proteínas de fase aguda e proteínas ligadas a lesão tecidual, com diminutas quantidades de amostra (Gordon, 1995). Está técnica possui eficácia comprovada, avaliando-se mastites em búfalas (Santana et al., 2018) e vacas (Hogarth et al., 2004; Alonso-Fauste et al., 2012)

Além de técnicas mais apuradas, para avaliar a qualidade do leite e sanidade da glândula, inúmeros métodos podem ser utilizados, dentre eles a contagem de

células somáticas (CCS) e a lactocultura (Bergonier et al., 2003; Contreras et al., 2007; Gonzalo et al., 2010).

Quando observados os graus de evolução do processo mastitico em ovinos, os estudos são escassos e não há padronização de critérios tal como a CCS. Assim, a identificação de proteínas do soro lácteo e sua comparação ao nível de CCS em ovelhas portadores de mastite crônica, pode compor uma ferramenta que possa predizer o grau de contaminação da glândula de forma rápida e pouco onerosa. Ao se comparar os animais que possuem glândulas sadias, aos que possuem glândulas com graus de fibrose em parênquima, divididos em baixa ou alta contagem de células somáticas, há a possibilidade de compreender o comportamento das frações proteicas nas diferentes fases da mastite crônica, podendo determinar se a glândula fibrosada ainda produz proteínas inflamatórias, ou mesmo ainda apresenta mastite, facilitando a decisão de manter este animal no rebanho ou não. Além da decisão do descarte direcionado, cabe ressaltar que a glândula mamária fibrosada pode alterar as características da composição láctea.

2. Material e Métodos

2.1 Animais

Foram utilizadas 32 fêmeas ovinas, provenientes do cruzamento entre as raças Dorper e Santa Inês, com idades variando de 3 a 7 anos, com 60 dias de lactação, mantidas com os respectivos filhotes, oriundas de criatório particular em Ribeirão

Preto, São Paulo, Brasil. Os animais eram mantidos em regime de criação semi-intensivo, com dieta baseada em feno de Tifton e ração comercial. Priori à colheita de leite, foi realizado exame físico em todos animais, priorizando a avaliação específica do aparato mamário. O exame clínico foi baseado no histórico dos animais, além de mensuração da frequência cardíaca, frequência respiratória, movimentos ruminais, temperatura corporal e exame da glândula mamária através da inspeção visual e palpação manual. O critério de inclusão inicial foi a presença de lesões fibrosas no parênquima mamário, detectadas por exame clínico inicial e escaneamento da glândula por ultrassonografia em modo B, incluindo estas glândulas no grupo “mastite crônica” (C), contendo 29 metades mamárias. As glândulas de animais sem sintomatologia clínica e com parênquima mamário normal, foram incluídas no grupo “controle” (GC, n=19). Posterior ao resultado da Contagem de Células somáticas, as metades mamárias dos animais do grupo C, foram subdivididos em dois grupos: mastite crônica com baixa contagem de células somáticas (CB, n=18) e mastite crônica com alta contagem de células somáticas (CA, n=11), compondo assim, três grupos experimentais (GC, CB e CA).

2.2 Colheita de amostras lácteas

Os animais foram mantidos em posição quadrupedal, realizando-se contenção por pressão manual na região cervical. Foi realizada limpeza dos tetos com solução de Iodo Povidine Tópico spray, seguida da secagem com papel toalha descartável e posterior ordenha manual. Durante a ordenha, foram descartados os três primeiros

jatos de leite e reaproveitados o restante. Para a realização da contagem de células somáticas, foram coletadas 64 amostras lácteas, acondicionadas em frascos estéreis de 50mL, contendo bronopol como conservante, identificados com o prefixo “A”, referentes a cada animal, seguindo a sequência de A1 a A32, adicionando-se o prefixo “D” para o hemi-teto direito de cada animal em 32 frascos e prefixo “E” para o hemi-teto esquerdo em mais 32 frascos. A segunda colheita envolveu a obtenção de 50 mL de leite por metade mamária, igualmente identificados, acondicionados em frascos estéreis, mantidos resfriados e encaminhados ao laboratório para obtenção do soro lácteo e posterior análise das proteínas de fase aguda. Cabe ressaltar que das 64 amostras colhidas, 16 não produziram dados passíveis de análise, sendo assim eliminadas do experimento.

2.3 Contagem de células somáticas

As amostras em temperatura ambiente, diluídas em bronopol, foram encaminhadas ao Laboratório da Clínica do Leite, localizado no departamento de Zootecnia da Universidade de São Paulo (Esalq/USP), campus de Piracicaba, São Paulo, Brasil. A CCS foi realizada pelo método automático, utilizando-se com contador eletrônico infravermelho. Este aparelho emprega citometria de fluxo com laser para determinar o conteúdo de células somáticas na amostra de leite (Sant’Ana, 2004).

2.4 Proteína total e fracionamento eletroforético por gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

A proteína total, analisada pelo método do biureto, foi mensurada utilizando-se conjunto de reagente de uso comercial (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). A leitura foi realizada em espectrofotômetro semi-automático (Labquest, Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil), com comprimento de onda específicos para o teste (530-550nm).

Para a realização da SDS-PAGE, utilizou-se a técnica descrita por Weber & Osborn (1969). As amostras de leite (50 ml), resfriadas e mantidas em frasco de plástico sem conservante, acondicionadas em caixa isotérmica com gelo, foram encaminhadas ao Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, FCAV, UNESP, Campus de Jaboticabal, SP, Brasil. Imediatamente após a chegada, houve adição de solução de renina 5% em cada alíquota, iniciando o processo de centrifugação em centrífuga refrigerada, mantendo-se a temperatura de 4ºC, com força de rotação de 21.000G, durante 10 minutos. Houve retirada da parte sólida e caseínas, seguido do congelamento das amostras em freezer com temperatura controlada de -20ºC.

Subsequente ao congelamento, foi processado o gel SDS-PAGE, mantido em cuba eletroforética adaptada. O procedimento utilizado para realização do proteinograma, foi semelhante ao descrito por Santana e colaboradores (2018). Para o cálculo da proteína total nas amostras de soro lácteo, utilizou-se o método biureto e posterior leitura em espcetrofotômetro. Foram separados 10 µg de proteína de cada

amostra, a qual foi adicionada na proporção 1:1 com solução mix (95% Laemmli sample buffer + 5 % 2-mercaptoetanol). A mistura foi aquecida em bloco térmico a 95ºC, durante quatro minutos e transferidas para os géis, previamente identificados. O processo de eletroforese, foi realizado por uma hora, a 300 V, retirando-se os géis e realizando coloração sob leve agitação. O corante utilizado foi a solução coloidal decorante Coomassie Brilliant Blue, no qual os géis permaneceram submergidos por 1 a 2 horas. Houve descoloração, realizada “overnight”, sob leve agitação com solução (ácido acético 10%(v/v), metanol 25%(v/v)). Os géis corados, foram digitalizados em scanner de alta definição. As imagens e valores quantitativos gerados foram processadas e analisadas, utilizando o programa Image LabTM (Bio-rad, Hercules, EUA).

2.5 Análise Estatística

A variável contagem de células somáticas, para os três grupos experimentais, foi submetida ao teste de normalidade e posteriormente ao teste-T, com significância de 5%, para comparação das médias.

Para as frações proteicas obtidas pela técnica de SDS-PAGE de soro lácteo, foi aplicado o teste de normalidade em todas as proteínas e imunoglobulinas identificadas, avaliando-se estas variáveis entre os três grupos. As variáveis proteína total, albumina sérica, Imunoglobulina G de cadeia pesada (IgGCP), imunoglobulina G de cadeia leve (IgGCL) e alfa-lactoalbumina apresentaram distribuição normal após transformação dos dados pela função logarítmica de base 10, sendo empregado a

234 análise de variância (one-way ANOVA), associada a análise paramétrica composta
235 pelo teste de Tukey para avaliar os efeitos de grupo (GC x CA x CB). As variáveis
236 lactoferrina e beta-lactoglobulina não apresentaram distribuição normal e não foram
237 passíveis de transformação, sendo empregado a análise de variância (one-way
238 ANOVA), associado a análise não-paramétrica composta pelo teste de Kruskal-Wallis
239 e o teste de Dunn (post-hoc) para avaliar os efeitos de grupo (GC x CA x CB). Os
240 testes foram realizados utilizando o software GraphPad Prism Versão 5.01 (GraphPad
241 Software, San Diego, USA). Para todas as análises foi considerada significância de
242 5%. A relação de dependência entre as variáveis, dentro de cada grupo experimental,
243 foi obtida através de análise estatística multivariada, realizando-se a Análise de
244 Componentes Principais (ACP) e interpretação do gráfico biplot.

245

246 **3. Resultados**

247

248 **3.1 Contagem de células somáticas**

249

250 A contagem de células somáticas (CCS), realizada através do método
251 automático, empregando a citometria de fluxo, utilizada para caracterizar o grau de
252 inflamação da glândula, foi realizada nos três grupos experimentais. O grupo GC,
253 contendo animais com parênquima mamário saudável, foi composto por 19 amostras,
254 oriundas de 19 glândulas saudáveis, possuindo contagem celular média ± desvio
255 padrão de 136,63 x 10^3 cls/ mL ± 98,09. Grupo com CCS abaixo de 500 x 10^3 cls/ mL
256 (CB) foi composto de 18 amostras, apresentando média de 122,06 x 10^3 cls/ mL ±

94,83. O grupo que apresentou parênquima fibrosado e CCS acima de 500 x 10^3cel/ml (CA), integrou 11 amostras, apontando média de 3.979,55 x 10^3 cls/ mL ± 2.943,81. Através do teste-T entre as amostras, não foi possível observar diferença significativa entre os grupos GC e CB (p=0,649). Já, quando comparados os grupos GC e CA, houve aumento significativo na CCS em CA(p=0,001), o mesmo ocorreu quando comparados os dois grupos com fibrose CB e CA (p=0,001), aumentando no último.

3.2 Proteína total e Fracionamento eletroforético (SDS-PAGE)

Os valores médios, bem como desvio padrão da proteína total estão representados na Tabela 1, onde não houve diferença de valores entre os grupos analisados. Posterior à leitura do gel SDS-PAGE no densitômetro, selecionou-se seis proteínas de peso molecular determinado, através de sua mobilidade eletroforética no gel. As proteínas selecionadas foram: Lactoferrina, Albumina Sérica, IgG Pesada, IgG Leve, β-lactoglobulina e α-lactoalbumina (Figura 1). Os valores específicos da concentração de cada proteína foram obtidos através do cálculo da proteína total, e posterior percentual de cada fração, obtendo-se a média e desvio em cada grupo experimental (Tabela 1).

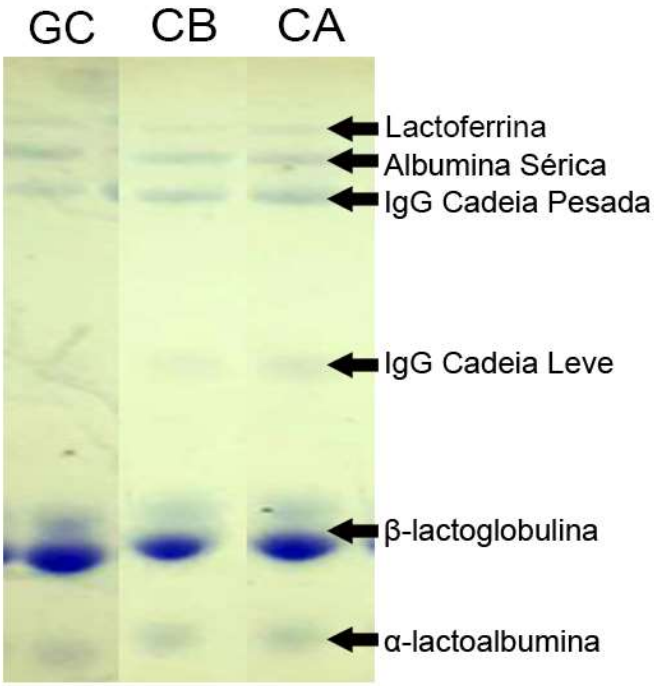


Figura 1. Fracionamento eletroforético pela técnica de SDS-PAGE, com mobilidade eletroforética de seis proteínas do soro lácteo ovino, em três diferentes grupos experimentais: glândula mamária normal (GC), com baixa contagem de CCS (<500.000 cls/ mL) e fibrose no parênquima mamário (CB) e grupo com alta contagem de CCS (>500.000 cls/ mL), somado a lesões fibrosas (CA).

Tabela 1. Valores da média e desvio padrão, da PT, Lactoferrina, Albumina Sérica, IgG Pesada, IgG Leve, β-lactoglobulina e α-lactoalbumina no gel SDS-PAGE, provenientes de amostras de soro lácteo ovino, divididos em três grupos experimentais: glândula mamária normal (GC), com baixa contagem de CCS (<500.000 cls/ mL) e fibrose no parênquima mamário (CB) e grupo com alta contagem de CCS (>500.000 cls/ mL), somado a lesões fibrosas (CA).

Frações proteicas (g/dL)	GRUPOS EXPERIMENTAIS		
	GC ($\overline{x} \pm \sigma$)	CB ($\overline{x} \pm \sigma$)	CA ($\overline{x} \pm \sigma$)
Proteína Total	2,17±1,06[a]	1,79±0,46[a]	2,83±2,59[a]
Lactoferrina	0,02±0,04	0,01±0,01	0,12±0,21[c]
Albumina Sérica	0,15±0,07[a,b]	0,12±0,04[a]	0,25±0,22[b]
IgG Cadeia Pesada	0,10±0,26[a]	0,05±0,03[a]	0,35±0,67[b]
IgG Cadeia Leve	0,06±0,10[a]	0,03±0,02[a]	0,21±0,45[a]
β-lactoglobulina	1,62±0,63[c]	1,43±0,39[c]	1,61±0,60[c]
α-lactoalbumina	0,13±0,06[a]	0,13±0,04[a]	0,15±0,08[a]

[a,b] – Letras iguais na mesma linha, não diferem entre si no teste estatístico Anova de uma via, associado à análise paramétrica pelo Teste de Tukey ($p<0,05$).

[c,d] -Letras iguais na mesma linha, não diferem entre si no teste estatístico ANOVA de uma via, associado a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis, *post-hoc* Teste de Dunns ($p<0,05$).

O valor da proteína total não diferiu entre os grupos experimentais ($p>0,05$). Quando observada a Lactoferrina, houve aumento significativo em CA ($p<0,05$), comparado aos demais. A albumina sérica apresentou aumento em CA quando comparados CB e CA ($p<0,05$), sem alteração significativa entre os demais grupos. A comparação da IgG de cadeia pesada entre os grupos, atestou aumento em sua fração no CA quando comparado a GC e CB ($p<0,05$). A outra fração de imunoglobulina, descrita como IgG de cadeia leve não apresentou alterações expressivas entre os grupos avaliados, bem como ocorreu com as proteínas β-lactoglobulina e α-lactoalbumina.

Ao analisar o comportamento das frações proteicas individuais, associadas entre si e dentro do mesmo grupo experimental, através Correlação de Pearson, foi possível a elaboração de três gráficos (Figura 2).

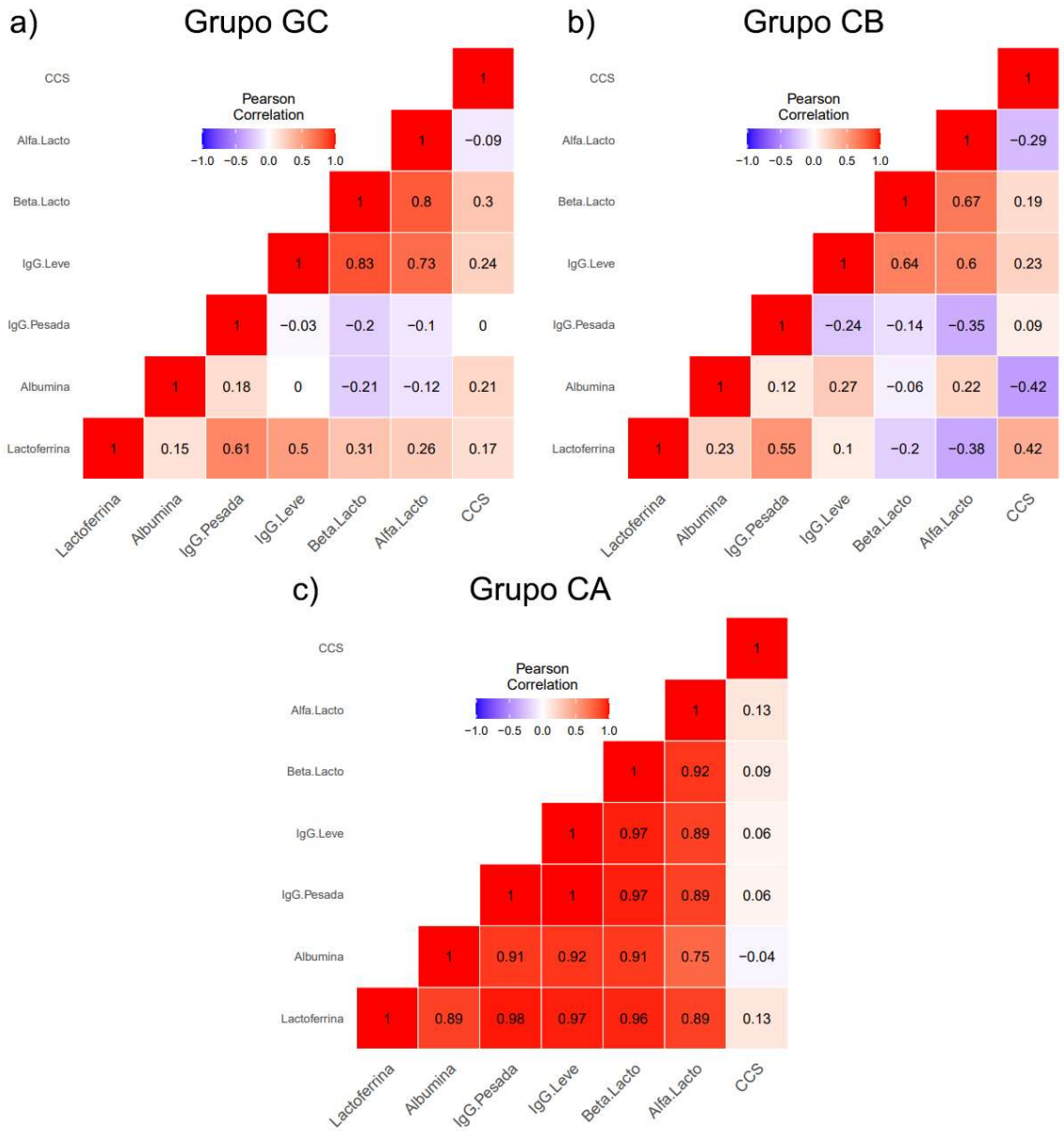


Figura 2. Gráficos do grau de correlação de Pearson entre as proteínas do soro lácteo de ovelhas, obtidas através da leitura de gel SDS-PAGE em três diferentes grupos: a) GC - com glândulas mamárias normais e baixa cofigurntagem de CCS, b) Grupo CB - contendo parênquimas mamários fibrosos, com baixa contagem de CCS (< 500.000 cls/ mL), c) Grupo CA - composto por glândulas mamárias contendo parênquimas fibrosos e alta contagem de CCS (>500.000 cls/ mL).

Através da análise do gráfico de correlação de Pearson (Figura 2) e os respectivos coeficientes de correlação (ρ), foi possível observar no grupo GC, forte

correlação positiva entre a β-lactoglobulina e α-lactoalbumina (ρ = 0,8), IgG de cadeia leve e β-lactoglobulina (ρ = 0,83), IgG de cadeia leve e α-lactoalbumina (ρ = 0,73). Houve moderada correlação positiva entre IgG de cadeia pesada e lactoferrina (r = 0,61), além da IgG de cadeia leve e lactoferrina (ρ = 0,5). Ao avaliar o grupo CB, há correlação positiva moderada entre β-lactoglobulina e α-lactoalbumina (ρ = 0,67), IgG de cadeia leve e β-lactoglobulina (ρ = 0,64), IgG de cadeia leve e α-lactoalbumina (ρ = 0,6), IgG de cadeia pesada e lactoferrina (ρ = 0,55) e CCS comparada à lactoferrina (ρ = 0,42), além de correlação negativa moderada entre albumina e CCS (ρ = -0,42). No grupo CA ocorreu forte correlação entre todas as proteínas, não havendo correlação significativa entre as proteínas e CCS.

4. Discussão

A contagem de células somáticas, realizada através de citometria de fluxo (modelo Bentley Somacount 300, Bentley Instruments Inc., Chaska, MN, USA), possui sua eficácia comprovada para a análise de leite da espécie ovina (D'Amico e Donnelly, 2010; Hanuš et al., 2011; Cruzado-Bravo et al., 2020), desta forma os valores apresentados podem ser considerados fidedignos. A diferenciação das células somáticas através de método manual é uma importante ferramenta complementar à CCS, podendo ser abordada em pesquisas futuras. Ao analisarmos os valores da CCS, há grande discrepância entre os dados encontrados: Świdereket al. (2016) consideram o valor de corte em até 200.000 cls/ mL, onde valores acima devem ser investigados; Pengov (2001) afirma que valores acima de 250.000 cls/ mL são sugestivos de mastite subclínica, González-Rodríguez et al. (1995) cita 300.000 cls/

mL como limite entre normal e mastites subclínicas, o que está próximo do valor de 400.000 cls/ mL, descrito por Kern et al. (2013) em ovelhas com aptidão para produção de carne. Outrem, consideram o limite crítico com 500.000 cls/ mL (Berthelot et al., 2006; El-Khabaz et al., 2015), 700.000 cls/ mL (Sevi et al., 1999). Já Gonzalo et al. (1994) cita que a qualidade do leite entre 500.000 e 1.000.000 cls/ mL é considerada média, valores acima do limite indicam mastite subclínica. Diante da dissensão entre os valores, o presente estudo considerou o valor máximo para CCS, utilizado por Berthelot et al. (2006) e El-Khabaz et al. (2015) de 500.000 cels/ml, sendo os valores maiores considerados como mastite subclínica. Cabe ressaltar que não houve diferença entre as médias do grupo GC (136,63 x 10^3 cls/ mL ± 98,09) e CB (122,06 x 10^3 cls/ mL ± 94,83). Porém, quando comparado o grupo com mastite subclínica GA (3.979,55 x 10^3 cls/ mL ± 2943,81) há aumento da CCS em relação aos dois grupos anteriores ($p<0,05$), o que dá suporte para o valor de corte próximo à 500.000 cls/ mL utilizado, já que os dois primeiros grupos são considerados sem mastite.

Existem diferenças entre o período de lactação e a contagem de células somáticas em glândulas sadias de ovelhas leiteiras, onde os valores atingem o pico máximo no primeiro dia de lactação (596 x 10^3 cls/ mL) e a curva diminui, se estabilizando na quinta semana de lactação em 30.000 cls/ mL (Paape et al., 2007), o que está de acordo com o descrito por Zafalon et al. (2016), com animais com aptidão para carne, considerando mastite subclínica com 400.000 cls/ mL. Por outro lado, quando os animais leiteiros atingem o 75º dia de lactação, ocorre aumento expressivo dos valores de CCS (30% a 32,5%), podendo ser fisiológico ou mesmo sugestivo de processo infeccioso (Gonzalo et al., 1994). Os animais avaliados possuíam aptidão para carne e se encontravam no 60º dia de lactação, isto é, entre a 9ª e 10ª semana

de aleitamento, o que possivelmente limita a influência do pós parto imediato e períodos de lactação longos nos resultados de CCS obtidos. Outros fatores, tal como o número de gestações e idade, também influenciam no número de células, além de partos gemelares (Gonzalo et al., 1994) e frequência pluviométrica (Zafalon et al., 2016), todavia o objetivo do presente estudo foi a comparação de glândulas fibrosadas com alta CCS e baixa CCS e não a influência de outros fatores.

A realização da leitura do gel SDS-PAGE no densitômetro permitiu a observação das proteínas do soro lácteo através do peso molecular. Foram selecionadas seis proteínas através de sua mobilidade eletroforética no gel. As proteínas selecionadas foram: lactoferrina, albumina sérica, IgG de cadeia pesada, IgG de cadeia leve, β-lactoglobulina e α-lactoalbumina (Figura 1). Através do cálculo da proteína total (PT) do soro lácteo, não houve diferença entre os grupos avaliados, o que difere do encontrado em estudos com mastite subclínica em ovinos leiteiros, onde há o aumento dos valores (Leitner et al., 2004; Summer et al., 2012), sendo responsável por efeitos deletérios na produção de queijo (Gonzalo et al., 1994). Os valores normais da PT relatados em animais sadios da raça Santa Inês, no 60º dia de lactação, são de 1,82 ±0,14 mg/dL (Lemos et al., 2013), próximo aos encontrados nos grupos GC (2,17 mg/dL) e CB (1,79 mg/dL). Já o grupo CA apresentou valores mais altos (2,83 mg/dL), porém sem diferença significativa comparado aos demais, o que poderia compor uma particularidade de ovelhas com aptidão para carne, com lesões fibrosas e mastite subclínica ativa.

A lactoferrina é considerada importante proteína no combate a mastites, sendo produzida no parênquima mamário (Green, Pastewka,1978), possuindo potencial de ligação com Fe^{2+}, Fe^{3+}e hemoglobina, os quais são substratos bacterianos, atuando

assim como bactericida (García-Montoya et al., 2012). Quando ocorre o processo infeccioso, há um aumento na produção de lactoferrina no leite, na tentativa de inibir e controlar o crescimento bacteriano (Vogel, 2012). Estudos com ovelhas de aptidão para carne, demonstram o aumento da concentração de lactoferrina em 4,8 vezes, frente ao processo infeccioso (Lemos et al., 2015), o mesmo foi observado em ovelhas leiteiras por Nudda et al. (2003), o que corrobora com os resultados apresentados, onde houve aumento em CA quando comparado à GC ($p<0,05$). Não houve diferença entre o grupo CB e CA, onde ambos apresentavam lesões fibrosas. Não obstante, a interpretação dos resultados pode indicar ausência de correlação entre a presença de fibrose e a produção de lactoferrina pela glândula mamária, sendo produzida em excesso apenas no processo infeccioso ativo (CA), baseado na similaridade dos valores de lactoferrina encontrados por Nudda et al. (2003) e Lemos et al. (2015), sem presença de fibrose. A hipótese formulada é de que a produção de lactoferrina não é prejudicada pela presença de fibrose na glândula, porém são necessários estudos controlados, com a porcentagem de fibrose em relação ao potencial produtivo desta proteína, bem como a diferenciação dos genótipos de lactoferrina.

A albumina sérica possui origem hepática, a qual atua como proteína de fase aguda e devido à destruição do parênquima mamário e aumento da permeabilidade vascular local, tem sua concentração aumentada no leite, bem como diminuição sérica (Shamay et al., 2005). Estudos em ovinos revelam o aumento desta proteína no leite em animais com alta contagem de CCS e mastite subclínica, independente da aptidão de raças (Nudda et al., 2003; Leitner et al., 2004; Lemos et al., 2015), o que corrobora com o aumento desta proteína no CA, onde havia processo ativo de mastite subclínica quando comparado a CB (Tabela 1). Por outro lado, esta diferença apenas em grupos

que apresentam fibrose, arremete à hipótese de que além da origem hepática, a albumina possa ser produzida em pequenas quantidades nos outros tecidos corporais, tais como linfático e mamário (Shamay et al., 2005). Em experimento com glândulas mamárias bovinas, a introdução de caseína hidrolisada no interior de glândulas sadias, não promove aumento da permeabilidade entre o sangue e o parênquima mamário, havendo aumento da produção de albumina no leite, sendo forte indício da produção extra-hepática (Shamay et al., 2003). Desta forma, a lesão fibrosa em parênquima, produzida pela infecção mastítica já crônica (CB), poderia promover diminuição da passagem de albumina para a glândula e diminuição na produção mamária, justificando menores valores em CB, porém os altos valores em CA indicam que a mastite ativa promove passagem destas proteínas, independente da presença de fibrose. Ademais, acredita-se que o parênquima fibrosado, sem potencial de secretar leite ou mesmo proteínas, não constituiria impedimento para maior concentração de albumina nesta glândula, ocorrendo concomitante resposta fisiológica hepática frente ao processo inflamatório ativo (CA), com aumento da permeabilidade vascular e passagem desta proteína, sendo contraponto à hipótese de Shamay et al. (2005). Destaca-se a necessidade de posteriores estudos com a porcentagem de fibrose em cada glândula e o impacto nas proteínas de fase aguda.

A análise das imunoglobulinas do soro lácteo permitiu a identificação apenas da IgG, a qual se divide em cadeia leve e pesada. Podem ser encontradas inúmeras categorias de imunoglobulinas, porém a IgG se apresenta em abundância no leite dos ruminantes, a qual é produzida nos plasmócitos e durante o processo inflamatório é deslocada à glândula mamária (Persson et al., 1992), possuindo capacidade de opsonização, o que auxilia no combate aos patógenos intramamários (Sordillo e

Nickerson, 1988). Existe apenas um estudo sobre a diferenciação da IgG em ovinos, onde ressalta-se o aumento expressivo da IgG de cadeia pesada em ovelhas portadoras de mastite subclínica, além de não haver alteração significativa da IgG de cadeia leve (Lemos et al., 2015), corroborando aos dados obtidos no presente estudo. A maior concentração de IgG de cadeia pesada em CA, quando comparada aos grupos GC e CB, pode indicar que independente das lesões fibrosas, há passagem de imunoglobulinas para o interior da glândula, assim há indícios os animais portadores de lesões podem ter seu mecanismo imunológico preservado.

Outra proteína encontrada no soro lácteo, a qual pode ser prenúncio de processo mastítico é a β- lactoglobulina, a qual possui polimorfismo e variantes genéticas A, B e C nos ovinos, sendo as duas primeiras mais comuns (Erhardt,1989). A função desta proteína ainda não foi totalmente elucidada, podendo estar relacionada à ligação e transporte de retinol e ácidos graxos (Pérez e Calvo, 1995). O aumento na concentração láctea em casos de amostras positivas para o crescimento bacteriano já foi registrado em ovinos (Gigli et al., 2007), porém o mesmo estudo relata que não houve diferença quando há aumento apenas da CCS. Quando há presença de bactérias e alta contagem de CCS, estudos com o leite ovino observaram o aumento da β- lactoglobulina (Nudda et al., 2003; Lemos et al., 2015). Em contrapartida, com experimento avaliando mastites subclínicas em vacas leiteiras ocorreu a diminuição desta proteína no leite (Hussein, 2019), corroborando com outros resultados os quais apontam a diminuição da concentração em até 22,87% (Batavani et al., 2007). Ao avaliarmos os três grupos experimentais GC, CB e CA, não houve diferença entre a concentração de β- lactoglobulina no soro lácteo. Este fato pode ser justificado pela concentração estar diretamente relacionada com a redução na produção leiteira

(Nudda et al., 2003), além de acompanhar a concentração de proteína total do soro (Giaccone et al., 2000; Dario et al., 2008), assim, acredita-se que não houve redução significativa na produção leiteira das glândulas avaliadas, bem como não houve diferença entre a PT dos grupos ($p>0,05$).

A α-lactoalbumina também foi identificada, a qual é uma proteína sintetizada na glândula mamária, se ligando ao cálcio, sendo importante proteína no aleitamento (Wong et al., 1996), além de ser crucial na produção de lactose, já que interage com a galactosiltransferase, diminuindo a necessidade de glicose utilizada para a produção deste composto (Alonso-Fauste et al., 2012). Estudos com leite bovino mastítico comprovam a diminuição da concentração da α-lactoalbumina quando comparada ao leite normal (Batavani et al., 2007; Guerrero et al., 2015), fato também relatado em ovinos (Chiaradia et al., 2013; Hussein, 2019). Em contrapartida, outro estudo em ovinos comprova o aumento desta proteína quando há aumento da CCS (Nudda et al., 2003). Os resultados obtidos demonstram que não houve diferença entre os grupos GC, CB e CA, corroborando Lemos et al. (2013), o que pode indicar que não há interferência na produção da α-lactoalbumina quando o parênquima mamário está fibrosado. Ademais, os animais utilizados neste estudo possuíam aptidão para carne, o mesmo ocorreu com Lemos et al. (2013), podendo ser indício de pouca produção desta proteína em animais produtores de carne com mastites ativas, devido à baixa produção de leite e consequentemente lactose.

Através da Análise de Correlação de Pearson no grupo GC (Figura 2), a alta correlação entre β-lactoglobulina e α-lactoalbumina, podem ser indícios da queda na produção leiteira ao 60º dia de lactação, fato que ocorre na raça Santa Inês a partir da 6ª semana de lactação (Ferreira et al., 2011). Corroborando maiores valores da β-

lactoglobulina relatados por Nudda et al. (2003) e da α-lactoalbumina por Alonso-Fauste et al. (2012). Por outro lado, esta correlação é média em CB, o que provavelmente ocorreu por uma leve queda na produção leiteira nas glândulas fibrosadas, diminuindo, de forma não significativa, a concentração da β-lactoglobulina (Tabela 1). Não houve mensuração da produção leiteira diária das ovelhas, se tornando um ponto a ser explorado em pesquisas futuras.

A moderada correlação positiva entre as concentrações de lactoferrina e IgG de cadeia pesada, as quais aumentam de forma equivalente, podem ser justificadas com o fato da lactoferrina ser produzida frente ao processo infeccioso (Voguel, 2012), bem como a IgG de cadeia pesada (Sordillo; Nickerson, 1988), não possuindo importância quando não há mastite ativa, já que o mesmo fato ocorre em CB. Em CA há aumento do grau de correlação, justificando estas proteínas como linha de defesa na mastite ativa. Já a correlação moderada entre a IgG de cadeia leve e lactoferrina em GC, a qual é fraca em CB indica leve queda na produção da imunoglobulina em CB, podendo estar relacionada à fibrose e transporte dificultado ao leite. Por outro lado, há ligeiro aumento em CA, indicando a presença da IgG de cadeia leve no processo mastítico, conforme relatado (Sordillo e Nickerson,1988; Alonso-Fauste et al., 2012), além de sua forte correlação com as demais proteínas em CA.

A análise das correlações no grupo CA, diferente dos demais grupos, ocorreu forte associação entre a IgG de cadeia pesada, lactoferrina, β-lactoglobulina e IgG de cadeia leve em todas relatadas como proteínas que participam dos mecanismos de defesa da glândula, frente à invasão por patógenos, reafirmando os inúmeros mecanismos de combate à invasão da glândula por patógenos, mesmo que os aumentos em suas proporções não sejam significativos.

5. Conclusão

Acredita-se que o valor limite de CCS em 500.000 cels/ml para o leite sadio utilizado neste estudo, também relatado por outros autores, pode auxiliar na padronização e criação de legislação específica para o leite ovino, amparado pelos valores das proteínas e suas correlações. A presença de lesões no parênquima mamário em glândulas com CCS baixa, quando comparados ao mesmo valor e presença de fibrose, não possui alterações significativas das proteínas avaliadas, destarte a IgG de cadeia pesada é a única proteína que poderia ser utilizada na diferenciação de glândulas mamárias com ou sem mastite. Há necessidade de estudos avaliando outros componentes lácteos e identificação de proteínas menos abundantes no soro, bem como a mensuração da porcentagem de fibrose do parênquima mamário, a fim de entender o comportamento das proteínas de fase aguda em glândulas fibrosadas e/ou com mastite.

6. Referências

Alba, D.F., da Rosa, G., Hanauer, D., Saldanha, T.F., Souza, C.F., Baldissera, M.D., da Silva dos Santos, D., Piovezan, A.P., Girardini, L.K., Schafer Da Silva, A., 2019. Subclinical mastitis in Lacaune sheep: Causative agents, impacts on milk production, milk quality, oxidative profiles and treatment efficacy of ceftiofur. Microbial Pathogenesis 137, 103732. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103732

532 Alonso-Fauste, I., Andrés, M., Iturralde, M., Lampreave, F., Gallart, J., Álava, M.A.,
533 2012. Proteomic characterization by 2-DE in bovine serum and whey from healthy and
534 mastitis affected farm animals. Journal of Proteomics 75, 3015–3030.
535 https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.11.035

536 Arsenault, J., Dubreuil, P., Higgins, R., Bélanger, D., 2008. Risk factors and impacts
537 of clinical and subclinical mastitis in commercial meat-producing sheep flocks in
538 Quebec, Canada. Preventive Veterinary Medicine 87, 373–393.
539 https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2008.05.006

540 Batavani, R. A., Asri, S., Naebzadeh, H., 2007. The effect of subclinical mastitis on
541 milk composition in dairy cows. Iranian Journal of Veterinary Research, University of
542 Shiraz 8, 205-211.

543 Bergonier, D., de Crémoux, R., Rupp, R., Lagriffoul, G., Berthelot, X., 2003. Mastitis of
544 dairy small ruminants. Veterinary Research 34, 689–716.
545 https://doi.org/10.1051/vetres:2003030

546 Berthelot, X., Lagriffoul, G., Concordet, D., Barillet, F., Bergonier, D., 2006.
547 Physiological and pathological thresholds of somatic cell counts in ewe milk. Small
548 Ruminant Research 62, 27–31. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.07.047

549 Ceciliani, F., Ceron, J.J., Eckersall, P.D., Sauerwein, H., 2012. Acute phase proteins
550 in ruminants. Journal of Proteomics 75, 4207–4231.
551 https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.04.004

552 Chiaradia, E., Valiani, A., Tartaglia, M., Scoppetta, F., Renzone, G., Arena, S., Avellini,
553 L., Benda, S., Gaiti, A., Scaloni, A., 2013. Ovine subclinical mastitis: Proteomic

554 analysis of whey and milk fat globules unveils putative diagnostic biomarkers in milk.
555 Journal of Proteomics 83, 144–159. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.03.017

556 Contreras, A., Sierra, D., Sánchez, A., Corrales, J.C., Marco, J.C., Paape, M.J.,
557 Gonzalo, C., 2007. Mastitis in small ruminants. Small Ruminant Research 68, 145–
558 153. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.011

559 Cruzado-Bravo, M.L.M., Barancelli, G. v., Dini Andreote, A.P., Saldaña, E., Vidal-
560 Veuthey, B., Collado, L., Contreras-Castillo, C.J., 2020. Occurrence of Arcobacter spp.
561 in Brazilian Minas frescal cheese and raw cow milk and its association with
562 microbiological and physicochemical parameters. Food Control 109, 106904.
563 https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106904

564 D'Amico, D.J., Donnelly, C.W., 2010. Microbiological quality of raw milk used for small-
565 scale artisan cheese production in Vermont: Effect of farm characteristics and
566 practices. Journal of Dairy Science 93, 134–147. https://doi.org/10.3168/jds.2009-
567 2426

568 Dario, C., Carnicella, D., Dario, M., Bufano, G., 2008. Genetic polymorphism of β-
569 lactoglobulin gene and effect on milk composition in Leccese sheep. Small Ruminant
570 Research 74, 270–273. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2007.06.007

571 El-khabaz, K.A.S., Malek, S.S., Hussein, H.A., 2015. Assiut Vet. Med. J. Vol. 61 No.
572 145 April 2015 61, 236–241.

573 ERHARDT, G., 1989. Evidence for a third allele at the β-lactoglobulin (β-Lg) locus of
574 sheep milk and its occurrence in different breeds. Animal Genetics 20, 197–204.
575 https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.1989.tb00857.x

576 Fails, A. D., Magee, C. 2018. Anatomy and Physiology of the Mammary Glands New
577 Jersey.

578 FAO, 2018. Livestock Primary Data. http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL (acesso
579 em 20 de julho de 2020)

580 Ferreira, M.I.C., Borges, I., Macedo Junior, G.L., Rodriguez, N.M., Penna, C.F.A.M.,
581 Souza, M.R., Gomes, M.G.T., Souza, F.A., Cavalcanti, L.F., 2011. Produção e
582 composição do leite de ovelhas Santa Inês e mestiças Lacaune e Santa Inês e
583 desenvolvimento de seus cordeiros. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e
584 Zootecnia 63, 530–533. https://doi.org/10.1590/S0102-09352011000200040

585 Fthenakis, G.C., Leontides, L., Skoufos, J., Taitzoglou, I.A., Tzora, A., 2004. Case
586 report: high prevalence rate of ovine mastitis, caused by coagulase-negative
587 staphylococci and predisposed by increased gossypol consumption. Small Ruminant
588 Research 52, 185–189. https://doi.org/10.1016/S0921-4488(03)00232-3

589 Fthenakis, G.C., T.Jones, J.E., 1990. The effect of inoculation of coagulase-negative
590 Staphylococci into the ovine mammary gland. Journal of Comparative Pathology 102,
591 211–219. https://doi.org/10.1016/S0021-9975(08)80126-0

592 García-Montoya, I.A., Cendón, T.S., Arévalo-Gallegos, S., Rascón-Cruz, Q., 2012.
593 Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview. Biochimica et Biophysica Acta
594 (BBA) - General Subjects 1820, 226–236.
595 https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.06.018

596 Giaccone, P., Di Stasio, L., Macciotta, N.P.P., Portolano, B., Todaro, M., Cappio-
597 Borlino, A., 2000. Effect of β-lactoglobulin polymorphism on milk-related traits of dairy

598 ewes analysed by a repeated measures design. Journal of Dairy Research 67, 443–
599 448. https://doi.org/10.1017/S0022029900004210

600 Giadinis, N.D., Arsenos, G., Tsakos, P., Psychas, V., Dovas, C.I., Papadopoulos, E.,
601 Karatzias, H., Fthenakis, G.C., 2012. “Milk-drop syndrome of ewes”: Investigation of
602 the causes in dairy sheep in Greece. Small Ruminant Research 106, 33–35.
603 https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.04.018

604 Gigli, I., Riggio, V., Monteleone, G., Cacioppo, D., Rosa, A.J.M., Maizon, D.O., 2007.
605 Relationship between beta lactoglobulin and subclinical mastitis in Valle del Belice
606 sheep breed. Italian Journal of Animal Science 6, 140–142.
607 https://doi.org/10.4081/ijas.2007.1s.140

608 González-Rodríguez, M.C., Gonzalo, C., San Primitivo, F., Cármenes, P., 1995.
609 Relationship Between Somatic Cell Count and Intramammary Infection of the Half
610 Udder in Dairy Ewes. Journal of Dairy Science 78, 2753–2759.
611 https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76906-5

612 Gordon, A. H., 1995. Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels,
613 first ed. New York, USA

614 Gonzalo, C., Boixo, J.C., Carriedo, J.A., San Primitivo, F., 2004. Evaluation of Rapid
615 Somatic Cell Counters Under Different Analytical Conditions in Ovine Milk. Journal of
616 Dairy Science 87, 3623–3628. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73500-6

617 Gonzalo, C., Carriedo, J.A., Baro, J.A., San Primitivo, F., 1994. Factors Influencing
618 Variation of Test Day Milk Yield, Somatic Cell Count, Fat, and Protein in Dairy Sheep.
619 Journal of Dairy Science 77, 1537–1542. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-
620 0302(94)77094-6

621 Gonzalo, C., Carriedo, J.A., García-Jimeno, M.C., Pérez-Bilbao, M., de la Fuente, L.F.,
622 2010. Factors influencing variation of bulk milk antibiotic residue occurrence, somatic
623 cell count, and total bacterial count in dairy sheep flocks. Journal of Dairy Science 93,
624 1587–1595. https://doi.org/10.3168/jds.2009-2838

625 Green, M.R., Pastewka, J. v., 1978. LACTOFERRIN IS A MARKER FOR PROLACTIN
626 RESPONSE IN MOUSE MAMMARY EXPLANTS. Endocrinology 103, 1510–1513.
627 https://doi.org/10.1210/endo-103-4-1510

628 Guerrero, A., Dallas, D.C., Contreras, S., Bhandari, A., Cánovas, A., Islas-Trejo, A.,
629 Medrano, J.F., Parker, E.A., Wang, M., Hettinga, K., Chee, S., German, J.B., Barile,
630 D., Lebrilla, C.B., 2015. Peptidomic analysis of healthy and subclinically mastitic bovine
631 milk. International Dairy Journal 46, 46–52.
632 https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.09.006

633 Hanuš, O., Sojková, K., Hanušová, K., Samková, E., Hronek, M., Hyšpler, R., Kopecký,
634 J., Jedelská, R., 2011. An experimental comparison of methods for somatic cell count
635 determination in milk of various species of mammals. Acta Universitatis Agriculturae et
636 Silviculturae Mendelianae Brunensis 59, 67–82.
637 https://doi.org/10.11118/actaun201159010067

638 Hogarth, C.J., Fitzpatrick, J.L., Nolan, A.M., Young, F.J., Pitt, A., Eckersall, P.D., 2004.
639 Differential protein composition of bovine whey: A comparison of whey from healthy
640 animals and from those with clinical mastitis. PROTEOMICS 4, 2094–2100.
641 https://doi.org/10.1002/pmic.200300723

642 Hussein, M.A., 2019. Subclinical Mastitis Survey on Milk Composition in Dairy Sheep
643 in Kurdistan Region of Iraq. Asian Journal of Advances in Agricultural Research 1–7.
644 https://doi.org/10.9734/ajaar/2019/v11i430058

645 IBGE, 2017. Censo agropecuário 2017. https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6930 (acesso
646 em 10 julho 2020).

647 Kern, G., Traulsen, I., Kemper, N., Krieter, J., 2013. Analysis of somatic cell counts
648 and risk factors associated with occurrence of bacteria in ewes of different primary
649 purposes. Livestock Science 157, 597–604.
650 https://doi.org/10.1016/j.livsci.2013.09.008

651 Le Maréchal, C., Jan, G., Even, S., McCulloch, J.A., Azevedo, V., Thiéry, R., Vautor,
652 E., le Loir, Y., 2009. Development of serological proteome analysis of mastitis by
653 Staphylococcus aureus in ewes. Journal of Microbiological Methods 79, 131–136.
654 https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.08.017

655 Le Maréchal, C., Jardin, J., Jan, G., Even, S., Pulido, C., Guibert, J.-M., Hernandez,
656 D., François, P., Schrenzel, J., Demon, D., Meyer, E., Berkova, N., Thiéry, R., Vautor,
657 E., le Loir, Y., 2011. Staphylococcus aureus seroproteomes discriminate ruminant
658 isolates causing mild or severe mastitis. Veterinary Research 42, 35.
659 https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-35

660 Leitner, G., Chaffer, M., Shamay, A., Shapiro, F., Merin, U., Ezra, E., Saran, A.,
661 Silanikove, N., 2004. Changes in Milk Composition as Affected by Subclinical Mastitis
662 in Sheep. Journal of Dairy Science 87, 46–52. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-
663 0302(04)73140-9

664 Lemos, V.F., Guaraná, E.L.S., Afonso, J.A.B., Fagliari, J.J., Silva, P.C., Soares, P.C.,
665 Mendonça, C.L., 2013. Proteinograma do soro lácteo de ovelhas da raça Santa Inês
666 em diferentes fases de lactação. Pesquisa Veterinária Brasileira 33, 807–812.
667 https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000600019

668 Lemos, V.F., Guaraná, E.L.S., Afonso, J.A.B., Fagliari, J.J., Silva, P.C., Soares, P.C.,
669 Mendonça, C.L. de, 2015. Effects of intramammary infection on whey proteinograms
670 of sheep during lactation. Pesquisa Veterinária Brasileira 35, 230–236.
671 https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015000300004

672 Manca, M.G., Serdino, J., Gaspa, G., Urgeghe, P., Ibba, I., Contu, M., Fresi, P.,
673 Macciotta, N.P.P., 2016. Derivation of multivariate indices of milk composition,
674 coagulation properties, and individual cheese yield in dairy sheep. Journal of Dairy
675 Science 99, 4547–4557. https://doi.org/10.3168/jds.2015-10589

676 Menzies, P.I., Ramanoon, S.Z., 2001. Mastitis of Sheep and Goats. Veterinary Clinics
677 of North America: Food Animal Practice 17, 333–358. https://doi.org/10.1016/S0749-
678 0720(15)30032-3

679 Nudda, A., Feligini, M., Battacone, G., Macciotta, N.P.P., Pulina, G., 2003. Effects of
680 lactation stage, parity, β-lactoglobulin genotype and milk SCC on whey protein
681 composition in sarda dairy ewes. Italian Journal of Animal Science 2, 29–39.
682 https://doi.org/10.4081/ijas.2003.29

683 Paape, M.J., Wiggans, G.R., Bannerman, D.D., Thomas, D.L., Sanders, A.H.,
684 Contreras, A., Moroni, P., Miller, R.H., 2007. Monitoring goat and sheep milk somatic
685 cell counts. Small Ruminant Research 68, 114–125.
686 https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.014

687 Pengov, A., 2001. The Role of Coagulase-Negative Staphylococcus spp. and
688 Associated Somatic Cell Counts in the Ovine Mammary Gland. Journal of Dairy
689 Science 84, 572–574. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74509-2

690 Pérez, M.D., Calvo, M., 1995. Interaction of β-Lactoglobulin with Retinol and Fatty
691 Acids and Its Role as a Possible Biological Function for This Protein: A Review. Journal
692 of Dairy Science 78, 978–988. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76713-3

693 Persson, K., Carlsson, Å., Hambleton, C., Guidry, A.J., 1992. Immunoglobulins,
694 Lysozyme and Lactoferrin in the Teat and Udder of the Dry Cow during Endotoxin-
695 Induced Inflammation. Journal of Veterinary Medicine, Series B 39, 165–174.
696 https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1992.tb01154.x

697 Petersen, H.H., Nielsen, J.P., Heegaard, P.M.H., 2004. Application of acute phase
698 protein measurements in veterinary clinical chemistry. Veterinary Research 35, 163–
699 187. https://doi.org/10.1051/vetres:2004002

700 Quinlivan, T.D., 1968. Survey observations on ovine mastitis in New Zealand stud
701 Romney flocks. New Zealand Veterinary Journal 16, 149–153.
702 https://doi.org/10.1080/00480169.1968.33765

703 Rainard, P., Riollet, C., 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland.
704 Veterinary Research 37, 369–400. https://doi.org/10.1051/vetres:2006007

705 Santana, A.M., Thomas, F.C., Silva, D.G., McCulloch, E., Vidal, A.M.C., Burchmore,
706 R.J.S., Fagliari, J.J., Eckersall, P.D., 2018. Reference 1D and 2D electrophoresis
707 maps for potential disease related proteins in milk whey from lactating buffaloes and
708 blood serum from buffalo calves (*Water buffalo, Bubalus bubalis*). Research in
709 Veterinary Science 118, 449–465. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.04.010

710 Sant'Ana, V.A.C., 2004. Proteinograma do leite de vacas: padrões e variabilidade
711 (Doctoral dissertation). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
712 Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

713 Sears, P.M., González, R.N., Wilson, D.J., Han, H.R., 1993. Procedures for Mastitis
714 Diagnosis and Control. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice 9,
715 445–468. https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30613-7

716 Sevi, A., Albenzio, M., Taibi, L., Dantone, D., Massa, S., Annicchiarico, G., 1999.
717 Changes of somatic cell count through lactation and their effects on nutritional,
718 renneting and bacteriological characteristics of ewe's milk. Advances in food sciences
719 21, 122–127.

720 Shamay, A., Homans, R., Fuerman, Y., Levin, I., Barash, H., Silanikove, N., Mabjeesh,
721 S.J., 2005. Expression of Albumin in Nonhepatic Tissues and its Synthesis by the
722 Bovine Mammary Gland. Journal of Dairy Science 88, 569–576.
723 https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72719-3

724 Shamay, A., Shapiro, F., Leitner, G., Silanikove, N., 2003. Infusions of Casein
725 Hydrolyzates into the Mammary Gland Disrupt Tight Junction Integrity and Induce
726 Involution in Cows. Journal of Dairy Science 86, 1250–1258.
727 https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73709-6

728 Sordillo, L.M., Nickerson, S.C., 1988. Quantification and Immunoglobulin Classification
729 of Plasma Cells in Nonlactating Bovine Mammary Tissue. Journal of Dairy Science 71,
730 84–91. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79528-4

731 Summer, A., Malacarne, M., Formaggioni, P., Mariani, P., 2012. Effects of somatic cell
732 count on the gross composition, protein fractions and mineral content of individual

733 ewe's milk. African Journal of Biotechnology 11, 16377-16381–16381.
734 https://doi.org/10.5897/AJB12.2242

735 Świderek, W.P., Charon, K.M., Winnicka, A., Gruszczyńska, J., Pierzchała, M., 2016.
736 Physiological Threshold of Somatic Cell Count in Milk of Polish Heath Sheep and
737 Polish Lowland Sheep. Annals of Animal Science 16, 155–170.
738 https://doi.org/10.1515/aoas-2015-0071

739 Vogel, H.J., 2012. Lactoferrin, a bird's eye view. Biochemistry and Cell Biology 90,
740 233–244. https://doi.org/10.1139/o2012-016

741 Weber, K., Osborn, M., 1969. The reliability of molecular weight determinations by
742 dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. The Journal of biological chemistry
743 244, 4406–12.

744 Wodajo, H.D., Gemeda, B.A., Kinati, W., Mulem, A.A., van Eerdewijk, A., Wieland, B.,
745 2020. Contribution of small ruminants to food security for Ethiopian smallholder
746 farmers. Small Ruminant Research 184, 106064.
747 https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2020.106064

748 Wong, D.W.S., Camirand, W.M., Pavlath, A.E., Parris, N., Friedman, M., 1996.
749 Structures and functionalities of milk proteins∗. Critical Reviews in Food Science and
750 Nutrition 36, 807–844. https://doi.org/10.1080/10408399609527751

751 Zafalon, L.F., Fim Júnior, G.A., Vaso, C.O., Lopes, N.S. dos S., Veschi, J.L.A.,
752 Santana, R.C.M., 2016. Influence of lactation stages and rain periods on subclinical
753 mastitis in meat producing ewes. Ciência Rural 46, 1797–1803.
754 https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20151068

CAPÍTULO 3 – ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO LÁCTEA E AVALIAÇÃO POR TÉCNICAS DE IMAGEM DA GLÂNDULA MAMÁRIA DE OVELHAS. PARTE 2: A ELASTOGRAFIA ARFI DA GLÂNDULA MAMÁRIA E LINFONODO SUPRAMAMÁRIO PODE SER UTILIZADA COMO FERRAMENTA AUXILIAR AO DIAGNÓSTICO DE MASTITE SUBCLÍNICA EM FÊMEAS OVINAS NATURALMENTE INFECTADAS?[1]

Yuri da Silva Bonacin[1*], Victor José Correia Santos[2], Marjury Cristina Maronezi[2], Michele Pereira Machado[3], Beatriz Longo Barbosa[3], André Marcos Santana[4], Paulo Aléscio Canola[1], Marcus Antonio Feliciano[5], José Antonio Marques[1]

**ysbonacin@gmail.com*

[1] Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp - Jaboticabal, SP, Brasil

[2]Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp - Jaboticabal, SP, Brasil

[3] Centro Universitário Moura Lacerda, Unidade campus – Ribeirão Preto, SP, Brasil

[4] Universidade Estadual de Maringá, Campus Regional de Umuarama – Umuarama, PR, Brasil

[5] Universidade Federal de Santa Maria - Santa Maria, RS, Brasil

Resumo

Este estudo avaliou o uso da elastografia por Força de Impulso de Radiação Acústica (ARFI) em parênquima mamário e linfonodos supramamários, para detecção de mastites ativas em ovelhas portadoras de lesões fibrosas, naturalmente infectadas. A pesquisa foi desenvolvida utilizando-se 32 fêmeas ovinas, raça mista, das quais foram obtidas imagens ultrassonográficas em modo-B e realizada elastografia ARFI, obtendo-se variáveis qualitativas (ecogenicidade e ecotextura) e quantitativas (velocidade de cisalhamento, profundidade e proporção eixo curto/longo) de 52 glândulas mamárias. As glândulas foram divididas em três grupos experimentais

através da contagem de células somáticas e presença ou não de fibrose no parênquima. O grupo controle (GC) foi composto por animais sadios, sem fibrose na glândula e com contagem de células somáticas menor que 500 x 10^3 cls/ mL, o segundo grupo foi composto por animais que apresentavam lesões fibrosas e CCS menor que 500 x 10^3 cls/ mL (CB), já o terceiro grupo possuía lesões fibrosas e contagem acima de 500 x 10^3 cls/ mL (CA). Através da elastografia ARFI em áreas sadias da glândula nos grupos, foi possível observar aumento da velocidade de cisalhamento ($p<0,05$) no grupo CB quando comparado ao grupo GC, o que ocorreu também quando comparados CB e CA. Quando comparadas as áreas de fibrose nos grupos CB e CA, com suas respectivas áreas normais, a velocidade aumentou nos dois grupos: CB ($p<0,05$; $t= 4,07$) e CA ($p<0,05$; $t= 6,92$). Ao comparar as áreas de fibrose em CB e CA com o parênquima de GC, houve aumento em CB ($p<0,05$; $t=4,95$) e CA ($p<0,05$; $t=5,49$). Ao avaliar o linfonodo supramamário de cada glândula, a velocidade de cisalhamento aumentou quando comparados os grupos GC e CA ($p<0,05$, $T=2,11$), apresentando-se maior no último. Os resultados da ultrassonografia em modo-B apontam predomínio da ecogenicidade hipoecóica nos linfonodos, bem como redução da proporção do eixo curto/longo em casos de mastite subclínica ativa. A eslatografia ARFI pode indicar pontos de corte para que haja diferenciação das mastite subclínicas e mastites que já se curaram, seu uso é excelente ferramenta para diferenciação das áreas normais de áreas fibrosadas em parênquima. A avaliação nos linfonodos supramamários, com altas velocidades de cisalhamento, podem indicar mastites ativas, porém o comportamento no parênquima mamário é diferente, produzindo maiores valores em mastites já crônicas.

Palavras-chave: ARFI, Inflamação, Leite, Ovelha, Sanidade, Ultrassom.

1. Introdução

A mastite é descrita como a inflamação do parênquima mamário, de etiologia multíplice, podendo ocorrer através da penetração de patógenos ascendentes, traumas mecânicos no aparato mamário, por reações de hipersensibilidade locais e menos frequente por neoplasias (Menzies e Ramanoon, 2001). A evolução dos quadros de mastite em fêmeas ovinas foi sumarizada por Quinlivan (1968) em 4 níveis, utilizados hodiernamente, de acordo com sua apresentação clínica. O grau 1 é definido como crônico, contendo apenas sutis lesões fibróticas no parênquima mamário, com secreção láctea normal, propensa a cronicidade; grau 2 também considera-se crônico, com fibrose mais extensa, podendo formar grandes áreas fibróticas em todos componentes mamários, havendo mudanças nos aspectos organolépticos do leite; grau 3 agudo, onde existe edema generalizado na glândula, com presença de leite com aspecto diluído e formando grumos, podendo ocorrer ruptura do aparato suspensor e abscessos; grau 4 descrito como peri-agudo, havendo inflamação severa, com presença de linfadenopatia, podendo haver produção de leite de cor normal a depender do microrganismo envolvido, ou mesmo igual à do tipo 3, porém ocorre presença de fibrina e pus. Ainda pode-se diferenciar as mastites infeciosas em clínica e subclínica, onde a primeira apresenta sintomatologia característica, tal como aumento de temperatura local, hiperemia, hipersensibilidade e alterações organolépticas visíveis na secreção láctea (Mavrogianni et al., 2011; Knuth et al., 2019), a mastite subclínica tem ausência de sintomatologia clínica evidente, podendo ocasionar redução na produção leiteira e alterações na qualidade

do leite, atuando como uma doença silenciosa no rebanho (Knuth et al., 2019; Puggioni et al., 2020).

Dentre os impactos negativos da mastite infeciosa em um rebanho, pode ocorrer mortalidade neonatal, redução no ganho de peso de cordeiros lactantes (Arsenault et al., 2008) além de baixa qualidade, baixa produção e contaminação bacteriológica do leite (Fragkou et al., 2014; Turchi et al., 2020).

Inúmeros métodos diagnósticos podem ser utilizados para detecção das mastites. Dentre eles a ultrassonografia em modo-B é importante ferramenta na identificação de mastites clinicas e subclínicas, onde é possível escanear e avaliar a integridade do parênquima mamário, cisterna da glândula mamária, cisterna do teto ou mesmo o aporte sanguíneo local em busca de alterações morfológicas (Hussein et al., 2015; Barbagianni et al., 2017;). Os linfonodos supramamários também podem ser avaliados (Barbagianni et al., 2017). Em estudo com vacas, Bradley et al. (2001) relatam o aumento nas dimensões dos linfonodos em animais com altas contagens de células somáticas, com resultados semelhantes em estudo com fêmeas ovinas (Hussein et al., 2015).

Auxiliar ao método ultrassonográfico clássico, os tecidos que compõe as estruturas corporais possuem capacidade elástica, o que permite a deformação quando se aplica uma força externa, retornando posteriormente ao aspecto normal. Este processo de deformação e retorno a característica original varia de acordo com o tipo de tecido, desta forma tecidos mais rígidos como tendões, demoram a se deformar e tem retorno lento, quando comparado ao tecido adiposo (Goddi et al., 2012). O grau de deformação pode ser avaliado por técnicas de elastografia de

imagem, dentre elas a Força de Impulso de Radiação Acústica (ARFI), a qual, através de impulsos, deforma o tecido e mensura a rigidez, através do ultrassom, a qual pode ser realizada em tempo real (Nightingale, 2011). Este método de diagnóstico auxiliar é amplamente utilizado na medicina humana para diferenciação de tumores mamários malignos de benignos (Zhou et al., 2016), bem como em medicina veterinária para o mesmo propósito, possuindo alta especificidade (97,2%) e sensibilidade (94,7%) (Feliciano et al., 2017), também utilizada no acompanhamento gestacional de cadelas (Simões et al., 2018).

A identificação precoce das mastites é de suma importância, visto que os métodos tradicionais, tal como contagem de células somáticas e isolamento bacteriano são onerosos e dispendem dias até a obtenção dos resultados. Desta forma, a ultrassonografia é um método auxiliar com eficácia comprovada (Hussein et al., 2015). As mastites crônicas produzem alterações significativas no parênquima mamário, tal como graus variados de fibrose (Quinlivan, 1968), porém nenhum estudo experimental avaliando mastites crônicas foi encontrado na literatura consultada. Assim, a ultrassonografia em modo B e a elastrografia ARFI, podem ser ferramentas diagnósticas auxiliares, em tempo real, visando a diferenciação de animais com lesões crônicas oriundas de mastite e baixa contagem de CCS, de animais que possuem as mesmas lesões, porém ainda enfrentam um processo mastítico, constituindo uma avaliação em tempo real, a qual pode prover o diagnóstico precoce. A técnica de imagem pode auxiliar na rápida instituição dos tratamentos, dessarte existindo a possibilidade de manutenção do animal no rebanho, mesmo com lesões fibrosas.

2. Material e Métodos

2.1 Animais

O estudo realizado foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) nº 017013/18. Foram utilizadas 27 fêmeas ovinas, oriundas do cruzamento entre as raças Dorper e Santa Inês, com idades de 6±2 anos, ao 60º dia de lactação. Os animais foram oriundos de criatório particular, com relatado alto índice de mastite, mantidos em regime semi-intensivo e com os respectivos filhotes em amamentação.

2.2 Colheita de amostras lácteas

Os animais foram contidos através de método manual, mantidos em estação quadrupedal. Posteriormente, foi realizada limpeza dos tetos com solução de Iodo Povidine Tópico spray, seguida da secagem com papel toalha descartável, seguida da ordenha manual. Durante a ordenha, foram descartados os três primeiros jatos de leite e reaproveitados os restantes, contabilizando 10 mL de leite por metade mamária. O leite foi acondicionado em frascos estéreis de 50 ml, contendo bronopol, contabilizando-se dois frascos por animal. Os 54 frascos foram identificados e enviados ao laboratório de análises clínicas.

2.3 Contagem de células somáticas

As amostras lácteas foram encaminhadas ao Laboratório da Clínica do Leite, localizado no departamento de Zootecnia da Universidade de São Paulo (Esalq/USP), campus de Piracicaba, São Paulo, Brasil. A contagem celular foi realizada pelo método automático com contador eletrônico infravermelho, método utilizado para contagem em bovinos.

2.4 Ultrassonografia modo B de lesões fibrosas e parênquima mamário

Os animais foram mantidos em duas baias de alvenaria com feno e água *ad libitum*, sendo posteriormente levados aos pares para a sala de imagem. Foi realizada contenção manual, mantendo-os em posição de “cão sentado”, com porção glútea sobre almofada de espuma e membros torácicos elevados do solo. Com o uso de transdutor linear de 9,0 MHz (Acuson S2000™ ultrasonic device; Siemens®, Munich, Alemanha), realizou-se escaneamento da glândula mamária, buscando lesões fibrosas no parênquima mamário da metade direita, e posteriormente metade esquerda. Quando encontradas lesões características de fibrose, foram observadas as seguintes variáveis qualitativas: ecotextura (homogênea ou heterogênea) e ecogenicidade (hipoecóico, hiperecóico ou mista). As mesmas variáveis foram observadas na mesma glândula mamária, em parênquima sem lesões, para posterior análise comparativa.

2.5 Elastografia ARFI de lesões fibrosas e parênquima mamário

Após o escaneamento em modo B, procedeu-se a realização da Elastografia ARFI, com uso de transdutor linear de 9,0 MHz gerido por software comercial (Virtual Touch Tissue Quantification, Siemens, Germany). Nos locais de interesse (parênquima mamário sadio, parênquima mamário com fibrose e linfonodos supramamários), através do posicionamento do caliper, foram realizadas três medidas quantitativas da velocidade de cisalhamento (m/s) local, bem como da profundidade (cm), técnica descrita por Simões et al. (2018).

Foi realizada captura e posterior armazenamento das imagens. Durante o exame, as variáveis qualitativas em ambos tecidos: capacidade de deformação (soft ou hard) e padrão (homogêneo e heterogênio), também foram observadas. O mesmo procedimento foi realizado nas duas metades mamárias. Todos os resultados foram sumarizados e transcritos para a Tabela 1.

2.6 Ultrassonografia modo B dos linfonodos supramamários

Ao final do escaneamento do parênquima mamário, foram identificados os linfonodos supramamários das metades mamárias, onde foi realizada avaliação qualitativa, observando-se a ecogenicidade, ecotextura e formato (alongado ou arredondado), conforme observado na Figura 1. Foi realizada a avaliação quantitativa, com mensurações dos eixos longos e curtos, com dados sumarizados na Tabela 1.

2.7 Elastrografia ARFI dos linfonodos supra-mamários

Após a avaliação ultrassonográfica em modo-B, realizou-se análise quantitativa da rigidez local, realizada em três pontos. A estrutura também foi avaliada, de forma qualitativa quanto à capacidade de deformação e padrão do tecido, com captura das imagens. Os dados quantitativos obtido foram transcritos para a Tabela 1.

2.8 Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov com nível de significância de 95%. A variável paramétrica CCS, foi transformada para a raiz quadrada, realizando-se em seguida o Teste Anova para análise de Variância, post-hoc teste t de Student. As demais variáveis não necessitaram de transformação, sendo submetidas aos mesmos testes. Foi empregado teste-t pareado para a comparação da velocidade de cisalhamento entre o parênquima normal de cada grupo e a porção fibrosada nos grupos CB e CA. As variáveis qualitativas da ultrassonografia em modo B e elastografia, foram analisadas entre si pela correlação de Pearson. Para a realização dos testes, foi utilizado o software estatístico R® (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria), com intervalo de confiança de 95% ($p<0,05$).

3. Resultados

Os linfonodos supramamários foram escaneados sem dificuldades, conforme apresentado na Figura 1, o mesmo ocorreu com as lesões fibrosas (Figura 2).

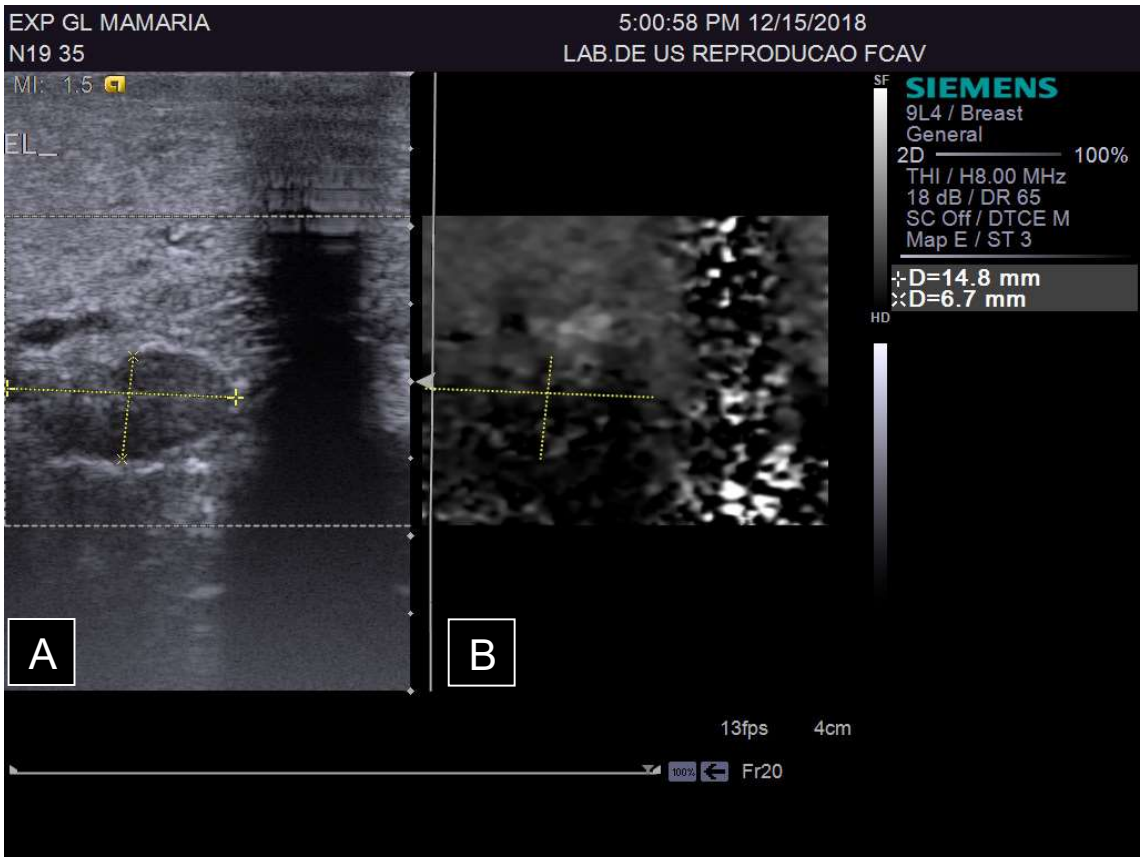


Figura 1 – A- Ultrassonografia em modo-B de linfonodo supramamário, em fêmeas ovinas portadoras de mastite crônica. B- elastografia ARFI em tempo real do linfonodo supramamário.

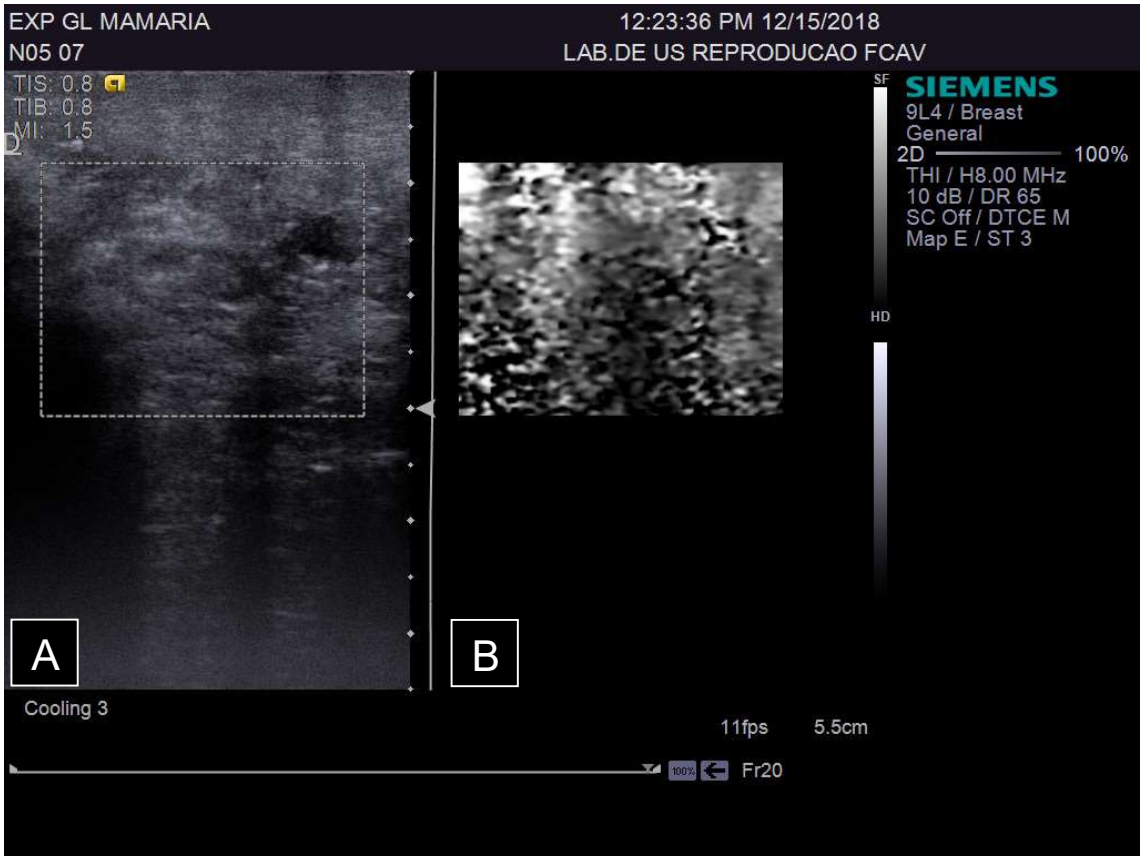


Figura 2 – A -Ultrassonografia em modo-B de parênquima mamário, demostrando áreas de fibrose (tracejado branco), sugestivas de mastite crônica. B – Elastografia ARFI em regiões fibrosadas do parênquima mamário, para obtenção das variáveis qualitativas.

Quando comparado o parênquima mamário normal, entre todos os grupos avaliados, através da ARFI quantitativa, a velocidade de cisalhamento média no CB é maior que em GC e CA ($p<0,05$). Não há diferença na velocidade do grupo GC quando comparado ao CA ($p>0,05$). A profundidade no grupo GC foi menor que nos grupos CB e CA, porém não há diferenças significativas.

Ao confrontar os valores do parênquima mamário normal próximo às lesões, dentro dos grupos CB e CA, com as respectivas lesões fibrosas, foi utilizado o teste-T pareado. Os resultados demonstram incremento na velocidade de cisalhamento das

lesões no grupo CB quando comparada às regiões normais da glândula ($p<0,05$, $T=4,07$), o mesmo ocorre em CA ($p<0,05$; $t= 6,92$).

Ao realizar a comparação das velocidades de lesões em CB e CA, com o GC, o qual é considerado sadio, através do Teste-T, não houve diferença significativa entre CB e CA. Quando comparadas as velocidades entre o parênquima normal de GC e as lesões em CB e CA, houve aumento em CB ($p<0,05$; $t=4,95$) e CA ($p<0,05$; $t=5,49$).

Analisando-se a velocidade de cisalhamento do linfonodo supramamário de cada glândula e realizando a comparação entre os grupos, há aumento significativo apenas entre o GC e CA ($p<0,05$, $T=2,11$), sendo maior no último grupo. A relação entre os eixos curto e longo dos linfonodos supramamários não apresenta diferença significativa entre os grupos, porém o formato predominante é o alongado.

Tabela 1 – Descrição das variáveis quantitativas, obtidas através da Elastografia por Força de Impulso de Radiação Acústica ARFI em tempo real, divididas em três grupos experimentais: grupo GC sem fibrose em parênquima e com contagem de células somáticas < 500.000 cls/ mL, grupo CB com fibrose e CCS < 500.000 cls/ mL e grupo CA com fibrose e CCS > 500.000 cls/ mL.

ESTRUTURA	GRUPOS	VARIÁVEIS QUANTITATIVAS			
		CCS ($x10^3$cel/ml)	Velocidade (m/s)	Profundidade (cm)	Relação eixo Curto/Longo
Glândula normal	GC	144,2 ± 95,02	1,28±0,23[a-c]	0.76±0.16	-
	CB	122,06 ± 94,84	1,54±0,31[b]	0.94±0.25	-
	CA	3.980 ± 2.943,8	1,22±0,08[a]	0.87±0.31	-
Lesão	CB	-	2,18±0,59[d]	0,74±0,18	-
	CA	-	2,37±0,49[d]	0,70±0,12	-
Linfonodo supramamário	GC	-	1,04±0,31[e]	1,62±0,64	0,41±0,08
	CB	-	1,25±0,41[e]	1,72±0,44	0,42±0,11
	CA	-	1,31±0,35[f]	1,64±0,61	0,38±0,08

[a,b] - Letras iguais na mesma coluna, não há diferença entre os grupos, analisando-se as regiões normais.
[c,d] - Letras iguais na mesma coluna não diferem na comparação das médias entre o parênquima do grupo GC, e lesões em CB e CA, pelo teste-T ($p<0,05$).
[e, f] - Letras iguais na mesma coluna não diferem na comparação das médias entre os grupos GC, CB e CA, pelo teste-T ($p<0,05$).

As variáveis qualitativas observadas na ultrassonografia em modo-B: ecotextura (homogênea ou heterogênea) e ecogenicidade (hipoecóico, hiperecóico ou mista), não possuem diferença entre os grupos e tecidos avaliados (glândula mamária, lesões e linfonodos), com ausência de correlação entre as variáveis (p> 0,05). A ausência de correlação também ocorreu quando avaliadas as variáveis qualitativas da elastografia ARFI: capacidade de deformação (soft ou hard) e padrão (homogêneo e heterogênio) (p< 0,05). Os dados foram transcritos para a Tabela 2.

Tabela 2 – Variáveis qualitativas, apresentadas de acordo com a proporção em cada grupo, obtidas da realização da ultrassonografia em modo-B e elastografia por Força de Impulso de Radiação Acústica (ARFI), de glândulas mamárias saudáveis, lesões fibrosas e linfonodos supramamários, em ovelhas com mastite crônica.

		Variáveis Qualitativas em modo-B				**Variáveis Qualitativas da ARFI**			
Estrutura	**Grupo**	**Ecogenicidade** (Proporção %)		**Ecotextura** (Proporção %)		**Deformação** (Proporção %)		**Padrão** (Proporção %)	
Glândula	GC	Hipo	89,5	Homo	5,3	Hard	100	Homo	94,7
		Hiper	10,5	Hetero	94,7	Soft	0	Hetero	5,3
		Mista	0						
	CB	Hipo	100	Homo	0	Hard	100	Homo	83,3
		Hiper	0	Hetero	100	Soft	0	Hetero	16,7
		Mista	0						
	CA	Hipo	81,8	Homo	0	Hard	90,9	Homo	100
		Hiper	9,2	Hetero	100	Soft	9,1	Hetero	0
		Mista	0						
Lesão	CB	Hipo	88,9	Homo	5,6	Hard	100	Homo	0
		Hiper	11,1	Hetero	94,4	Soft	0	Hetero	100
		Mista	0						
	CA	Hipo	90,9	Homo	0	Hard	100	Homo	0
		Hiper	9,1	Hetero	100	Soft	0	Hetero	100
		Mista	0						
Linfonodo	GC	Hipo	100	Homo	95,4	Hard	50	Homo	95,4
		Hiper	0	Hetero	5,6	Soft	50	Hetero	5,6
		Mista	0						
	CB	Hipo	100	Homo	95,4	Hard	66,67	Homo	95,4
		Hiper	0	Hetero	5,6	Soft	33,33	Hetero	5,56
		Mista	0						
	CA	Hipo	100	Homo	81,8	Hard	81,8	Homo	100
		Hiper	0	Hetero	18,2	Soft	18,2	Hetero	0
		Mista	0						

Hipo – hipoecóica; Hiper – hiperecóica; Homo – homogêneo; Hetero – heterogêneo
GC- grupo controle, com glândulas saudáveis.
CB - grupo com glândulas que apresentam baixa contagem de células somáticas no leite e lesões fibrosas em parênquima mamário.
CA - grupo com glândulas que apresentam alta contagem de células somáticas no leite e lesões fibrosas em parênquima mamário.

4. Discussão

A ultrassonografia em modo B, também descrita como método clássico, demonstra eficácia na avaliação dos componentes da glândula mamária de ovelhas (Hussein et al., 2015; Barbagiani et al., 2017), o que pode ser comprovado durante a avaliação das fêmeas no presente estudo, com fácil identificação das estruturas. Cabe ressaltar que há apenas a descrição do posicionamento dos animais e realização da técnica em posição quadrupedal (Hussein et al., 2015; Barbagianni et al., 2017). No estudo, foi utilizada a posição de “cão sentado”, com os membros torácicos elevados e a musculatura glútea em contato com o solo, possibilitando excelente método de contenção e facilitando o escaneamento de todo o aparato mamário com segurança para o avaliador e animal.

Em ovelhas o transporte de leucócitos através dos linfonodos supramamários e o aumento de suas concentrações frente à mastite, indica a importância desta estrutura no mecanismo de defesa da glândula (Watson e Davies, 1985). Assim sendo, os linfonodos supramamários escaneados através da ultrassonografia em modo-B em ovelhas foram citados como estruturas que respondem diretamente ao processo infeccioso da glândula mamária (Hussein et al., 2015), o mesmo ocorre em bovinos (Bradley et al., 2001). Quando avaliados os aspectos qualitativos

(ecogenicidade e ecotextura) dos linfonodos supramamários, em modo-B neste estudo, não houve diferenças nos três grupos experimentais, porém houve predomínio da ecogenicidade hipoecóica nos grupos GC, CB e CA e poucos pontos anecóicos, corroborando com os resultados encontrados em bovinos por Bradley e colaboradores (2001) e em ovinos portadores de mastite subclínica (Hussein et al., 2015). Além da ecogenicidade e ecotextura, a rigidez prevalente em CB é hard (66,67%), aumentando ainda mais em CA (81,88%), desta forma os linfonodos com fibrose e mastite tende a ser mais rígidos.

A elastografia ARFI quantitativa do parênquima mamário produziu resultados mais significativos do que a análise qualitativa. Além das regiões fibrosadas em CB e CA, foram mensuradas áreas sadias das glândulas que compunham estes grupos, com objetivo de demonstrar possíveis mudanças em relação a glândulas normais (GC) e com mastite subclínica (CA). A análise do tecido normal, evidenciou que a velocidade de cisalhamento é maior em CB, quando comparada aos demais, indicando maior rigidez tecidual em toda a região saudável da glândula. O aumento da rigidez no grupo com baixa CCS e sem processo inflamatório ativo (CB), pode indicar que o processo de cronificação das lesões caudas por microrganismos os quais geram nódulos duros e firmes (Marogna et al., 2010), refletem na capacidade elástica de todo o parênquima mamário quando o processo se cronifica. Este fato pode ser justificado por experimento realizado em pâncreas humanos, onde a maior velocidade de cisalhamento foi encontrada nos pacientes com pancreatite crônica e nos casos de pancreatite aguda os valores são menores e próximos ao parênquima normal (Goertz et al., 2016), com resultados semelhantes às avaliações em experimento com intestino e doença de Crhon (Dillman et al., 2013). Assim, há indícios

de que após o processo inflamatório ativo da mastite, o parênquima mamário normal em ovelhas que possuem áreas de fibrose, possa ter aumento da rigidez independente da formação de fibrose focal, o que não é observado em ovelhas sem fibrose (GC), porém não houve comprovação da presença prévia de mastite nas fêmeas do grupo GC, impossibilitando a obtenção de resultados mais satisfatórios. Por outro lado, baixas velocidades de cisalhamento em parênquimas sem fibrose e com baixa CCS (GC) podem sugerir que estas glândulas estão isentas de mastite, bem como pode ser possível estabelecer um ponto de corte para diferenciar glândulas fibrosadas sem mastite (CB) e com mastite (CA) em estudos futuros com infecções induzidas.

Ao comparar a região do parênquima mamário normal de CB e CA com as respectivas lesões fibrosas periféricas, o aumento significativo entre as velocidades de cisalhamento demonstraram que a elastografia ARFI, pode ser utilizada para diferenciação de áreas fibrosadas, indicativas de mastite crônica. Os resultados obtidos corroboram com estudos em medicina veterinária, onde há aumento da velocidade em tumores mamários de cadelas (Feliciano et al., 2017), bem como na medicina com avaliação de parênquimas de órgãos fibrosados (Dillman et al., 2013; Goertz et al., 2016). Este aumento pode ser consequência de alterações inflamatórias advindas da invasão bacteriana no parênquima mamário com consequente fibrose (Addis et al., 2013). O mesmo ocorreu quando as áreas fibrosadas em CB e CA foram comparadas com o parênquima normal de GC, assim também houve aumento substancial nos dois primeiros grupos ($p<0,05$), indicando a eficácia no diagnóstico de fibroses. Não obstante, acredita-se que avaliar as fibroses não é um parâmetro seguro

para diferenciar mastites ativas de crônicas, já que não houve diferença entre as velocidades de cisalhamento entre CB e CA.

A elastografia ARFI, possui eficácia comprovada na análise de linfonodos, utilizada em linfonodos axilares de humanos para a diferenciação de tumores mamários malignos de benignos, demonstrando aumento da velocidade de cisalhamento em malignos (Youk et al., 2017). Este mesmo estudo foi replicado em cadelas com resultados semelhantes, onde também foi observado aumento da velocidade de cisalhamento em processos inflamatórios agudos, quando comparados à linfonodos normais (Silva et al., 2018). A análise quantitativa da velocidade de cisalhamento entre os linfonodos supramamários dos grupos GC, CB e CA, demonstrou aumento no grupo CA quando comparado a GC ($p<0,05$), e menor aumento em CB quando comparado a GC ($p>0,05$). Este aumento no grupo com mastite ativa, pode ser explicado pelo aumento da produção e armazenamento de leucócitos nestas estruturas (Watson e Davies, 1985), o que corrobora com estudos realizados em ratos, onde foi observada correlação positiva entre a maior quantidade de linfócitos CD3-T no fígado de ratos obesos com a velocidade de cisalhamento (Carbonel et al., 2019). Assim, a maior distribuição de linfócitos T já observada no córtex dos linfonodos supramamários em ovinos (Senthilkumar et al., 2019) e seu aumento frente à infecção da glândula mamária (Katsafadou et al., 2019), poderiam promover o aumento da velocidade de cisalhamento em CA. A interpretação dos resultados leva a um indício de que o aumento da velocidade de cisalhamento nos linfonodos supramamários de glândulas que possuem fibrose em parênquima, com alta CCS, podem ser ferramentas úteis no diagnóstico da mastite subclínica ativa,

porém mais estudos são necessários para consolidar esta hipótese, bem como diferenciá-la da resposta do parênquima mamário normal.

Existe apenas um estudo avaliando a profundidade dos linfonodos supramamários em ovinos, objetivando o diagnóstico da mastite subclínica, o qual descreve que profundidades maiores que 7,8 mm são características de animais portadores de mastites subclínicas (Hussein et al., 2015). A realização do mesmo exame em vacas, demonstra tanto a redução da profundidade dos linfonodos em mastite subclínica (Khoramian et al., 2015) como aumento (Bradley et al., 2001). O valor médio encontrado no grupo CA foi de 16,4mm (1,64cm), não havendo diferença entre os demais grupos, diferente dos valores relatados para ovinos com mastite subclínica (Hussein et al., 2015).

Além da ecogenicidade, ecotextura, rigidez e ARFI quantitativa dos linfonodos, as medidas do eixo curto (largura) e eixo longo (comprimento) foram mensuradas, obtendo-se a relação eixo curto/eixo longo, as quais demonstraram menores valores em CA, seguido por valores maiores em CB e GC, corroborando com estudos em ovinos (Hussein et al., 2015) e bovinos (Bradley et al., 2001), onde há aumento do eixo curto. O formato predominante dos linfonodos avaliados foi alongado, corroborando Hussein e colaboradores (2015), porém há tendência de se tornarem circulares (aumento do eixo curto) nas mastites subclínicas que possuam presença de fibrose no parênquima mamário, dado ainda não relatado em ruminantes.

5. Conclusão

O uso da ultrassonografia clássica em modo-B é excelente ferramenta para o escaneamento do parênquima mamário, facilitando a detecção de fibroses oriundas de mastites infecciosas, bem como a identificação dos linfonodos supramamários, porém sua aplicação desacompanhada de outras técnicas diagnósticas para a detecção de mastites subclínicas, tal como a CCS, é desaconselhada. Ainda a redução na proporção eixo curto/longo dos linfonodos, com tendência de formato oval pode ser indicativo de mastite ativa.

A eslatografia ARFI em áreas de parênquima normais quando há presença de fibrose, pode indicar valores de corte para que haja diferenciação de um processo de mastite de animais com glândulas firbosadas, necessitando de estudos controlados e com mais glândulas e controle do grau de fibrose. O uso da elastografia também permite a diferenciação de áreas não fibrosadas (menor velocidade de cisalhamento) de áreas fibrosadas em parênquima (maior velocidade de cisalhamento). Sua realização nos linfonodos supramamários possui resultados mais promissores, onde altas velocidades de cisalhamento podem indicar mastites, além do predomínio da rigidez alta (hard), porém o comportamento da velocidade de cisalhamento no parênquima mamário é diferente, produzindo maiores valores em mastites já crônicas.

6. Bibliografia

Addis, M.F., Pisanu, S., Marogna, G., Cubeddu, T., Pagnozzi, D., Cacciotto, C., Campesi, F., Schianchi, G., Rocca, S., Uzzau, S., 2013. Production and Release of Antimicrobial and Immune Defense Proteins by Mammary Epithelial Cells following

409 Streptococcus uberis Infection of Sheep. Infection and Immunity 81, 3182–3197.
410 https://doi.org/10.1128/IAI.00291-13

411 Arsenault, J., Dubreuil, P., Higgins, R., Bélanger, D., 2008. Risk factors and impacts
412 of clinical and subclinical mastitis in commercial meat-producing sheep flocks in
413 Quebec, Canada. Preventive Veterinary Medicine 87, 373–393.
414 https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2008.05.006

415 Barbagianni, M.S., Mavrogianni, V.S., Vasileiou, N.G.C., Fthenakis, G.C., Petridis,
416 I.G., 2017. Ultrasonographic examination of the udder in sheep. Small Ruminant
417 Research 152, 86–99. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.12.009

418 Bradley, K.J., Bradley, A.J., Barr, F.J., 2001. Ultrasonographic appearance of the
419 superficial supramammary lymph nodes in lactating dairy cattle. Veterinary Record
420 148, 497–501. https://doi.org/10.1136/vr.148.16.497

421 Carbonell, G., Berná-Serna, J. de D., Oltra, L., Martínez, C.M., Garcia-Carrillo, N.,
422 Guzmán-Aroca, F., Salazar, F.J., Tudela, J., Berná-Mestre, J. de D., 2019. Evaluation
423 of rat liver with ARFI elastography: In vivo and ex vivo study. PLOS ONE 14, e0217297.
424 https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217297

425 Dillman, J.R., Stidham, R.W., Higgins, P.D.R., Moons, D.S., Johnson, L.A., Rubin,
426 J.M., 2013. US Elastography–derived Shear Wave Velocity Helps Distinguish Acutely
427 Inflamed from Fibrotic Bowel in a Crohn Disease Animal Model. Radiology 267, 757–
428 766. https://doi.org/10.1148/radiol.13121775

429 Feliciano, M.A.R., Uscategui, R.A.R., Maronezi, M.C., Simões, A.P.R., Silva, P.,
430 Gasser, B., Pavan, L., Carvalho, C.F., Canola, J.C., Vicente, W.R.R., 2017.

Ultrasonography methods for predicting malignancy in canine mammary tumors. PLOS ONE 12, e0178143. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178143

Fragkou, I.A., Boscos, C.M., Fthenakis, G.C., 2014. Diagnosis of clinical or subclinical mastitis in ewes. Small Ruminant Research 118, 86–92. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.12.015

Goddi, A., Bonardi, M., Alessi, S., 2012. Breast elastography: A literature review. Journal of Ultrasound 15, 192–198. https://doi.org/10.1016/j.jus.2012.06.009

Goertz, R.S., Schuderer, J., Strobel, D., Pfeifer, L., Neurath, M.F., Wildner, D., 2016. Acoustic radiation force impulse shear wave elastography (ARFI) of acute and chronic pancreatitis and pancreatic tumor. European Journal of Radiology 85, 2211–2216. https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2016.10.019

Hussein, H.A., EL-Khabaz, K.A.S., Malek, S.S., 2015. Is udder ultrasonography a diagnostic tool for subclinical mastitis in sheep? Small Ruminant Research 129, 121–128. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.05.010

Katsafadou, A.I., Politis, A.P., Mavrogianni, V.S., Barbagianni, M.S., Vasileiou, N.G.C., Fthenakis, G.C., Fragkou, I.A., 2019. Mammary Defences and Immunity against Mastitis in Sheep. Animals 9, 726. https://doi.org/10.3390/ani9100726

Khoramian, B., Vajhi, A., Ghasemzadeh-Nava, H., Ahrari-Khafi, M.S., Bahonar, A., 2015. Ultrasonography of the supramammary lymph nodes for diagnosis of bovine chronic subclinical mastitis. Iranian journal of veterinary research 16, 75–7.

451 Knuth, R.M., Stewart, W.C., Taylor, J.B., Yeoman, C.J., Bisha, B., Page, C.M., Rowley,
452 C.M., Lindsey, B.C., van Emon, M.L., Murphy, T.W., 2019. Subclinical mastitis in
453 sheep: etiology and association with milk somatic cell count and ewe productivity in
454 three research flocks in the Western United States1. Translational Animal Science 3,
455 1739–1743. https://doi.org/10.1093/tas/txz078

456 Marogna, G., Rolesu, S., Lollai, S., Tola, S., Leori, G., 2010. Clinical findings in sheep
457 farms affected by recurrent bacterial mastitis. Small Ruminant Research 88, 119–125.
458 https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.12.019

459 Mavrogianni, V.S., Menzies, P.I., Fragkou, I.A., Fthenakis, G.C., 2011. Principles of
460 Mastitis Treatment in Sheep and Goats. Veterinary Clinics of North America: Food
461 Animal Practice 27, 115–120. https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.10.010

462 Menzies, P.I., Ramanoon, S.Z., 2001. Mastitis of Sheep and Goats. Veterinary Clinics
463 of North America: Food Animal Practice 17, 333–358. https://doi.org/10.1016/S0749-
464 0720(15)30032-3

465 Nightingale, K., 2011. Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI) Imaging: A Review.
466 Current Medical Imaging Reviews 7, 328–339.
467 https://doi.org/10.2174/157340511798038657

468 Puggioni, G.M.G., Tedde, V., Uzzau, S., Dore, S., Liciardi, M., Cannas, E.A., Pollera,
469 C., Moroni, P., Bronzo, V., Addis, M.F., 2020. Relationship of Late Lactation Milk
470 Somatic Cell Count and Cathelicidin with Intramammary Infection in Small Ruminants.
471 Pathogens 9, 37. https://doi.org/10.3390/pathogens9010037

472 Quinlivan, T.D., 1968. Survey observations on ovine mastitis in New Zealand stud
473 Romney flocks. New Zealand Veterinary Journal 16, 149–153.
474 https://doi.org/10.1080/00480169.1968.33765

475 Rodrigues Simões, A.P., Rossi Feliciano, M.A., Maronezi, M.C., Uscategui, R.A.R.,
476 Bartlewski, P.M., de Almeida, V.T., Oh, D., do Espírito Santo Silva, P., da Silva, L.C.G.,
477 Russiano Vicente, W.R., 2018. Elastographic and echotextural characteristics of foetal
478 lungs and liver during the final 5 days of intrauterine development in dogs. Animal
479 Reproduction Science 197, 170–176.
480 https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.08.025

481 Senthilkumar, S., Kannan, T.A., Ramesh, G., Sumathi, D., 2019. Histological and
482 Immunohistochemical Observations of Supramammary Lymph Node in Sheep and
483 Goat. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 8, 74–82.
484 https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.808.009

485 Silva, P., Uscategui, R.A.R., Maronezi, M.C., Gasser, B., Pavan, L., Gatto, I.R.H., de
486 Almeida, V.T., Vicente, W.R.R., Feliciano, M.A.R., 2018. Ultrasonography for lymph
487 nodes metastasis identification in bitches with mammary neoplasms. Scientific Reports
488 8, 17708. https://doi.org/10.1038/s41598-018-34806-9

489 Turchi, B., Bertelloni, F., Marzoli, F., Cerri, D., Tola, S., Azara, E., Longheu, C.M.,
490 Tassi, R., Schiavo, M., Cilia, G., Fratini, F., 2020. Coagulase negative staphylococci
491 from ovine milk: Genotypic and phenotypic characterization of susceptibility to
492 antibiotics, disinfectants and biofilm production. Small Ruminant Research 183,
493 106030. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2019.106030

494 Watson, D.L., Davies, H.I., 1985. Immunophysiological activity of supramammary
495 lymph nodes of the ewe during the very early phase of staphylococcal mastitis.
496 Research in Veterinary Science 39, 52–58. https://doi.org/10.1016/S0034-
497 5288(18)31770-3

498 Youk, J.H., Son, E.J., Kim, J.-A., Gweon, H.M., 2017. Pre-Operative Evaluation of
499 Axillary Lymph Node Status in Patients with Suspected Breast Cancer Using Shear
500 Wave Elastography. Ultrasound in Medicine & Biology 43, 1581–1586.
501 https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2017.03.016

502 Zhou, J., Yang, Z., Zhan, W., Zhang, J., Hu, N., Dong, Y., Wang, Y., 2016. Breast
503 Lesions Evaluated by Color-Coded Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI) Imaging.
504 Ultrasound in Medicine & Biology 42, 1464–1472.
505 https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2016.02.014

506

507