

MARIA DA CONCEIÇÃO GOMES DE LIMA

**CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E BACTERIANA TOTAL,
SEQUENCIAMENTO DOS EXONS 1 E 2 DO GENE MANNOSE-
BINDING LECTIN (MBL) EM CAPRINOS DE REBANHOS
PERNAMBUCANOS**

**Recife – PE
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MARIA DA CONCEIÇÃO GOMES DE LIMA

**CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E BACTERIANA TOTAL,
SEQUENCIAMENTO DOS EXONS 1 E 2 DO GENE MANNOSE-
BINDING LECTIN (MBL) EM CAPRINOS DE REBANHOS
PERNAMBUCANOS**

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

**Orientadora: Prof.^a Dr.a Ana Lúcia
Figueiredo Porto**

**Co-orientadores: Prof. Dr. Rinaldo
Aparecido Mota
Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de
Souza**

Ficha catalográfica

L732c Lima, Maria da Conceição Gomes de
Contagem de células somáticas e bacteriana total,
sequenciamento dos exons 1 e 2 do gene Mannose-binding
Lectin (MBL) em caprinos de rebanhos pernambucanos /
Maria da Conceição Gomes de Lima. – 2009.
84 f. : il.

Orientador: Ana Lúcia Figueiredo Porto
Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Medicina
Veterinária, Recife, 2009.
Inclui referências e anexo.

CDD 636.39089

1. Cabra
2. Células cemáticas
3. Lectina
4. MBL
5. Polimorfismo
 - I. Porto, Lúcia Figueiredo Porto
 - II. Título

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E BACTERIANA TOTAL,
SEQUENCIAMENTO DOS EXONS 1 E 2 DO GENE MANNOSE-
BINDING LECTIN (MBL) EM CAPRINOS DE REBANHOS
PERNAMBUCANOS**

Tese Doutorado elaborada por

Maria da Conceição Gomes de Lima

Aprovada em/...../..... pela Banca Examinadora

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota
Co-orientador - Departamento de Méd. Veterinária da UFRPE, Recife – PE

Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza
Co-orientador – Departamento de Biologia – UFRPE, Recife – PE

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA/UFPE, Recife – PE

Prof^a.Dr^a.: Keila Aparecida Moreira
Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE, Garanhuns – PE

Prof^a. Dr^a. Áurea Wischral
Departamento de Méd. Veterinária da UFRPE, Recife – PE

**“O Senhor é o meu pastor.
Nada me falta.
Em verdes pastagens me faz repousar;
Para fontes tranqüilas me conduz,
e restaura minhas forças.
Ele me guia por bons caminhos,
por causa do seu nome.
Embora eu caminhe por um vale tenebroso,
Nenhum mal temerei, pois junto a mim estás;
teu bastão e teu cajado me deixam tranqüilo.**

**Diante de mim preparas a mesa,
à frente dos meus opressores;
unges minha cabeça com óleo,
e minha taça transborda.
Sim, felicidade e amor me acompanham
todos os dias da minha vida.
Minha morada é a casa de Javé,
por dias sem fim.**

(Samo 23)

DEDICATÓRIA

A Deus por guiar os meus caminhos e a Nossa Senhora por sua interceção, aos meus pais Manoel Gomes da Silva e Ana Maria Gomes de Lima, às minhas irmãs Ana Paula e Luciana e ao meu marido Fábio por seu amor incondicional

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter guiado meus passos e a Nossa Senhora por sua proteção na realização desse trabalho, que durante os momentos difíceis iluminou meu caminho.

A Professora Ana Porto pelo carinho, compreensão e orientação dedicada, importantes em minha formação e meu coração.

Ao Professor Rinaldo Mota por sua colaboração, orientação e presença muito importantes na realização desse trabalho.

Ao Professor Paulo Souza por sua atenção, colaboração e apoio muito importantes na realização desse trabalho.

Aos Professores que ajudaram de forma direta ou indireta na realização desse trabalho: Professor Dr. Leonildo B. G. da Silva, Prof.^a Dr.^a. Danielle Bruneska, Prof^o Dr. Sérgio Crovella, Prof^a Dr.^a Áurea Wischral, Prof^a.Dr.^a.: Keila A. Moreira, Prof.^a Dr.^a. Maria Taciana C. V. Soares, Prof.^a Dr.^a. Cíntia Rocha, Prof^o Dr. Lêucio Câmara.

Ao coordenador do curso de Pós-Graduação em Ciência Veterinária Professor Dr. Roberto Soares de Castro por sua atenção e compreensão na realização desse trabalho.

Ao coordenador do Progene Prof^o Dr. Severino Benone e sua equipe por sua atenção e colaboração de grande importância para a realização desse estudo.

Ao Diretor do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) Prof^o Dr. José Luiz de Lima Filho por sua atenção e colaboração nesse trabalho.

Aos secretários da Pós-Graduação: Edna e Tom por sua atenção e colaboração.

Aos secretários do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA): Romildo e Admilton por sua atenção e colaboração.

Aos responsáveis pelo transporte na Rural: Evandro (PREG) e motoristas

Aos amigos da biblioteca: Ana, Edna, Maria José, Lúcia, Admilton e Conceição.

Aos criadores que, mesmo sem citá-los nominalmente, agradeço muito a colaboração na realização desse trabalho.

Aos amigos do laboratório de bacterioses do Departamento de Medicina Veterinária e da Universidade Federal Rural de Pernambuco: Sineide, Elizabeth, Mércia, Andrei, Davi, Eduardo, Pedro, André, Orestes, Érika, Michele, Tércia, Ana Maria, Luciana.

Aos amigos do laboratório do LIKA: Pabyton, Dani Viana, Andéia, Sílvio, Luíza, Roberto, Dayse, Priscila, Jéferson, Lucas, Rafael, Veridiana, Elaine, Milena, Mariana, Tatiana, Maria Daniele, Márcia Nieves, Camila, Márcia Karine, Karen, Ataíde, Petrus, Pedro, Clarissa, Edgard, Júlio, Rosângela, Natália, Nataly, Sérgio e Erick.

Aos amigos do LIKA: Rafael, Conceição, Felipe, Ilma, Pauline, Carol, Bete, Gil, Sr. Otaviano, D. Celeste, Cláudio, Moisés.

Aos amigos: Germana, Flávio, Glenda, Viviane, Priscila e Marília por sua amizade presente e inesquecível e muito importante para mim.

A minha cunhada Luciana e sogros Ofélia e Edigardo.

A minha sobrinha Ana Luiza por existir apenas, mais suficiente para me fazer feliz.

As minhas irmãs: Ana Paula e Luciana por seu carinho, atenção e amor presentes.

A meu marido Fábio por seu amor, carinho e compreensão constantes.

Aos meus pais Manoel Gomes da Silva e Ana Maria Gomes de Lima a quem amo e agradeço de todo coração pelo apoio, compreensão, carinho de sempre.

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Célula apresentadora de antígeno
CBT	Contagem bacteriana total
CCS	Contagem de células somáticas
DNA	Ácido desoxiribonucléico
MASP	<i>MBL-associated serine protease</i> – serina protease associada à MBL
MBL	Mannose-binding lectin -Proteína ligadora de manose
MC	Mastite clínica
MS	Mastite subclínica
PCR	Reação de cadeia de polimerase
UFC	Unidade formadora de colônia

LISTA DE FIGURAS

- Revisão de literatura. Figura.1 Estrutura da lectina ligadora de manose (MBL), 27
destacando o domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD), as regiões dos quatro exons, sítios de ligação dependentes de cálcio, zona de interação com as proteínas MASP e as pontes dissulfeto
- Revisão de literatura. Figura.2 Formas de aglomerados de lectina ligadora de 30
manose (MBL). Nas seis ligações de carboidratos nas cabeças rodeadas de uma base central formada por colágeno e complexos com MBL associadas a serino proteases 1
- Artigo.2- Figura.1 Eletforese em gel de agarose à 1% das amostras amplificadas 78
com os primers S1 e AS2. Coluna M-Padrão de peso molecular (100 pb) colunas de 1 a 16- Produtos da amplificação de 780pb correspondentes ao exons 1 e 2 do gene MBL em caprinos
- Artigo.2- Figura.2 Produtos da PCR purificados após amplificação com kit de 79
purificação (Promega). Eletforese em gel de agarose a 1%. Coluna M-Padrão de peso molecular (100 pb); colunas de 1 a 16 corresponde ao produto amplificado, 780pb dos exons 1 e 2
- Artigo.2- Figura.3 Imagem representativa do seqüenciamento de uma amostra 79
para os exons 1 e 2 do gene da MBL (picos coloridos referentes às bases)
- Artigo.2- Figura.4 Comparação da seqüência conhecida com a das amostras 80
pesquisadas da região do exon 2 do gene da MBL de caprinos, evidenciando o polimorfismos

LISTA DE TABELAS

Artigo 1- Tabela 1. Percentual isolado e associado da contagem de células somáticas (CCS)e contagem bacteriana total (CBT) do leite de cabra produzido por propriedades na região Metropolitana do Recife e Agreste do estado de Pernambuco	59
Artigo 1- Tabela 2. Percentuais dos diferentes parâmetros físico-químicos do leite de cabra produzido por propriedades na região Metropolitana do Recife e Agreste do estado de Pernambuco de acordo com a CCS e CBT	60
Artigo 1- Tabela 3. Influência da higiene antes e depois da ordenha na contagem de células somáticas nas amostras coletadas	60
Artigo 2- Tabela 1. Seqüências dos Primers do senso 1 e antisenso 2 do gena MBL utilizados no estudo	78

RESUMO

A mastite é o processo inflamatório da glândula mamária de origem infecciosa ou não. Caracteriza-se por alterações físico-químicas e bacteriológicas do leite e lesões irreparáveis no tecido mamário. Em cabras exploradas para a produção de leite, a mastite é um grave problema, tanto por aumentar os custos da produção quanto pelos riscos à saúde pública. Neste estudo foram realizados os seqüenciamentos dos exons 1 e 2 do gene para MBL (lectina ligadora de manose) com o objetivo de correlaciona-los à suscetibilidade a mastite subclínica em caprinos. Utilizaram-se 145 cabras de raças e idades variadas e que não estavam no período colostrado nem na época de secagem, onde foram coletadas amostras de sangue e leite. No leite foi realizada a contagem de células somáticas (CCS) a fim de identificar a mastite subclínica, realizadas avaliações das características físico-químicas (gordura, proteína, lactose e sólidos), e exames bacteriológicos do leite. Das amostras de sangue foi extraído o DNA genômico para seqüenciamento dos exons 1 e 2 do gene da Mannose-Binding Lectin (MBL). Observou-se, a partir dos resultados obtidos, a presença de polimorfismo no exon 2 do gene da MBL em 8 amostras na região 1662 de animais considerados saudáveis. Foi observado ainda que 60% das amostras apresentaram valores para CCS inferiores a $1,0 \times 10^6$ células/mL revelando ausência de mastite subclínica e 40% das amostras mostraram CCS acima de $1,0 \times 10^6$ células/mL mostrando a presença da mastite subclínica. E ainda, 87,5% das amostras de leite apresentaram contagem bacteriana total (CBT) com valores inferiores 500.000 e 11,5% com valores iguais ou superiores a 500.000. Comparando-se os resultados obtidos no seqüenciamento, e pela presença do polimorfismo para o gene da MBL no exon 2, de animais com ausência de mastite subclínica, não se pode afirmar que a presença da mastite subclínica esteja relacionada ao polimorfismo nesse gene.

Palavras chaves: cabra, células somáticas, lectina, MBL, polimorfismo.

ABSTRACT

Mastitis is the inflammatory process of mammary gland which has infectious origin or not. It is characterized by physic-chemical and bacteriological alterations of milk and unrepairable lesions on the mammary tissue. In goats used for milk production, mastitis is a serious problem, as much for increasing production costs as for public health risks. In this work, the sequencing of exons 1 and 2 of MBL (mannose-binding lectin) gene was made and they were related to subclinic mastitis susceptibility in goats. 145 strain and age varied goats which were not at colostral time and drying time were used to collect blood and milk samples. These samples were evaluated through auxiliary diagnosis method, somatic cell count (SCC) to identify subclinic mastitis. Evaluations of milk physic-chemical characteristics (fat, protein, lactose and total solids) and bacteriological examination were also made. DNA was extracted from blood samples and exons 1 and 2 of MBL gene were sequenced. It was observed the presence of polymorphisms on exon 2 of MBL gene in 8 samples of the 1662 region of animals considered as healthy. It was seen that 60% of samples presented SCC values lower than 1.0×10^6 cells/mL, which reveals lack of subclinic mastitis and 40% of samples showed SCC values higher than 1.0×10^6 cells/mL, which reveals presence of subclinic mastitis. 87.5% of the milk samples presented total bacteriological counting (TBC) lower than 500,000 and 11.5% had values higher than 500,000. Although, by comparing results obtained on sequencing and lack of polymorphisms for exon 2 of MBL gene on samples with and without subclinic mastitis, it can not be affirmed that presence of subclinic mastitis is related to MBL gene polymorphism.

Key words: goat, somatic cells, lectin, MBL, polymorphism.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo geral	19
2.2. Objetivos específicos	19
3. REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1. Mastite	20
3.2. Contagem de células somáticas	22
3.3. Imunidade inata	23
3.4. A MBL (lectina ligadora de manose)	25
3.5. Métodos de detecção do polimorfismo da MBL	31
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
5. ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO	43
5.1. Artigo n 1	44
5.2. Artigo n 2	61
6. ANEXO	81

1. INTRODUÇÃO

O leite de cabra é o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de animais da espécie caprina sadios bem alimentados e descansados (Ministério da Agricultura, 2000).

A produção nacional diária de leite de cabra é de 22.000 litros, sendo a produção mensal de 660.000 litros e a produção anual de 7.920.000 litros. A região Nordeste produz diariamente 10.000 litros de leite de cabra, 45,4% da produção nacional (EMBRAPA, 2004/b).

A mastite é o processo inflamatório de origem infecciosa ou não, que atinge as diferentes estruturas da glândula mamária (SANTA ROSA, 1996). Caracteriza-se por alterações físico-químicas e bacteriológicas no leite, com lesões irreparáveis no tecido mamário (RADOSTITS et al., 2000). Em cabras exploradas para a produção de leite, a mastite é um grave problema, tanto por aumentar os custos da produção quanto pelos riscos à saúde pública (PERRIN et al., 1997).

O aumento dos custos é ocasionado pelos prejuízos econômicos decorrentes da redução da produção de leite e do período de lactação, perigo de transmissão para outros animais, demanda de maior tempo no manejo higiênico e descarte dos indivíduos cronicamente afetados (MURICY et al., 2002).

A qualidade do leite possui destacada importância sob o ponto de vista de saúde pública, sendo frequentes os casos de doenças associadas ao consumo de leite cru ou de derivados produzidos com leite contaminado com microrganismos patogênicos (ANUÁRIO MILKBIZZ, 1999).

Os agentes etiológicos determinantes da maioria das mastites são bactérias encontradas no meio ambiente. As mais frequentemente isoladas são: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Corynebacterium pyogenes*, *Clostridium welchi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus coagulase* positiva e negativa, *Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Pasteurella hemolytica* (SANTA ROSA, 1996).

Por causa da sua patogenicidade, o *S. aureus* deve ser considerado um agente importante da mastite caprina sendo responsável pela mastite clínica e subclínica, bem como, pela elevada taxa de morbidade e mortalidade. Os animais infectados por este microrganismo no leite

representam uma fonte de infecção para o rebanho e um perigo sério à saúde pública (SILVA, et al., 2004).

A mastite pode apresentar-se na forma clínica e subclínica; esta última representa um problema de diagnóstico, principalmente em regiões onde não se dispõe de pessoal e equipamentos especializados, uma vez que a grande quantidade de células epiteliais e partículas anucleadas presentes no leite interfere significativamente com os testes de rotina utilizados; pois causa alterações na composição do leite e aumento no número de células somáticas (PERRIN et al., 1997, MURICY et al., 2002).

O termo células somáticas abrange diferentes elementos celulares normalmente presentes no leite, compreendendo células de defesa do organismo e células epiteliais de descamação, que aumentam no caso das mastites, principalmente as de origem bacteriana (ANDRADE et al., 2001).

A enumeração das células presentes no leite é uma boa forma de acompanhar o estado sanitário do úbere, além de indicar possíveis reduções na produção de leite e alterações na sua composição físico-química, com conseqüente comprometimento do rendimento industrial (ANDRADE et al., 2001).

O diagnóstico da mastite aguda e crônica é realizado através da observação de alterações comportamentais e inspeção e palpação do úbere e posteriormente a avaliação da secreção láctea (SANTA ROSA, 1996).

A patogenicidade e a virulência dos microrganismos são fatores que determinam direta ou indiretamente como o sistema imunológico participa na resposta à infecção (STOCKHAM, 2000).

Na resposta inflamatória, o sistema imune da glândula mamária é ativado para eliminar o patógeno. Este mecanismo de defesa inclui os fatores anatômicos, celulares e solúveis que agem na coordenação e são cruciais à modulação da resistência da glândula mamária e sua suscetibilidade à infecção. Durante a mastite, é comum observar um número aumentado de células somáticas (neutrófilos) no leite (OVIEDO-BOYSO et al., 2006).

A interação entre as bactérias patogênicas, o epitélio, o endotélio, e as células do sistema imune da glândula mamária é complexo. Por esta razão, o estudo e a completa caracterização da resposta imunológica inata e adquirida da glândula mamária aos diferentes agentes etiológicos é diferente e necessário para compreender em detalhe a fisiologia patológica da

mastite, a fim de obter de forma eficiente o diagnóstico, tratamento e controle dessa doença (OVIEDO-BOYSO et al., 2006).

Uma das proteínas envolvidas no processo imunológico inato dos mamíferos é a MBL (lectina ligadora de manose). É um modelo de molécula do sistema imunológico inato sintetizado primariamente no fígado e serve como um primeiro mecanismo de defesa (HOFFMANN et al., 1999; UEMURA et al., 2002).

A MBL é uma proteína do plasma produzida pelos hepatócitos que opera como um receptor padrão de reconhecimento. Pode reconhecer as estruturas de superfície do hidrato de carbono de diversos micróbios clinicamente importantes como as bactérias (*Staphylococcus aureus*), levedura (*Candida albicans*) e vírus (*Influenza A*) (NETH et al., 2000).

Em humanos, a MBL executa um papel chave de primeira linha de defesa durante um curto intervalo de tempo necessário para desenvolver uma resposta imunológica específica. Também ativa o caminho para via de complemento da lectina, que requer uma MBL associada a uma protease sérica-2 (MASP-2) (serina-proteases associadas a lectinas ligadoras de manose). Homólogos da MBL humana (hMBL) têm sido identificados em uma variedade de mamíferos, peixes e animais primitivos.

A interação entre microrganismos e a MBL pode iniciar a fagocitose e a ativação do complemento, bem como a indução da resposta inflamatória por citocinas (KILPATRIC, 2002). Polimorfismos nas regiões estruturais e promotoras do gene da MBL são responsáveis pelas grandes diferenças interindividuais na expressão da MBL com baixos níveis de plasma de 3 a 8% da população geral (GARRED et al., 2003; MINCHINTON et al., 2003).

Indivíduos com baixos níveis de MBL, mostram aumentado risco de determinadas doenças infecciosas, particularmente quando o sistema imune está comprometido, como por exemplo na infância (KIELGAS et al., 2003; KOCH et al., 2001) e após a quimioterapia (MULLIGHAN et al., 2002; PETERSLUND et al., 2001). No entanto, algumas discrepâncias existem, e uma definição sobre um ponto inicial clinicamente significativo para a “deficiência da MBL” é desconhecida (ALAN & EZEKOWITZ, 2001; KILPATRIC et al., 2003; CASANOVA & ABEL, 2004).

Por outro lado, baixos níveis de MBL também podem conferir proteção contra alguns parasitas intracelulares (SANTOS et al., 2001), e a MBL também pode exercer funções modulatórias em uma grande quantidade de doenças inflamatórias, tais como, arteriosclerose,

bronquites asmáticas e diversas doenças autoimunes, promovendo respostas benéficas, mas também respostas potencialmente prejudiciais (HOGABOAM et al., 2004; GARRED et al., 2001).

Visto o crescimento da produção do leite de cabra e sabendo-se que a MBL executa um papel chave na primeira linha de defesa no desenvolvimento da resposta imunológica e reconhecimento de microrganismos clinicamente importantes.

Este estudo visou correlacionar o seqüenciamento do gene da MBL com a suscetibilidade a mastite em cabras realizada através da contagem de células somáticas, contagem bacteriana total, análises físico-químicas e microbiológicas do leite de cabras em animais saudáveis e acometidos pela mastite e seqüenciamento dos exons 1 e 2 do gene MBL caprino.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a contagem de células somáticas, as características físico-químicas e microbiológicas do leite e relacioná-los com o polimorfismo do gene BML em caprinos.

2.2. Objetivos específicos

- 1- Determinar as alterações da glândula mamária mediante a realização da contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) no leite caprino;
- 2- Avaliar as características físico-químicas e microbiológicas do leite caprino;
- 3- Detectar a presença do polimorfismo nos exons 1 e 2 do gene da MBL.

3. REVISÃO DE LITERATURA

A produção de caprinos tem um papel importante na pecuária em vários países do mundo. O Brasil, como país agrícola, conta com um importante rebanho caprino principalmente nas regiões Sudeste, Norte e Nordeste (ANUALPEC, 2001).

O valor do leite de cabra é reconhecido para a nutrição devido a propriedades peculiares, como sua composição protéica e lipídica, pois embora quantitativamente os teores de gordura e proteína do leite caprino sejam semelhantes aos do leite bovino, em termos de qualidade, diferem muito entre si.

Considerando as pessoas com alergia à lactose, geralmente ocorre uma tolerância maior para os derivados do leite caprino do que para os do leite bovino, em função do teor levemente inferior de lactose no leite de cabras leiteiras, quando comparado ao leite bovino. Contudo, nestes casos convém ao consumidor buscar a orientação de um nutricionista (OSMARI, 2009).

3.1 Mastite

Mastite é a inflamação total ou parcial da glândula mamária causada pela presença de um ou mais microrganismos patogênicos, podendo apresentar-se na forma aguda, crônica ou subclínica. Esta última tem como característica provocar apenas alterações na composição do leite e aumento no número de células somáticas (MURICY et al., 2002).

No Brasil, a prevalência da mastite em caprinos tem variado entre 22 e 75% (MOTA et al., 2000). Na região Nordeste, sinais clínicos de mastite foram relatados em 51,2% dos rebanhos (PINHEIRO et al., 2000).

A mastite é considerada uma das doenças mais importantes que acometem os rebanhos de caprinos leiteiros. Atribui-se a ela perdas na produção e, conseqüentemente, prejuízos econômicos ao produtor e à indústria (FONSECA & SANTOS, 2000). A conscientização sobre a importância de uma ordenha higiênica é fundamental no controle de mastites em cabras. Além disso, é conveniente realizar a rotineira inspeção das glândulas e o tratamento precoce dos traumatismos evitando posterior complicação. Antes de aplicar as teteiras, ou proceder com ordenha manual, é conveniente inspecionar o aspecto da secreção láctea, pela detecção rápida e a

segregação dos casos clínicos de mastites, evita-se a contaminação do equipamento de ordenha e a difusão das infecções.

A preparação do úbere e a desinfecção das teteiras antes da ordenha são medidas aplicadas em rebanhos bovinos com a finalidade de limitar novas infecções ocasionadas por microrganismos ambientais que colonizam o teto durante o período entre ordenhas (PANKEY, 1989). O principal risco de infecção é determinado pelos microrganismos que colonizam o óstio do teto, assim como pelas operações que favorecem a penetração dos microrganismos por meio do canal do teto. Diante desta situação, o momento da ordenha representa um ponto crítico para o controle das mastites em caprinos e ovinos. Além disso, deve-se considerar aqueles fatores individuais e ambientais que predis põem a instalação da infecção intramamária, neste último caso, intimamente ligado aos sistemas de exploração (MOTA, 2007).

As perdas econômicas originadas pelas mastites são elevadas nos rebanhos de pequenos ruminantes leiteiros. A diminuição da produção de leite devido a mastites clínicas e subclínicas, a diminuição da qualidade do leite, as repercussões sobre os animais adultos e lactantes e, ainda, a saúde do consumidor, são aspectos relacionados a estas perdas econômicas que justificam a grande necessidade em se estudar e desenvolver estratégias de controle para a doença.

O *Staphylococcus aureus*, o *Staphylococcus epidermidis* e o *Streptococcus agalactiae* foram os microrganismos mais isolados no rebanho caprino em estudo realizado por Meirelles et al. (1999). Segundo Ribeiro et al. (1999) através do cultivo microbiológico de amostras de leite caprino verificaram o predomínio de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativa.

O *Staphylococcus aureus* constitui-se no mais importante agente etiológico envolvido, por ter alta prevalência e apresentar maior patogenicidade (RAPOPORT, 1993). A mastite também é definida como inflamação do teto e caracterizada pelo aumento da contagem de células somáticas (CCS). Segundo Muricy et al., (2002) a contagem de células somáticas (CCS) é um método eficiente e têm sido utilizada no diagnóstico das mastites subclínicas. Poutrel e Lerondelle (1983) consideraram que 1×10^6 células/mL pode ser indicativo de mastite nos tetos infectados para cabras.

Mariano et al. (2002), em estudo de amostras de leite caprino observou que dos microrganismos isolados 36 (19,6%) foram bactérias enterotoxigênicas do gênero *Staphylococcus*, sendo 14 delas (38,8%) positivas para a espécie *S. aureus*.

O tratamento da mastite visa à eliminação dos agentes infecciosos por meio do uso de drogas antimicrobianas, sendo a identificação do tipo de microrganismo envolvido primordial para o sucesso da terapia, pois a análise de sensibilidade frente a antimicrobianos auxilia na droga a ser utilizada na terapia (TYLER & CULLOR, 2002).

3.2. Contagem de células somáticas (CCS)

A CCS do leite abrange os leucócitos e as células epiteliais. O número dessas células aumenta no leite proveniente de cabras com mastite em virtude sobre tudo do aumento no número de leucócitos infiltrados. Em bovinos, cuja secreção do leite é do tipo merócrino, a CCS é um bom teste indicador de mastite, já que o resultado da CCS reflete a quantidade de leucócitos, que corresponde ao grau de irritação glandular.

Em caprinos, o processo de secreção do tipo autócrino resulta em elevado número de partículas citoplasmáticas e células epiteliais no leite, constituintes do processo fisiológico normal dos animais. Além da mastite, diversos fatores influenciam a CCS do leite caprino, como raça do animal, condições climáticas, número de partos, fase da lactação, número diário de ordenhas e produção individual de leite (CHAPAVALL, 2008).

A contagem de células somáticas (CCS) é usada como indicador de qualidade do leite tanto para vacas como para cabras (HAENLEIN, 2002). Normalmente, a CCS no leite de cabras não infectadas é maior que no leite de vacas não infectadas. A CCS no leite de vacas livres de infecção intramamária é, em geral, inferior a 200.000 células/mL de leite (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1996) e no leite de cabras não infectadas, inferior a 400.000 células/ml (MCDOUGALL et al., 2001).

O valor para normalidade foi fixado em $1,0 \times 10^6$ células/mL para caprinos. Para ovinos este limite não está bem definido, pois a literatura menciona valores mínimos que variam de 200.00 células/mL até valores superiores a 1.000.000 células/mL (MOTA, 2007).

Chapaval (2008) considera saudáveis valores menores que 1.000 CCS/mL, até 2.000 infecção fraca e acima de 1.500.000 como sinal de infecção. Segundo Paes (2003), a CCS é útil na detecção da mastite, e contagens superiores a $1,0 \times 10^6$ células/ml de leite devem ser utilizadas como critério para a realização de exames microbiológicos confirmativos.

O Ministério da agricultura (2000) estabelece valores para proteína total (N x 6,38) % m/m, o mínimo de 2,8 e para lactose %m/v, o mínimo de 4,3 para todas as variedades de leite caprino.

Sabe-se, porém que a produção e qualidade do queijo podem ser influenciadas por vários fatores, incluindo a qualidade e composição do leite. Sendo que fatores como: raça animal, estágio de lactação, sistema de criação e tipo de alimentação (GREYLING et al., 2004; FEKADU et al., 2005; SORYAL et al., 2005; MORAND-FEHR et al., 2007) podem interferir na composição do leite e no conteúdo de gordura, proteína e sólidos totais no leite, são características importantes para a produção e qualidade do queijo (MAIA, 2008).

Quando se fala em valor nutritivo ou rendimento de produção, elementos com lactose, gordura e proteína são importantes na elaboração dos derivados do leite. A lactose, por exemplo, é um componente importante, não só por seu valor nutritivo, mas também por estar relacionado a problemas de textura e solubilidade em derivados lácteos. Além disso, é um componente em maior quantidade depois da água, sendo considerado o mais estável comparado com os demais elementos (TRONCO, 1997).

O Ministério da Agricultura estipula em 3% m/m o teor mínimo de gordura do leite de cabra a padronização em % m/m, para 3% (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2000).

3.3. Imunidade inata

O organismo dos mamíferos é susceptível a infecções por muitos agentes patogênicos, que fazem contato com o hospedeiro e estabelecem um foco de infecção, causando a doença. Tais microrganismos diferem muito em seu comportamento, nas estruturas de superfícies e nos mecanismos patogênicos, exigindo uma resposta diferente por parte das defesas do hospedeiro que constituem o sistema imunológico (JANEWAY et al, 2002).

O sistema imunológico é responsável pelo reconhecimento de substâncias estranhas, sua eliminação, remoção de células mortas e ou danificadas e destruição de células mutantes e cancerosas (LEHNER, 2003; SIERRA et al, 2005; MAGNADOTTIR, 2006)

A imunidade inata proporciona uma linha de defesa por meio de mecanismos efetores envolvendo o agente patogênico, atuando imediatamente após o contato. Esses mecanismos são ocorrem na prevenção do estabelecimento de uma infecção (JANEWAY et al, 2002).

O sistema imune possui duas partes importantes na eliminação de partículas estranhas, que são a imunidade inata e a imunidade adquirida que apresenta aspectos diferentes, como sistema de reconhecimento, células envolvidas e mecanismo de ação. A imunidade inata é a primeira linha de defesa e está presente na maioria dos organismos. Os receptores das células do sistema imune inato foram desenvolvidos durante o processo evolucionário. Por outro lado os receptores das células do sistema imune adquirido são desenvolvidos durante os rearranjos gênicos (LEHNER, 2003; SIERRA et al, 2005; MAGNADOTTIR, 2006).

Segundo Jack et al. (2001), a lectina ligadora de manose (MBL) é um importante componente do sistema imune inato. Esta proteína se liga aos múltiplos domínios de repetição de açúcar que estão nas superfícies microbianas, e em seguida, é capaz de ativar o sistema complemento.

Quando a resposta imune adaptativa é imatura ou comprometida, o sistema imune inato constitui o princípio da defesa contra a infecção. A MBL é uma lectina tipo-C que desempenha um papel central na resposta imune inata. Ela se liga à superfície microbiana dos carboidratos e medeia a opsonização e fagocitose diretamente e ativação do complemento pela via da lectina.

Uma grande variedade de isolados clínicos de bactérias, fungos, vírus e parasitas são vinculados pela MBL. Três polimorfismos no gene estrutural da MBL2 e 2 polimorfismos no gene promotor são comumente encontrados, resultando em baixo nível sorológico da MBL. Os estudos clínicos demonstraram que a insuficiência da MBL está associada a infecção bacteriana (EISEN & MINCHINTON, 2003).

3.4. A MBL (lectina ligadora de manose)

A história da MBL data de 1968, quando uma paciente com um defeito de fagocitose soro-dependente foi descrita. Os leucócitos polimorfonucleares da paciente revelaram uma capacidade diminuída em fagocitar partículas de *Saccharomyces cerevisiae* e *Staphylococcus aureus* inativadas por calor (MILLER et al., 1968). Contudo, as mesmas partículas eram fagocitadas normalmente em soro heterólogo, indicando que o problema era humoral. O defeito era revertido quando o plasma de outros doadores era utilizado no mesmo ensaio, o que resultou na melhora clínica. Um defeito fagocítico semelhante foi descoberto no soro da mãe da paciente, e em vários de seus parentes, sugerindo que essa condição pudesse ser herdada (GARRED et al., 2003a).

Estudos posteriores nas décadas de 70 e 80 confirmaram a relação entre esse defeito na opsonização e o aparecimento de infecções recorrentes, e mais do que isso, mostraram que esse defeito era relativamente comum (5-8%) em indivíduos aparentemente saudáveis (SOOTHILL & HARVEY, 1976).

A MBL foi pela primeira vez isolada do soro de coelho no final da década de 70. Já no começo dos anos 80, o defeito fagocítico foi relacionado ao sistema complemento, C3b/iC3b eram depositadas em quantidades menores do que a normal na superfície de leveduras incubadas com soro de indivíduos afetados. Porém, nenhuma anormalidade na função do sistema complemento pôde ser detectada, indicando que um co-fator até então desconhecido era o principal mediador dessa disfunção (KAWASAKY et al., 1978; TURNER et al., 1981).

Em 1987, foi demonstrado que a MBL tinha a capacidade de ativar o sistema complemento pela via clássica, propondo então os mecanismos que levavam a essa imunodeficiência, hoje se sabe que esse processo de ativação do complemento, na realidade, constitui uma nova via de ativação denominada frequentemente de via da MBL, que é capaz de ativar o complemento de maneira independente de anticorpo e de C1q. Pouco tempo depois foi demonstrado que o defeito opsonico dependente de C3 era causado pela falta de MBL, a reconstituição do soro defeituoso com MBL purificada eliminava o problema. A partir dessa descoberta começavam as pesquisas para desvendar as bases moleculares da deficiência da MBL (IKEDA et al., 1987; SUPER et al., 1989; DOMMETT et al., 2006).

Em 1988, um clone de cDNA humano que codificava a MBL foi isolado pela primeira vez. No ano seguinte o gene da MBL humana (*mb12*) foi clonado e sequenciado independentemente por Taylor et al. (1989) e Sastry et al. (1989).

A MBL é uma proteína de importante participação no sistema imunológico inato e representa a proteína central da ativação da via das lectinas do complemento. A concentração plasmática da MBL é determinada geneticamente e varia significativamente entre os indivíduos. A MBL é sintetizada no fígado, tendo importante função na imunidade inata do hospedeiro, por sua grande afinidade a resíduos de manose ou outros carboidratos que compõem bactérias, vírus e leveduras (TURNER, 2003). Dados recentes mostram que a MBL participa na modulação da inflamação e apoptose ao ligar-se aos receptores na superfície de fagócitos.

A unidade básica estrutural é um homotrímero de peptídeos de MBL (subunidades) que se autoassociam em uma tripla hélice (Figura 1). Contém quatro domínios distintos: um curto domínio N-terminal, rico em cisteína, seguido por um domínio colágeno, uma porção α -hélice chamada de pescoço “neck” e um domínio C-terminal de reconhecimento de carboidratos (CRD) (WALLIS et al., 2003).

A MBL do soro é uma estrutura multimérica composta de 6 trímeros (complexo multimérico reunidos como um bouquet de tulipas) (Figura 2) que circulam na corrente sanguínea como tetrâmeros, pentâmeros ou hexâmeros da unidade estrutural (WHORTLEY et al., 2005) e cada peptídeo possui um domínio C terminal dependente de cálcio que reconhece oligos sacarídeos ricos em manose e N-acetilglicosamina, presentes em uma ampla variedade de bactérias, vírus, fungos e parasitas.

Contudo a MBL não se liga a células humanas normais por que os açúcares que elas apresentam na superfície frequentemente terminam em ácido siálico. Por outro lado, padrões de glicosilação em células tumorais são frequentemente diferentes daqueles de células normais e algumas células são reconhecidas pela MBL (WALLIS, 2003).

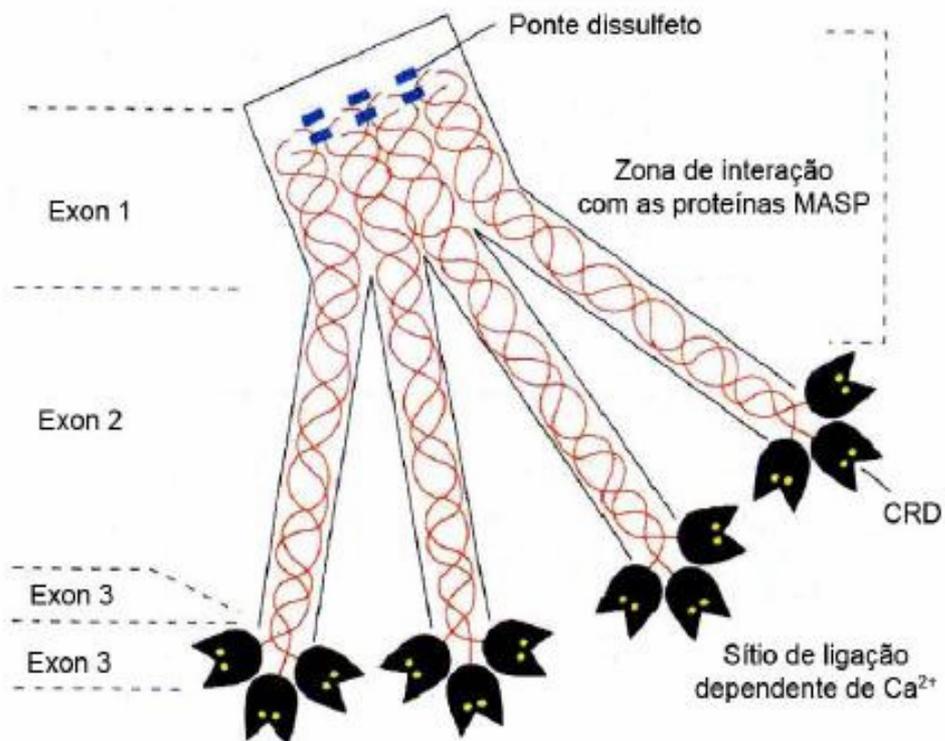


Figura1. Estrutura da lectina ligadora de manose (MBL), destacando o domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD), as regiões dos quatro exons, sítios de ligação dependentes de cálcio, zona de interação com as proteínas MASP e as pontes dissulfeto. Fonte: Tumer et al. (1996) (modificada).

A MBL apresenta um papel complexo nas doenças, pois sua deficiência tem sido associada com maior susceptibilidade a doenças infecciosas, especialmente por patógenos extracelulares. Por outro lado, altas concentrações de MBL sérica têm sido associadas a infecções por microorganismos intracelulares como *Leishmania spp.* e *Mycobacterium leprae* (CARVALHO, 2007).

Klein (2005), em numerosos estudos, tem mostrado que a deficiência de MBL está associada a um aumento da susceptibilidade a uma série de infecções. No entanto, a sua importância na defesa contra a infecção, é ainda debatida. Segundo Janeway et al. (2002), indivíduos deficientes na MBL sofrem com aumento substancial de infecções durante a fase jovem, indicando a importância da via da MBL-lectina na defesa do hospedeiro.

Estudos mostram que a MBL tem influência importante sobre o risco de aquisição de infecções, particularmente em crianças jovens. Onde há uma predisposição a uma variedade de infecções com predileção por doenças do trato respiratório (KOCH et al., 2001).

Esse padrão de infecções frequentes geralmente diminui ou desaparece com o tempo. Esta apresentação típica é compatível com o previsto "janela de vulnerabilidade" o papel da MBL serve para destacar a importância do sistema imune inato na proteção das crianças antes da maturação das respostas imune específicas (KLEIN, 2005).

Maas et al. (1998) relata o efeito protetor da MBL com um atraso no desenvolvimento da AIDS desde o momento da soroconversão pelo HIV. Pacientes com MBL variante alelos apresentaram menor CD4 no momento de desenvolver a AIDS, indicando que a deficiência da MBL pode influenciar o seu aparecimento.

Fidler et al.(2004) realizaram estudos em crianças, demonstrando que a MBL está altamente associada com o desenvolvimento de sepse ou síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS). Em estudos pediátricos, as crianças com alelos variantes no gene para MBL tiveram um aumento de sete vezes no risco de desenvolvimento de SRIS, em 48 h de apresentação para a pediatria de Unidade de Terapia Intensiva (UTI). Esta foi independente da condição subjacente do paciente, idade, sexo e etnia. Arraes et al. (2006), encontraram em crianças as três variantes MBL2 (Arg52Cys, Gly54Asp, Gly57Glu), as quais foram agrupadas e chamadas de alelo 0.

Segundo Klein (2005), a deficiência da MBL foi inicialmente identificada como a causa de um defeito comum de opsonização. Embora na MBL variantes alelos parecem ser representados

em doentes com infecções freqüentes, o mais importante papel para MBL pode estar em limitar infecções ou modular a resposta do hospedeiro a um ataque infeccioso / inflamatória insulto, no contexto da coexistente morbidade. Como o HIV, quimioterapia induziu neutropenia e críticas cuidados são modernos problemas.

Estruturalmente e funcionalmente, a MBL é semelhante indicador da via clássica do complemento, C1q, embora a MBL possa se ligar ao patógeno, independentemente do anticorpo (HOLMSKO et al., 2003).

A MBL ao ligar-se às estruturas de carboidratos comuns a vários patógenos intermedia a fagocitose por macrófagos (KUIPERS et al., 2003) e associada à protease serina MASP, possui a capacidade de iniciar a ativação do sistema complemento pela via das lectinas, independente da presença de anticorpos (PETERSEN et al., 2000).

Nos eqüinos, a MBL (eMBL) tem propriedades que são similares ao hMBL. Foram encontrados baixos níveis de atividade da MBL: MASP em cavalos doentes comparados com cavalos saudáveis. Isto sugere que a MBL está envolvida na resposta imunológica dos cavalos, onde sua baixa atividade pode ser usada para monitorar a função imunológica e suas conseqüências clínicas (PODOLSHY et al., 2006).

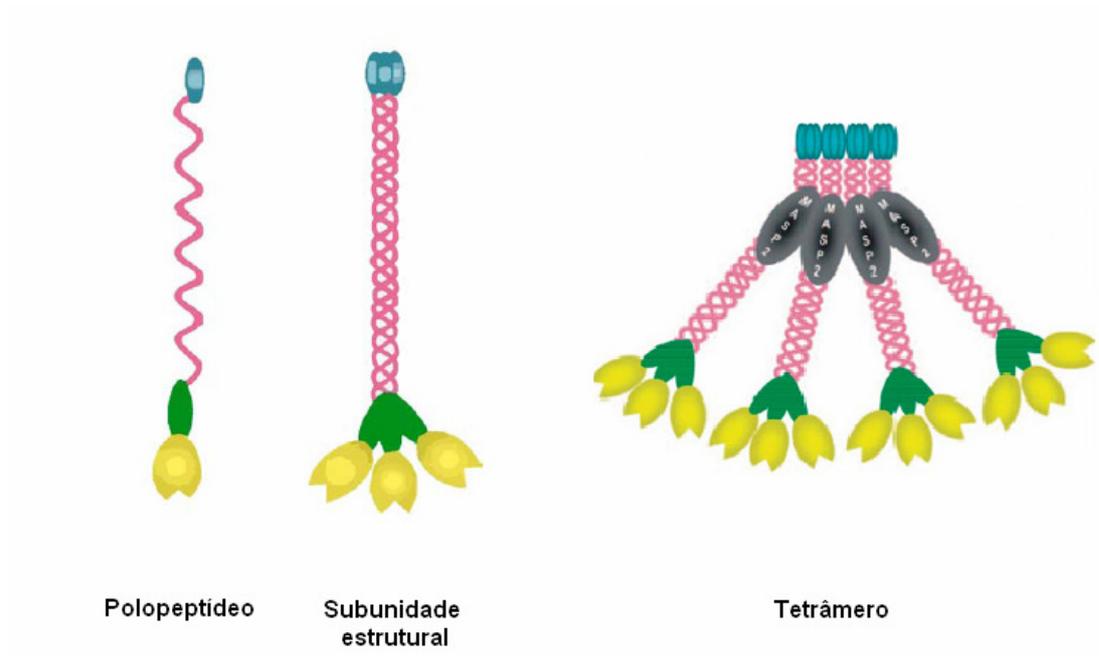


Figura 2. Formas de aglomerados de lectina ligadora de manose (MBL). Nas seis ligações de carboidratos nas cabeças rodeadas de uma base central formada por colágeno e complexos com MBL associadas a serino proteases 1 (FONTE: Adaptação de Dommet, Klein e Turner, 2006).

A MBL (lectina ligadora de manose), também pode ser chamada de (MBP) proteína ligadora de manose, é uma proteína do soro, cálcio-dependente que desempenha um papel na resposta imune inata através da ligação aos hidratos de carbono na superfície de um vasto leque de agentes patogénicos (vírus, bactérias, fungos, protozoários), onde poderá ativar o sistema complemento ou atuar diretamente como uma opsonina (Anders, 2001).

Talvez leve algum tempo antes dos pesquisadores com base em estudos epidemiológicos seja capaz de mostrar se a MBL é realmente um determinante importante de morbidade e mortalidade nesse século.

3.5. Métodos de detecção do polimorfismo da MBL

Foram descobertas milhões de seqüências de DNA variantes no genoma humano. Contudo a maioria dessas variantes é de polimorfismo em um único nucleotídeo (SNPs). Um forte grupo de SNPs marcadores mostra a possibilidade de estudar a base genética de doenças complexas em populações semelhantes. Pode-se usar como ferramentas genéticas um número grande de SNPs, identificados e caracterizados (GRAY et al., 2000).

Correntemente um método para a detecção de SNPs é o sequenciamento direto do DNA. Uma vez que as reações de sequenciamento estiverem prontas, uma única corrida no seqüenciador Applied Biosystems 3700 pode gerar seqüências de mais de 1500 fragmentos de DNA de 500 pb em 48 h com a mínima intervenção humana. O corante químico para sequenciamento irá detectar aproximadamente 95% de heterozigotos; outro corante é ligado ao primer e detectará 100% de heterozigotos (GRAY et al., 2000)

Quatro métodos usados normalmente para a identificação de SNP, ou mutação. São eles: identificação de polimorfismos por alteração de uma fita única (SSCPs) (Orita et al, 1989); análise de “heteroduplex” (LICHTEN & FOX, 1983); seqüenciamento direto e detector de variantes “array” (VDA) (WANG et al., 2006).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERS, KOCH et.al. Acute respiratory tract infections and mannose-binding lectin insufficiency during early childhood. **JAMA**. 285, p.1316-1321, 2001.

ALAN, R.; EZEKOWITZ, B. Mannose-binding lectin in prediction of susceptibility to infection. **Lancet**, 358, p.598–9, 2001.

ANDRADE, P.V.D.; SOUZA, M.R.; BORGES, I.; PENNA, C.F.A.M. Contagem de células somáticas em leite de cabra. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.**, v. 53, n.3, 2001.

ANUÁRIO MILKBIZZ. **Anuário Milkbizz** 1999/2000. São Paulo: Milkbizz, p.326,1999.

ANUALPEC. 2001. **Anual da pecuária brasileira**. São Paulo: Argos Comunicação, p. 359, 2001.

ARRAES, L. C; DE SOUZA, P. R.; BRUNESKA, D.; CASTELO FILHO, A.; DE SOUZA CAVADA, B.; DE LIMA FILHO, J. L.; CROVELLA, S. A relação custo-eficácia temperatura ensaio para a detecção de um único nucleotídeo polimorfismo no gene da MBL2 Infectadas pelo HIV-1 criança **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 39, p.719-723, 2006.

CARVALHO, E. G; UTIYAMA, S. R. R; KOTZE, L. M. S; REASON, I. A T. M. Lectina ligante de manose (MBL): características biológicas e associação com doenças. **Rev. bras. alergologia imunopatol** v.30, n.5, p.187-193, set.-out. 2007.

CASANOVA, J.L.; ABEL, L. Human mannose-binding lectin in immunity: friend, foe, or both **J Exp Med**, 199, p.1295–9, 2004.

CHAPAVAL, L. Mastite em cabras leiteiras x qualidade do leite: pontos importantes para produzir alimentos seguros. **PUBVET**, Londrina, v. 2, n. 41, Art.400, Out4, 2008.

D’ALESSANDRO, W.T. **et al.** Teor de proteína do leite de cabras Parda Alpina e Anglo-nubiana. **Reunião Anual da SBZ**, 28. João Pessoa, Anais...1991.

DOBROWOLSKI, J.W.; VOHORA, S. B.; KALPANA, S. et al. **Ethnopharmacol**, v. 35, p. 77-82, 1991.

DOMMET, R. M., KLEIN, N., TURNER, M. W. Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. **Tissue Antigens**. 68, p.193 -209, 2006.

EISEN, D. P.; MINCHINTON, R. M. Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases. *Clin. Infect. Dis.* V.3, n.11, Dec1, p.1456-505, 2003.

EMBRAPA -Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Leite caprino: um novo enfoque de pesquisa (b). http://www.capritec.com.br/artigos_embra020819a.htm
Acessado:22/09/2004.

FEKADU, B.; SORYAL, K.; ZENG, S.; VAN HEKKEN, D.; BAH, B.; VILLAQUIRAN, M. Changes in goat milk composition during lactation and their effect on yield and quality of hard and semi-hard cheeses. **Small Ruminant Research**, v.59, p.55-63, 2005.

FIDLER, K.J.; WILSON, P.; DAVIES, J.C.; TURNER, M.W.;PETERS, M.J.; KLEIN, N.J. Increased incidence and severity of the systemic inflammatory response syndrome in patients deficient in mannose-binding lectin. **Intensive Care Med**. 30, p.1438–1445, 2004.

FONSECA, L. F.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, p.175, 2000.

GARRED, P.; MADSEN, H.O.; BALSLEV, U.; HOFMANN, B.; PEDERSEN, C.; GERSTOFT, J.; SVEJGAARD, A.. Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannose-binding lectin. **Lancet** 349, p. 236–240, 1997.

GARRED, P.; VOSS, A.; MADSEN, H.O.; JUNKER, P. Association of mannose-binding lectin gene variation with disease severity and infections in a population-based cohort of systemic lupus erythematosus patients. **Genes Immun**, 2, p.442–50, 2001.

GARRED, P.; STROM, J.; QUIST, L.; TAANING, E.; MADSEN, H.O. Association of mannose-binding lectin polymorphisms with sepsis and fatal outcome, in patients with systemic inflammatory response syndrome. **F Infect Dis**. 188, p.1394-403, 2003/ a.

GARRED, P., LARSEN, F., MADSEN, H. O., KOCH, C. – Mannose-binding lectin deficiency-revisited. **Mol Immunol** 40, p.73–84, 2003/ b.

GRAY, I. C.; CAMPBELL, D. A. Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics. **Hum. Mol. Gent.**, v.9, n.16, p. 2403-8, 2000.

GREYLING, J.P.C.; MMBENGWA, V.M.; SCHWALBACH, L.M.J.; MULLER, T. Comparative milk production potential of indigenous and Boer goats under two feeding systems in South Africa. **Small Ruminant Research**, v.55, p.97-105, 2004.

HAENLEIN, G.F.W. Relationship of somatic cell counts in goat milk to mastitis and productivity. **Small Ruminant Research**, v.45, n.2, p.163-168, 2002.

HARTSHORN, k.L.; SASTRY, K.; WHITE, M.R.; ANDERS, E.M.; SUPER, M. EZEKOWITZ, R.A. et al. Human mannose-binding protein functions as an opsonin for Influenza A viruses. **F Clin Invest**, v.91, p.1414-20, 1993.

HOFFMANN, A.; KAFATOS, F.C.; JANEWAY, C.A.; EZEKOWITZ, R.A. Phylogenetic perspectives in innate immunity. **Science**, v.284, p.1313-1318, 1999.

HOGABOAM, C.M.; TAKAHASHI, K.; EZEKOWITZ, R.A.; KUNKEL, S.L.; SCHUH, J.M. Mannose-binding lectin deficiency alters the development of fungal asthma: effects on airway response, inflammation, and cytokine profile. **J Leukoc Biol**; v.75, p.805–14, 2004.

HOLMSKOV, U.; THIEL, S. et al. Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. **Annu Rev. Immunol**, v. 21, p. 547-78. 2003.

IKEDA, K., SANNOH, H., KAWASAKI, N., KAWASAKI, T., YAMASHINA, I. Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway. **J Biol Chem**. 262: p.7451–4, 1987.

JACK, D. L.; KLEIN, N. J.; TURNER, M. W. Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for attack and opsonophagocytosis. **Immunological Reviews**, v. 180, n. 1, p. 86-99, 2001.

JANAWAY, C.A.JR., TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M.J. *Imunobiologia. O sistema imune na saúde e na doença*. 5ªed. 55-63p. Atrmed, 2002.

JANEWAY, et. al. **Immunobiology**. Garland Science: New York, NY. p.50-61, 2005.

KAWASAKI, T., ETOH, R., YAMASHINA, I. Isolation and characterization of a mannan-binding protein from rabbit liver. **Biochem Biophys Res Commun**. 81: p.1018–24, 1987

KIELGAST,S.; THIEL, S.; HENRIKSEN, T.B.; BJERKE, T.; OLSEN, J.; JENSENIUS, J.C.; Umbilical cord mannan-binding lectin and infections in early childhood. **Scand J Immunol**, 57, p.167–72, 2003.

KILPATRICK, D.C. Mannan-binding lectin: clinical significance and applications. **Biochim Biophys Acta**, 1572, p.401-13, 2002.

KILPATRICK, D.C.; MCLINTOCK, L.A.; ALLAN, E.K.; COPLAND, M.; FUJITA, T.; JORDANIDES, N.E. et al. No strong relationship between mannan-binding lectin or plasma ficolins and chemotherapy-related infections. **Clin Exp Immunol**, 134, p.279–84, 2003.

KLEIN N.J. Mannose-binding lectin: do we need it? **Molecular Immunology**. 42 p. 919–924, 2005.

KOCH, A.; MELBYE, M.; SORENSEN, P.; HOMOE, P.; MADSEN, H.O.; MOLBAK, K. et al. Acute respiratory tract infections and mannose-binding lectin insufficiency during early childhood. **JAMA**, 285, p.1316–21, 2001.

KUIPERS, S., AERTS, P.C., VAN DIJK, H. Differential microorganism-induced mannose-binding lectin activation. **Immunology and Medical Microbiology**, 36, p.33-39, 2003.

LEHNER, R. I.; GANZ, T. Innate and adaptive mucosal immunity in protection against HIV infection, **Vaccine**, v.21, Suppl 2, Jun 1, p.S69-76, 2003.

LICHTEN, M. J. & FOX, M. S. Detection of non-homology-containing heteroduplex molecules. **Nucleic Acids Res.** v. 11, n. 12, Jun 25, p. 3959-71, 1983.

MAAS, J.; DE RODA HUSMAN, A. M. et al. Presence of the variant mannose-binding lectin alleles associated with slower progression to AIDS. **Amsterdam Cohort Study. Aids.** v.12, n.17, Dec 3, p.2275-80, 1998.

MAIA, M. DA S.; RÊGO, M. M. T.; SILVA, J. G. M. DA; MACIEL, F.C. Avaliação da composição do leite de cabras Moxotó, Canindé, SRD e Anglonubiana criadas no semi-árido do Rio Grande do Norte. **V Congresso nordestino de produção animal.** Aracaju – SE. 24-27/ 11/ 2008.

MAGNADOTTIR, B. Innate immunity of fish. **Fish Shellfish Immunol**, v.20, n.2, p.137-51, 2006.

MARIANO, F. A. et al., Cepas de *Staphylococcus* spp. Enterotoxigênicos isolados de leite caprino. Isolamento e identificação automatizada de cepas de *Staphylococcus* spp. Enterotoxigênicos oriundos de leite caprino. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 7, 2002, Campos de Goytacazes, RJ. **Anais...** Campos de Goytacazes: Universidade estadual do Norte Fluminense, 2002. NP.

McDOUGALL, S. et al. Relationships among somatic cell count, California mastitis test, impedance and bacterial status of milk in goats and sheep in early lactation. **Small ruminant Research**, v.40, n.3, p.245-254, 2001.

MEIRELLES, L.R.; GOTTSCHALK, S.; DA SILVA, A. V. ; CABRAL, K. G.; LANGONI, H. Monitoramento microbiológico e avaliação de provas diagnósticas na mastite caprina. **Revista NAPGAMA**, n.6, p.17-19, 1999.

MILLER, M.E.; SEALS, J.; KAYE, R.; LEVITSKY, L.C. A familial, plasma associated defect of phagocytosis. **Lancet** ii, p. 60–63, 1968.

MINCHINTON, R.M.; DEAN, M.M.; CLARK, T.R.; HEATLEY, S.; MULLIGHAN, C.G. Analysis of the relationship between mannose-binding lectin polymorphisms with sepsis and fatal outcome, in patients with systemic inflammatory response syndrome. **F Infect Dis**, 188: p.1394-403, 2002.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Instrução normativa 37**. Anexo: Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite de cabra, 2000.

MORAND-FEHR, P.; FEDELE, V.; DECANDIA, M.; LE FRILEUX, Y. Influence of farming and feeding systems on composition and quality of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v.68, p.20-34, 2007.

MOTA, R.A.; DE CASTRO, F.J.C.; DA SILVA, L.B.G.; OLIVEIRA, A.A.F. Etiologia e sensibilidade a antimicrobianos in vitro das bactérias isoladas do leite de cabras com mastite procedentes da Região Metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 19, n. 114, p. 26 – 29, 2000.

MOTA, R. A. Aspectos epidemiológicos, diagnóstico e controle das mastites em caprinos e ovinos. 3º Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte - 3º SINCORTE, em João Pessoa, Paraíba, Brasil, Novembro 2007.

MULLIGHAN, C.G.; HEATLEY, S.; DOHERTY, K.; SZABO, F.; GRIGG, A.; HUGHES, T.P. et al. Mannose-binding lectin gene polymorphisms are associated with major infection following allogeneic hemopoietic stem cell transplantation. **Blood** 99, p.3524–9, 2002.

MURICY, R. F.; SELLA, A.; SILVA, L.E.; SCHMIDT, V.; CARDOSO, M. I. Pontos de contaminação de leite produzido em uma propriedade de caprinos no município de Viamão-RS. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 9, n.1, p. 42-47, 2002.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Current concepts of bovine mastitis**. 4.ed. Madison : National Mastitis Council, p.64, 1996.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL (NMC). Laboratory handbook on bovine mastitis. Madison: NMC, p.222, 1999.

NETH, O.; JACK, D.L.; DODDS, A.W.; HOLZEL, H.; KLEIN, N.J.; TURNER, M.W. Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition. **Infect Immun**, 68: p.688-93, 2000.

ORITA, M.; SUZUHI, Y. et al. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. **Genomics**, v.5, n.4, Nov, p.874-9, 1989.

OSMARI, E. K. O leite de cabra como alimento funcional. **Página rural**. http://www.paginarural.com.br/artigos_detalhes.php?id=1361. Acessado: 31/ 01/09.

OVIEDO-BOYSO, J.; VALDEZ-ALARCÓN, J.J.; CAJERO-JUÁREZ, M.; OCHOA-ZARZOSA, A.; LÓPEZ-MEZA, J.E.; BRAVO-PATIÑO, A.; BAIZABAL-AGUIRRE, V.M. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. **Journal of Infection**, p.1-11, 2006.

PAES, P. R. O.; LOPES, S. T. A.; LOPES, R. S.; KOHAYAGAWA, A.; TAKAHIRA, R.K.; LANGONI, H. Efeitos da administração de vitamina E na infecção mamária e na contagem de células somáticas de cabras primíparas desafiadas experimentalmente com *Staphylococcus aureus*, 2003.

PANKEY, J. W. Premilking udder hygiene. **Journal of Dairy Science**, v.72, p.1308-1312, 1989.

PERRIN, G. G.; MALLEREAU, M. P.; LENFANT, D.; BAUDRY, C. Relationships between California Mastitis Tests (CMT) and somatic cell counts in dairy goats. **Small Ruminant Research**, v.26, n.1-2, p.167-170, 1997.

PETERSLUND, N.A.; KOCH, C.; JENSENIUS, J.C.; THIEL, S.; Association between deficiency of mannose-binding lectin and severe infections after chemotherapy. **Lancet** 358, p.637-8, 2001.

PETERSEN, S.V., THIEL, S., JENSEN, L., VORUP-JENSEN, T., KOCH, C., JENSENIUS, J.C. Control of the classical and the MBL pathway of complement activation. **Molecular Immunology**, 37, p.803-811, 2000.

PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA, A.M.G.; ALVES, F.S.F.; HADDAD, J.P.A. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 52, n. 5, p.534 - 543, 2000.

PODOLSKY, M.J.; LASKER, A.; FLAMINIO, M.J.B.F.; LAKSHMI, D.G.; EZEKOWITZ, R.A.B.; TAKAHASHI, K. Characterization of an equine mannose-binding lectin and its roles in disease. **Science direct** , v. 343, p.928-936, 2006.

POUTREL, B.; LERONDELLE, C. Cell content of goat milk: California mastitis test, Coulter counter, and Fossomatic for predicting half infection. **J. Dairy Sci.** 66, p.2575-2579, 1983.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C.C. BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K.W. **Veterinary Medicine.** 9 ed., London: W B Saunders, p.1877, 2000.

RAPOPORT, E. Mastitis caused by mycoplasmas in goats and in dairy sheep. **Goat Vet. Soc. J.**, v.93, p.67-70, 1993.

RIBEIRO, M.G.; MEGID, J.; MEIRA, D. R.; LARA, V. M.; CORTEZ, A. Mastite caprina. Estudo microbiológico, físico-químico e do diagnóstico através de provas indiretas. **Biológico**, v.61, n.2, p.27-33, 1999.

SANTA ROSA, J. Sistema Genital. In: _____ **Enfermidades em caprinos: diagnóstico, patogenia, terapêutica e controle**; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos, Brasília: Embrapa-SPI/Sobral: Embrapa-CNPC, p.63-66, - 1996.

SANTOS, I.K.; COSTA, C.H.; KRIEGER, H.; FEITOSA, M.F.; ZURAKOWSKI, D.; FARDIN, B. et al. Mannan-binding lectin enhances susceptibility to visceral leishmaniasis. **Infect Immun.** 69, p5212-5, 2001.

SASTRY , KEDARNATH; ; HERMAN, G. A.; DAY, L.; DEIGNAN, E.; BRUNS, G.; MORTON, C. C.; R. EZEKOWITZ, R. A. B. The human mannose-binding protein gene exon structure reveals its evolutionary relationship to a human pulmonary surfactant gene and localization to chromosome 10. **J. Exp. MED.** 170, p.1175-1189, 1989.

SEPULVIDA, C. & PUENTE, J. Natural killer cells and the innate immune system in infectious pathology. *Rev. Med Chil.* V. 128, n.12dec, p.1361-70, 2000.

SIERRA, S.; KUPFER, B. et al. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. **J. Clin. Virol.**, v.34, n.4, Dec, p.233-44, 2005.

SILVA, E.R. et al. Identification and in vitro antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from goat mastitis in the Northeast of Brasil. **Small Ruminant Research**, v.55, p.45-49, 2004.

SOOTHILL, J. F., HARVEY, B. A. M. - Defective opsonization: a common immunity deficiency. *Arch Dis Child*, v.51, p.91-9, 1976.

SORYAL, K.; BEYENE, F.A.; ZENG, S.; BAH, B.; TESFAI, K. Effect of goat breed and milk composition on yield, sensory quality, fatty acid concentration of soft cheeses during lactation. **Small Ruminant Research**, v.58, p.275-281, 2005.

SUPER, M., THIEL, S., LU, J., LEVINSKY, R. J., TURNER, M. W. Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect in opsonisation. *Lancet*, v.2, p.1236-19, 1989.

STOCKHAM, S. Hematologic changes due to bacterial infections. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & wilkins. p.38-43, 2000.

TAYLOR WF, JOHNSON JM, KOSIBA WA & KWAN CM. Cutaneous vascular responses to isometric handgrip exercise. **J Appl Physiol**, v.66, p.1586-1592, 1989.

TRONCO, V.M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria. p.166, 1997.

TURNER, M. W., MOWBRAY, J. F., ROBERTON, D. R. A study of C3b deposition on yeast surfaces by sera of known opsonic potential. **Clin Exp Immunol.** v.46, p.412-9, 1981.

TURNER, M. W. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. **Immunol. Today** v.17, p.532, 1996.

TURNER, M.W. The role of mannose-binding lectin in health and disease. **Molecular Immunology**, 40, p.423-429, 2003.

TURVILLE, S. G.; ARTHOS, J. et. al., HIV gp 120 receptors on human dendritic cells. *Blood*, v.98, n.8, p.2482-8, 2001.

TYLER, J. W.; CULLOR, J. S. Mammary gland health and disorders. In: SMITH, B. P. **Large animal internal Medicine.** 3 ed., St. Lous: mosby, p.1032, 2002.

UEMURA, k.; SAKA, M.; NAKAGAWA, T.;KAWASAKI, S.; THIEL, S.; JENSENIUS, J.C.; KAWASAK, T. L-MBP is expressed in epithelial cells of mouse small intestine. **J. Immunol.** v.169, p.6945-6950, 2002.

WALLIS, R. Structural basics for mannose-binding protein function in innate immunity. *Immunobiology of Carbohydrates.* P. 1-12, 2003.

WANG, W. P., NI, K. Y. et al. Approaches for SNP genotyping. **Yi Chuan**, v. 28, n. 1, Jan, p.117-26, 2006.

WORTHLEY, D. L.; BARDY, P. G. et al. Mannose-binding lectin: biology and clinical implications. **Intern J.** v.35, n.9, Sep, p.548-55, 2005.

5. ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

5.1. ARTIGO Nº1

CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS, ANÁLISES FÍSICO -QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DO LEITE DE CABRAS DA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE E AGRESTE DO ESTADO DE PERNAMBUCO

LIMA, M. C. G.^{1,2}; CARVALHO, V. C. V.^{2,3}; SILVA, G. M. M.²; SOUZA, A. F.²; SÁ, S. G.²; MEDEIROS, E. S.¹; LIMA-FILHO J. L.²; SOUZA, P. R. E.^{1,2}; MOTA, R. A.¹; PORTO, A. L. F.^{1,2}

1.Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

2.Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA

3.Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CpAM

Univesidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, R. Dom Manoel de Medeiros, s/n, CEP 52171-900, Recife, PE, Brasil.

RESUMO

As mastites subclínicas (MS), assim como as clínicas (MC) constituem um problema nas propriedades produtoras de leite caprino em todo o país, visto que afetam a qualidade do leite produzido e dessa forma interferem na qualidade dos produtos derivados. Esse trabalho teve o objetivo de identificar a presença da mastite subclínica através da avaliação da qualidade do leite de cabra. Foram utilizadas amostras de leite de 145 animais da Região Agreste de Pernambuco e Metropolitana do Recife. As amostras foram submetidas a contagem de células somáticas (CCS), testes físico-químicos por meio da citometria de fluxo utilizando o Somacount 300, testes microbiológicos e contagem bacteriana total (CBT). Verificou-se que 10% das amostras analisadas indicaram animais com mastite subclínica com valores de $CCS \geq 1 \times 10^6$ células/mL e

CBT \geq 500.000 UFC/mL. A composição geral em média das amostras de leite apresentou 3,24% para gordura, 3,31 % para proteína, 4,07 % para lactose e 11,57 % para sólidos. As amostras de leite cabra oriundas da região Agreste do estado de Pernambuco e Região Metropolitana do Recife, em sua maioria estão dentro dos padrões físico-químicos exigidos pela instrução normativa 37 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Os níveis de CCS estão dentro dos padrões estabelecidos na literatura, visto que não existe uma Legislação que regulamenta essa categoria. Já os resultados das análises microbiológicas, sugerem a ocorrência de falhas no manejo higiênico-sanitário na ordenha do leite. Conclui-se pela necessidade de rever os procedimentos de ordenha e a introdução de um programa de qualidade que proporcione uma melhoria na qualidade do leite e seus derivados.

PALAVRAS-CHAVE: Contagem de células somáticas, leite, cabra, mastite.

ABSTRACT

Subclinic Mastitis (SM), as well as the clinic ones (CM) constitutes a problem to the dairy goat milk farms in all the country, since it can affect the milk quality and subproducts. This paper had the objective of identify the presence of subclinic mastitis through goat milk quality. It was used samples of 145 animals of the Agreste region of Pernambuco and Metropolitan Region of Recife. The samples were submitted to the count of Somatic Cells Count (SCC), physico-chemical tests by fluxus' citometry using the Somacount 300, microbiological tests and total bacteriological count (TBC). It was verified that 10% of the analyzed samples had subclinic mastitis with CCS values $CCS \geq 1 \times 10^6$ cells/ml and $TBC \geq 500.000$ UFC/ml. This paper found general averages of 3,24% to fats, 3,31% to proteins, 4,07% for lactose and 11,57% to solids. As consequence it was observed that the goat milk samples of the Agreste region of Pernambuco state and Recife's Metrolopitan Region, in the most of the cases, are in accordance to the

physico-chemical standards required by the 37th standard instruction of the MAPA. About the SCC values, they are in accordance to the standards proposed by de majority of the authors. It is necessary to define SCC values in goats, for better orientation for the farmers.

KEY WORDS: Somatics cells count, milk, goat, mastitis.

1. INTRODUÇÃO

A produção e processamento do leite de cabra ao redor do mundo é apenas 2% do total da produção das cabras leiteiras, ovelhas leiteiras, búfalos leiteiros e gado leiteiro combinados (FAO, 1998), mas é de maior importância econômica em alguns países, como Bangladesh (55% de todo o leite), Somália (51%), Mali (43%), Indonésia (29%), Grécia (26%), Iran (16%) e Argélia (13%). Em outros países como França (4%), Espanha (4%), Itália (2%), e na área total do Mediterrâneo (18%), queijos e iogurtes de cabra têm uma significativa participação na indústria leiteira e na economia nacional (HAENLEIN, 1996).

A produção nacional diária de leite de cabra é de 22.000 litros. A região Nordeste produz diariamente 10.000 litros de leite de cabra, 45,4% da produção nacional. É recomendado por médicos e nutricionistas como uma opção de alimento que deve ser consumido por pessoas com problemas gastrointestinais, crianças alérgicas ao leite de vaca, por idosos e pessoas mal nutridas. Assim, sabe-se que o leite de cabra deve ter seu uso orientado como um fator de elevado potencial nutritivo capaz de proporcionar, a população em geral, uma alimentação completa (PELLERIN, 2001; EMBRAPA, 2004/b).

No Brasil, a Instrução Normativa 37 do MAPA (BRASIL, 2000), regulamenta as condições de produção, a identidade e os requisitos mínimos de qualidade do leite de cabra destinado ao consumo humano. São estabelecidos como padrões mínimos: 2,8% de proteína bruta, 4,3% de lactose, 8,20% de sólidos não gordurosos, entre outros.

Tais características do leite podem estar alteradas devido a presença da mastite provocando prejuízos ao produtor e consumidor. Segundo Radostitis et al. (2000), a mastite é o processo inflamatório de origem infecciosa ou não, que atinge as diferentes estruturas da glândula mamária. Caracteriza-se por alterações físico-químicas e bacteriológicas no leite, e lesões irreparáveis no tecido mamário. Em cabras exploradas para a produção de leite, a mastite é um grave problema, tanto por aumentar os custos da produção quanto pelos riscos à saúde pública (PERRIN et al., 1997).

O diagnóstico é considerado difícil, pois os testes indiretos da mastite bovina levam a resultados insatisfatórios, quando usados em cabras (SMITH & ROGUINSKY, 1977).

Em caprinos, o processo de secreção do tipo autócrino resulta em elevado número de partículas citoplasmáticas e células epiteliais no leite, constituintes do processo fisiológico normal dos animais. Além da mastite, diversos fatores influenciam a CCS do leite caprino, como raça do animal, condições climáticas, número de partos, fase da lactação, número diário de ordenhas e produção individual de leite (CHAPAVAL, 2008).

Diferente do leite de vaca, o leite das glândulas infectadas e não infectadas de cabras, apresentam freqüentemente mais de 1×10^6 células somáticas/mL (ZENG & ESCOBAR 1999). Assim também, segundo White e Hinckley (1999) foram observadas evidências de que leite não infectado pode conter mais de 1×10^6 células somáticas /mL e que o padrão máximo atual para leite de cabra comercial deveria ser mantido em seu nível corrente de 1×10^6 células somáticas /mL.

Segundo Poutrel & Rainard (1982) a contagem de células somáticas (CCS) no leite de cabras é o melhor método para se avaliar os processos inflamatórios na glândula mamária dessa espécie.

Considerando-se tais aspectos e enfatizando a importância da qualidade do leite e seus derivados, realizou-se esse estudo com o objetivo de oferecer subsídios para avaliação da qualidade do leite de cabra cru produzido em propriedades da região Agreste de Pernambuco e Metropolitana de Recife, avaliada pela contagem de células somáticas, qualidade físico-química e bacteriológica do leite.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas amostras de leite cru de 145 cabras em sete propriedades da Região Metropolitana do Recife e do Agreste do estado de Pernambuco, representada por pequenos e médios produtores. O leite foi coletado dos animais que não se encontravam em período colostrado e em fase de secagem ou tratamento. As amostras foram coletadas de animais de primeira e segunda lactação, de raça pura e mestiça, em propriedades escolhidas ao acaso e sistema de gerenciamento semi-extensivo e ordenha manual, onde muitas vezes a higiene antes e após a ordenha não era realizada.

Após higiene do óstio do teto com álcool a 70% e realizada a secagem com papel toalha descartável, desprezou-se os jatos iniciais de leite de cada teto e realizou-se o teste da caneca telada, o qual deve ser realizado em toda ordenha, para a identificação da mastite clínica.

Posteriormente, as amostras foram acondicionadas em três grupos de frascos, todos esterilizados: um grupo com pastilhas de bronopol, outro com gotas de azidiol e os frascos

esterelizados onde o leite foi conservado apenas sob refrigeração. As amostras foram então identificadas e transportadas em caixas isotérmicas e mantidas sob refrigeração.

Os tubos com pastilhas de bronopol usados para a CCS, análises físico-químicas referente aos teores de lactose, proteína, gordura e sólidos, assim como os tubos com gotas de azidiol foram utilizadas para contagem bacteriana total (CBT). Utilizou-se o equipamento eletrônico Somacount ® 300 para CCS, avaliação dos teores de proteína, gordura, lactose e sólidos (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1999) e para a contagem bacteriana total (CBT) foi usado a Bentley 2000® (IAL, 1976).

O leite refrigerado foi utilizado para a realização das análises microbiológicas. E os exames microbiológicos das amostras foram realizados após homogeneização do leite. Inoculou-se então amostras do leite com alça de platina na superfície do ágar sangue ovino a 5%. Após incubação das placas por 24-48 horas a 37°C, realizaram-se leituras, anotando-se as características morfológicas das colônias e aspectos morfotintoriais à coloração do Gram (CARTER, 1988).

Após efetuadas as análises do leite cru, foi calculada a média e os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas através do teste de Tukey ($P > 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Contagem de células somáticas

Observou-se que 40% das amostras do leite caprino avaliado possuíam valores iguais ou superiores a 1×10^6 céls/ mL revelando a presença de mastite subclínica. Estes valores estão de acordo com Pessoa et al. (1999) e HINCKLEY (1990) que determinaram como nível máximo de

células somáticas no leite de cabra em 1×10^6 céls/ mL. Contudo, segundo White e Hinckley (1999) foram observadas evidências de que leite não infectado pode conter mais de 1×10^6 céls/ mL e que o padrão máximo de CCS atual para leite de cabra comercial deveria ser mantido no mesmo valor citado.

O valor de 40% para CCS encontrado para o leite caprino por esse trabalho foi mais elevado quando comparamos aos números obtidos por Poutrel e Lerondelle (1983) e Contreras et al. (1995) com prevalência de 18% na Espanha, 36% na Inglaterra e 32,6% na França para mastite subclínica em cabras.

Quando utilizou-se o teste para CBT, onde 500.000 UFC/mL é o limite permitido (BRASIL, 2000), em conjunto com CCS foi observado que apenas 10% das amostras testadas nesse trabalho apresentaram mastite subclínica (Tabela 1).

3.2. Teor de Proteínas, Gordura, Lactose e Sólidos

Das amostras analisadas quanto a composição do leite foram obtidas médias gerais de 3,31 % para proteína, 3,24% para gordura, 4,07 % de lactose e 11,57 % para sólidos. Bueno et al. (1991), também encontraram valores aproximados para o leite de cabras de 3,28% proteína, 4,79% gordura e 5,32% para lactose.

Foi encontrado neste estudo, valores menores de lactose, comparando-se aos valores encontrados por Gomes et al. (2004), que encontrou 4,33 % de lactose, assim como Prata et al. (1998), que obteve 4,35 % para lactose e ainda, 3,27 % de proteína e 3,74 % de gordura em trabalho realizado na região Sudeste do Brasil

Resultados obtidos por Zanela et al. (2006) em trabalho realizado com leite de cabra no Rio Grande do Sul, demonstraram valores de 2,47 % para proteína, 3,90 % para gordura, 4,35 %

para lactose e 12,65 % de sólidos. Já neste trabalho observaram-se valores menores de gordura, lactose e sólidos, contudo valores de proteína foram maiores.

Pesquisas documentaram diferenças patológicas distintas no processo de secreção do leite entre vacas e cabras leiteiras (HAENLEIN & HINCKLEY, 1995); assim estas diferenças criaram uma lacuna na justificativa para aplicar as normas regulatórias do leite de vaca, especificamente para CCS; onde as normas para leite de vaca atuais para CCS são discriminatórias contra o leite de cabra, assim normas separadas devem ser determinadas para que os produtores e consumidores do leite caprino não sejam prejudicados (HAENLEIN, 2002).

Ao relacionar a CCS aos valores percentuais físico-químicos de gordura, proteína, lactose e sólidos respectivamente (Tabela 2), observou-se que o valor de lactose foi mais elevado nas amostras com ausência de mastite, ao contrário dos valores para gordura e proteína, que apesar de estarem dentro do valor exigido pelo Ministério da Agricultura. Ainda observou-se que não houve diferença estatística significativa para os valores de sólidos no leite caprino ($P > 0,05$).

Estes resultados corroboram com Min et al. (2007), que não encontraram diferenças significativas em amostras de leite de cabra com infecção intra mamária e amostras consideradas normais, para os valores de gordura, proteína e sólidos totais. Os percentuais médios de lactose tenderam a ser menor no leite de úberes infectados. Isso também pode ser observado com relação à presença da mastite subclínica e a composição físico-química do leite (Tabela 2).

Comparando-se os valores médios obtidos por esse estudo, para mastite subclínica e aqueles considerados normais, aos valores da Instrução Normativa 37 do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2000), observamos que os percentuais de gordura estão dentro dos padrões exigidos. Assim como para o percentual de proteína e sólidos totais. Já com relação a lactose observa-se resultados inferiores aos exigidos, contudo sabe-se que a lactose é um dos elementos usados na produção de produtos lácteos, assim como queijo (ALMEIDA et al. 2001).

Contudo em estudo realizado por Min et al. (2007), a CCS foi negativamente correlacionada com os valores de gordura do leite, lactose e sólidos totais. Além disso, as amostras infectadas não interferiram na produção de proteína, contrastando com relatos de Leitner et al. (2004/a, b), que observaram aumento da proteína no leite caprino com infecção intramamária.

3.3. Análise bacteriológica

Tem sido demonstrado que a infecção bacteriana aumenta a CCS em ovinos e caprinos (MORONI et al. 2005/a, b). Apesar disso, existe discussão sobre a relação entre CCS e a infecção intramamária em cabras leiteiras (PAAPE et al., 2001). E segundo Min et al. (2007) e Zeng et al. (1999), nem sempre as quantidades de CCS são mais baixas em úberes não infectados.

Entre as amostras analisadas positivas, observou-se que 98,3% foram positivas *Staphylococcus* spp., 3,5% de *Streptococcus* sp; 1,8% de *Bacillus* sp, 1,8% de *Corynebacterium* sp e 1,8% de *Enterobacter aerogenes*. O *Staphylococcus* spp foi o microrganismo mais encontrado nesse estudo, concordando com Contreras et al. (1995), Ryan & Greenwood (1990) e Pessoa et al. (1982). Devido a sua patogenicidade, *S. aureus* é o mais significativo patógeno da glândula mamária caprina (SMITH & SHERMAN, 1994).

Em um estudo extensivo de vacas na Grécia durante a lactação, foi descoberto que infecções por *Streptococcus* são raros em cabras, ao contrário das vacas leiteiras (KALOGRIDOU – VASSILIADOU, 1991). A presença de patógenos relacionados à mastite em amostras de leite de cabras normais foi 59% de *Staphylococcus* spp., (*Staphylococcus aureus* 17%, *S. epidermidis* 14%, *S. capitis* 13%, *S. hyicus* 11%), 30% de *Bacillus* spp., 4% de colidormes, 3% de *Micrococcus* spp., 2% *Streptococcus* spp., 1% *Corybacterium* spp. 1% *Pseudomonas* spp (HAENLEIN, 2002).

Animais infectados servem como um reservatório para infecções dentro do rebanho. As bactérias *S. aureus* são capazes de provocar toxinfecção alimentar se o leite estiver com concentrações altas o suficiente para o consumo (LEWTER et al., 1984).

Observa-se na tabela 3, que a higiene antes e após a ordenha pode interferir na CCS e na saúde da glândula, por conseguinte na qualidade do leite produzido, pois segundo podemos observar, todas propriedades que não fizeram higiene antes da ordenha apresentaram CCS maiores do que esperado, divergindo, em sua maioria das que realizavam a desinfecção antes e após a ordenha.

Segundo Min et al. (2007), valores para CCS como os encontrados neste trabalho, nem sempre são menores comparando-se animais saldáveis, sem infecção, com os doentes, a CCS não é sempre menor nos animais com úberes desinfetados. Grandes variações na prevalência das infecções intra mamárias foram observadas em toda a fase de lactação. E ainda, McDougall et al. (2002), sugere maior prevalência de infecções intra mamárias com maior CCS em caprinos leiteiros (35,5%) do que para os ovinos (19,0%).

4. CONCLUSÃO

As amostras do leite de cabra oriundas da região Agreste do estado de Pernambuco e Metropolitana do Recife, em sua maioria estão dentro dos padrões físico-químicos exigidos pela instrução normativa 37 do MAPA. Já os níveis de CCS estão dentro dos padrões estabelecidos na literatura, visto que não existe uma Legislação que regule essa categoria. Por outro lado, os resultados das análises microbiológicas sugerem a ocorrência de falhas no manejo higiênico-sanitário na obtenção do leite.

Nota-se a necessidade de rever os procedimentos de ordenha e higienização, pois o manejo correto e a introdução de um programa de qualidade proporcionará uma melhoria da qualidade do leite e seus derivados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, K. E.; BONASSI, I. A.; ROÇA, R. O. Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo minas frescal. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.21, n2, p.187-192, maio-ago. 2001.
- BERGONIER, D; CREMOUX, R.D.; RUPP, R.; LAGRIFFOUL, G. L.; BERTHELOT, X. Mastitis of small dairy ruminants. **Veterinary Research** 34, p.689–716, 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº37 de 31 de outubro de 2000. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite de Cabra. (**Diário Oficial da República Federativa do Brasil**), Brasília, Publicado em: 08/11/2000 , Seção 1 , P. 23. Acessado: 08/ 01/ 2009.
- BUENO, N.S., GADINI, C.M. e LARA, M.A.C. Produção e composição do leite de cabras da raça Anglo-nubiana. **Reunião Anual da SBZ**, 28. João Pessoa. Anais...1991.
- CARTER, G. R. **Fundamentos de bacteriologia e microbiologia veterinária**. Roca, São Paulo, p.250, 1988.
- CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE GADO DE LEITE - CNPGL– Embrapa. Disponível em www.cnpgl.embrapa.br, Acessado: 05/ 2006.

- CHAPAVAL, L. Mastite em cabras leiteiras x qualidade do leite: pontos importantes para produzir alimentos seguros. **PUBVET**, Londrina, v.2, n.41, Art400, Out4, 2008.
- CONTRERAS, A.; CORRALES, J. C.; SIERRA, D.; MARCO, J. Prevalence and aetiology of non-clinical intramammary infection in Murciano-Granadina goats. **Small Rumin. Res.** 17, p.71-78, 1995.
- EMBRAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Leite caprino um novo enfoque de pesquisa** http://www.capritec.com.br/artigos_embrapa_020819a.htm **Acessado: 22/ 09/ 2004/b.**
- FAO, Yearbook of Production. Rome, Italy, v.51, p.239, 1998.
- GOMES, V.; Paiva, A.M.M.; LIBERA, D.; MADUREIRA, K.M.; ARAÚJO, W.P. Influência do estágio de lactação na composição do leite de cabras (*Capra hircus*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** .41, p.339-342, 2004.
- HAENLEIN, G. F. W. Relationship of somatic cell counts in goat milk to mastitis and productivity. **Small Ruminant Research** v.45, p.163–178, 2002.
- HAENLEIN, G.F.W., Hinckley, L., Goat milk somatic cell count situation in USA. **Int. J. Anim. Sci.** 10, p.305–310, 1995.
- HAENLEIN, G.F.W. Nutritional value of dairy products of ewe and goat milk. In: Anifantakis, E.M. (Ed.), Proceedings of the IDF/CIRVAL Seminar on Production and Utilization of Ewe and Goat Milk. **International Dairy Federation**, Brussels, Belgium, p.159–178, 1996.
- HINCKLEY, L.S., Revision of the somatic cell count standard for goat milk. **Dairy Food Environ. Sanitat.** 10, p.548–549, 1990.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. São Paulo: IAL, v.1, p.371, 1976.

- KALOGRIDOU-VASSILIADOU, D., Mastitis-related pathogens in goat milk. **Small Rumin. Res.** 4, p.203–212, 1991.
- LEITNER, G.; MERIN, U.; SILANIKOVE, N. Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in goats. **Journal of Dairy Science** v.87, p.1719–1726, 2004/a.
- LEITNER, G.; MERIN, U.; SILANIKOVE, N.; EZRA, E.; CHAFFER, M.; GOLLOP, N.; WINKLER, M.; GLICKMAN, A.; SARAN, A. Effect of subclinical intramammary infection on somatic cell counts, NAGase activity and gross composition of goats' milk. **Journal of Dairy Research** v.71, p.311–315, 2004/b.
- LEWTER, M. M.; MULLOWNEY, P. C.; BALDWIN, E. W.; WALKER, R. D. Mastitis in goats. **Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.** v.6, n.7, S417-S425.
- MCDOUGALL, S.; PANKEY, W.; DELANEY, C.; BARLOW, J.; MURDOUGH, P. A.; SCRUTON, D. Prevalence and incidence of subclinical mastitis in goats and dairy ewes in Vermont, USA. **Small Ruminant Research.** v.46, p.115–121, 2002.
- MIN, B. R.; TOMITA, G.; HART, S. P.; GARZA, K. de La Effect of subclinical intramammary infection on somatic cell counts and chemical composition of goats' milk **Journal of Dairy Research.** v.74, p.204–210, 2007.
- MORONI, P.; PISONI, M.; ANTONINI, M.; RUFFO, G.; CARLI, S.; VARISCO, G. e BOETTCHER, P. Subclinical mastitis and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus caprae* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from two Italian goat herds. **Journal of Dairy Science** v.88, p.1694–1704, 2005/a.
- MORONI, P.; PISONI, M.; ANTONINI, M.; RUFFO, G.; CARLI, S.; VARISCO, G. e BOETTCHER, P. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from chronically infected dairy goats. **Journal of Dairy Science.** v.88, p.3500–3509, 2005/b.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL (NMC). **Laboratory handbook on bovine mastitis.**

Maison: NMC, p.222, 1999.

PAAPE, M.; POUTREL, B; CONTRERAS, A; MARCO, J.C. e CAPUCO, A..V. Milk somatic cells and lactation in small ruminants. **Journal of Dairy Science** 84 (E. Suppl.) E237–E244, 2001.

PELLERIN, P. Goat's milk in nutrition. **Annales Pharmaceutiques Francaises**, v.59, n.1, p.51-62, 2001.

PERRIN, G. G.; MALLEREAU, M. P.; LENFANT, D.; BAUDRY, C. Relationships between California Mastitis Tests (CMT) and somatic cell counts in dairy goats. **Small Ruminant Research**, v.26, n.1-2, p.167-170, 1997.

PESSOA, A. L. P.; LIMA JÚNIOR, A. D.; MOTA, R. A. Estudo do limiar de células somáticas no leite de cabras na região Metropolitana de Recife e Agreste d Pernambuco. **Ciênc. vet. tróp.** Recife, v.2, n.2, p.100-107, maio/ago. 1999.

POUTREL, B.; RAINARD, P. Predicting the probability of quarter infection (by major pathogens from somatic cell concentration). **American Journal Veterinary Research**, v.43, p.1296-1299, 1982.

POUTREL, B.; LERONDELLE, C. Cell content of goat milk: California mastitis test, Coulter counter, and Fossomatic for predicting half infection. **J. Dairy Sci.** v.66, p.2575-2579, 1983.

PRATA, L.F.; RIBEIRO, A.C.; REZENDE, K.T.; CARVALHO, M.R.B.; RIBEIRO, S.D.A.; COSTA, R.G. Composição, perfil nitrogenado e características do leite caprino (saanen). Região sudeste, Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** V. 18, n. 4 Campinas Oct./Dec. 1998.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C.C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K.W. **Veterinary Medicine.** 9 ed., London: W B Saunders, p.1877, 2000.

- RYAN, D. P.; GREENWOOD, P. L. Prevalence of udder bacteria in milk samples from four dairy goat herds. **Aust. Vet. J.** v.67, n.362-363, 1990.
- SMITH, M. C.; ROGUINSKY, M. Mastitis and other diseases of the goat's udder. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.171, p.1241-1248, 1977.
- SMITH, M. C.; SHERMAN, D. M. Mammary gland and milk production. In: **Goat Medicine**, Lea and Febiger, Philadelphia. PA, USA, p.474-479, 1994.
- SNEDCOR, G. W. & COCHRAN, W. G. **Statistical methods**. 8.ed. Ames: Iowa State University, p.503, 1989.
- SORYAL, K.A.; ZENG, S.S.; MIN, B.R. et al. Effect of feeding treatments and lactation stages on composition and organoleptic quality of goat milk Domiati cheese. **Small Ruminant Research**, v.52, n.1-2, p.103-107, 2004.
- WHITE, E. C. e HINCKLEY, L. S. Prevalence of mastitis pathogens in goat milk. **Small Rum. Research**. v.33. p.117-121, 1999.
- ZANELA, M. B.; SCHMIDT, V.; PINTO, A. T.; MACHADO, M.; SOUZA, P. A. S. C.; SILVA, F. F. P.; REICHERT, S; RIBEIRO, M. E. R. **Produção e composição química do leite de cabra na expointer**. RS, 2006.
- ZENG, S.S., ESCOBAR, E.N., HART, S.P., HINCKLEY, L., BAULTHAUS, M., ROBINSON, G.T., JAHNKE, G. Comparative study of the effects of testing laboratory, computing method, storage and shipment on somatic cell counts in goat milk. **Small Rumin. Res.** v.31, p.103–107, 1999.

Tabela 1. Percentual isolado e associado da contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) do leite de cabra produzido por propriedades na região Metropolitana do Recife e Agreste do estado de Pernambuco

PROPRIEDADE	CCS < 1.000.000	CCS ≥ 1.000.000	CBT < 500.000	CBT ≥ 500.000	CCS ≥ 1.000.000 e CBT ≥ 500.000
1	53,66%	46,34%	95,12%	4,88%	4,88%
2	57,14%	42,86%	85,71%	14,29%	0,00%
3	56,25%	43,75%	90,63%	9,38%	9,38%
4	61,54%	38,46%	86,54%	13,46%	13,46%
5	43,48%	54,35%	67,39%	26,09%	26,09%
6	78,57%	21,43%	92,86%	7,14%	7,14%
7	69,51%	30,49%	93,90%	6,10%	3,66%
TOTAL	60%	40%	87,5%	11,5%	10%

Tabela 2. Percentuais dos diferentes parâmetros físico-químicos do leite de cabra produzido por propriedades na região Metropolitana do Recife e Agreste do estado de Pernambuco de acordo com a CCS e CBT

Limites p/ CCS e UFC	Gordura %	Proteína %	Lactose %	Sólidos %
CCS >1x10 ⁶ céls/mL e CBT > 5x10 ⁵ UFC/ mL	3,74a	4,02a	3,31a	11,86a
CCS ≤ 1x10 ⁶ céls/mL e CBT ≤ 5x10 ⁵ UFC/ mL	3,19b	3,23b	4,15b	11,49b

Letras diferentes nas colunas representam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey (P<0,05). CCS= contagem de células somáticas, CBT= contagem bacteriana total, UFC= unidade formadora de colônia.

Tabela 3. Influência da higiene antes e depois da ordenha na contagem de células somáticas nas amostras coletadas

Propriedade	HAO*	HDO*	CCS x 1000
1	S	S	1488
2	N	N	2684
3	S	S	1779
4	N	N	1895
5	N	N	2812
6	S	S	905
7	S	S	1166
MÉDIA			1927

*HAO refere-se a higiene antes da ordenha e HDO a higiene depois da ordenha; S = Sim, a higiene na ordenha é realizada; N = Não, a higiene não é realizada

5.2. ARTIGO Nº2

SEQUENCIAMENTO DOS EXONS 1 e 2 DO GENE MBL (MANNOSE-BINDING LECTIN) EM CAPRINOS DO REBANHO PERNAMBUCANO

LIMA, M. C. G.^{1,2}; CARVALHO, V. C. V.^{2,3}; SILVA, G. M. M.²; VASCONCELOS, D.²; LIMA-FILHO J. L.²;
SOUZA, P. R. E.^{1,2}; MOTA, R. A.¹; PORTO, A. L. F.^{1,2}

1.Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

2.Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA

3.Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CpAM

Univesidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, R. Dom Manoel de Medeiros,
s/n, CEP 52171-900, Recife, PE, Brasil.

RESUMO

A MBL (lectina ligadora de manose) é uma proteína sérica e de grande importância na imunidade inata do indivíduo. Este estudo teve o objetivo detectar a presença de polimorfismos nos exons 1 e 2 do gene da MBL, em cabras leiteiras na região Metropolitana do Recife e Agreste do estado de Pernambuco. As amostras foram coletadas de animais de raça pura e mestiça, os quais não se encontravam em período colostrar, fase de secagem ou em tratamento. Foram coletadas amostras de sangue com auxílio de vacutainer contendo EDTA, das quais foram extraídos o DNA e posteriormente as amostras foram amplificadas com primers específicos para os exons 1 ou 2 do gene da MBL. O produto amplificado foi purificado e submetido a uma reação de sequenciamento para análises de possíveis polimorfismos, baseando-se na única sequência depositada para este gene, em caprinos, existente no GenBank. Os resultados

demonstraram a presença de um único polimorfismo na região 1662 do exon 2, em 8 das 70 amostras seqüenciadas. Desta forma, o presente trabalho promove uma contribuição inicial para estudos subseqüentes de associações destes polimorfismos com modificações com os níveis séricos da proteína MBL em caprinos.

PALAVRAS-CHAVE: MBL, cabra, lectina, polimorfismo.

ABSTRACT

MBL (mannose-binding lectin) is a seric protein, which is very important in innate immunity. This work has the objective to detect presence of polymorphisms on exons 1 and 2 of MBL gene in milk producing goats at Recife Metropolitan Region and Pernambuco State Agreste. Samples were collected from pure and mestizo strains animals. These goats were not at colostrum time, drying time or in treatment. By using vacutainer containing EDTA, blood samples were collected, from which DNA was extracted and later samples were amplified with specific primers for exons 1 and 2 of MBL gene. The amplified product was purified and submitted to a sequencing assay for analysis of polymorphisms, based on the only deposited sequence for this gene in goats displayed on the data base GenBank. Results showed presence of only one polymorphism on region 1662 of exon 2, in 8 of 70 sequenced samples. Thus, this work gives a starting contribution to subsequent studies on association of these polymorphisms with MBL protein seric levels modifications in goats.

Key words: MBL, goat, lectin, polymorphism.

1. INTRODUÇÃO

A MBL, lectina ligadora de manose, pertence a uma subfamília de proteínas conhecidas como colectinas, cujos membros apresentam domínios de reconhecimento de carboidratos associados a estruturas de colágeno (HOLMSKOV et al., 1994; EPSTEIN et al., 1996; TURNER, 2003). Sua forma circulante é constituída por oligômeros estruturados por subunidades que se formam pela associação de três cadeias polipeptídicas idênticas de 32kDa. Cada cadeia polipeptídica é composta por um domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC), uma região hidrofóbica chamada de pescoço, uma região colagenosa e uma região N-terminal rica em cisteína. As três cadeias interagem através de suas regiões colagenosas formando uma tripla hélice. A região hidrofóbica de cada cadeia adota uma forma espiralada e os domínios de reconhecimento de carboidratos apresentam características de proteínas globulares (TURNER, 2003).

A (MBL) é uma molécula efetora do sistema imune inato humano, que possui atividade antimicrobiana através da opsonização de patógenos, e ativação do sistema complemento por uma via alternativa (THIELENS et al., 2002).

Nos seres humanos, MBL desempenha um papel-chave na primeira linha de defesa contra a infecção durante o período que antecede o desenvolvimento de uma resposta imune específica. Sua importância é demonstrada por um número de estudos clínicos que associam a sua deficiência sérica com o aumento da susceptibilidade a uma variedade de doenças infecciosas humanas (EISEN et al., 2003), uma vez que baixos níveis séricos de MBL no soro têm sido reconhecidos como a principal causa de imunodeficiência associada com a atividade opsonizante prejudicada (SUMIYA et al., 1991).

Já Carvalho (2007), evidenciou que ao longo dos anos a influência da MBL na resposta inata do hospedeiro e sua participação nos diferentes processos inflamatórios e infecciosos, está respaldada na perspectiva que representa a terapia de reposição dessa proteína. E ainda, Alonso (2007), sugeriu que provavelmente exista um papel para a MBL durante toda a vida, agindo na primeira linha de defesa contra microorganismos antes do início da produção de anticorpos.

A MBL possui um papel complexo em diferentes afecções e influencia na gravidade de doenças infecciosas e auto-imunes, principalmente modulando a produção de citocinas pró-inflamatórias (TURNER, 2003).

A MBL foi identificada em várias espécies de animais, dentre elas, mamíferos, incluindo o homem, macacos, coelhos, bovinos, suínos e ratos. Proteínas homólogas também foram caracterizadas no soro de aves e peixes (KAWASAKI, et al, 1983; MOGUES et al, 1996; KOZUTSUMI et al, 1980; HOLMSKOV et al, 1993; STORGAARD et al, 1996; OKA et al., 1988; SASTRY et al., 1991; SUGI et al., 1994; LAURSEN et al., 1995).

Em estudos realizados por Alonso (2007), a presença de um tipo de polimorfismo do gene da MBL interferiu protegendo os indivíduos que apresentaram essa variação do gene da MBL *Leishmania chagasi*. Por outro lado, indivíduos que apresentaram certos genótipos da MBL pode interferir no risco de adoecer ou ter complicações com a doença

Ainda, sugerem que os alelos mutantes, causando baixas concentrações de MBL, estariam protegendo os indivíduos contra a infecção pelo *M. leprae* (GARRERD et al., 1994).

Acredita-se que muitos genes além do gene da MBL possam estar influenciando tanto na susceptibilidade como na expressão clínica da doença da hanseníase. E a deficiência de MBL parece ter caráter protetor contra o desenvolvimento da hanseníase e contra a evolução à forma clínica lepromatosa (DORNELLES, 2006).

A MBL ativa o sistema complemento através da via da lectina o que exige uma MBL-associada a serina protease-2 (MASP-2). Homólogos da MBL humana (hMBL) foram identificados em uma variedade de mamíferos, peixes e animais primitivos, como Ascidiacea.

A MBL eqüina (eMBL) possui propriedades que são similares à hMBL. Também foram verificados baixos níveis de atividade da MBL:MASP em cavalos doentes, comparado com cavalos saudáveis. Além disso, foram encontrados baixos níveis de MBL: atividade MASP em cavalos, em comparação com doentes e cavalos saudáveis. Estes estudos sugerem que a eMBL está envolvida na resposta imunológica dos cavalos e que baixa atividade da MBL:MASP poderia ser usada para monitorar a função imunológica e evolução clínica (PODOLSKY et al., 2006).

Em vertebrados, a MBL tem funções extensas, contudo a semelhança em peixes ósseos e cartilagosos pode ser a via da lectina, que é ligeiramente diferente de mamíferos e anfíbios com funções complexas. A presença dos dois tipos do Masp (MASP1 e 2) em mamíferos, anfíbios, e ascídias, independentemente da diferença estrutural nos domínios da protease, sugere que estas duas MASPs têm funções distintas e que a presença de duas diferentes linhagens do MASP gene nos vertebrados, e sugere que um dos dois, uma única linhagem com um único éxon-codificado protease domínio, pode têm divergido de um ancestral comum antes do aparecimento de vertebrados (ENDO et al., 1998).

Em suínos a PMBL desempenha um papel crítico na defesa imune inata do recém-nascido à fase adulta, e o estabelecimento de um modelo experimental em leitões recém-nascidos para o estudo do sistema imune inato, um valioso passo para a elucidação das funções fisiológicas e moleculares do mecanismo da via da lectina. O sistema complemento é crucial para a defesa imune inata, nos suínos a ativação do complemento é mediada pela via da lectina PMBL-mediada desencadeado pela ligação com diferentes carboidratos ligantes, que pode ser expressa em

microorganismos infecciosos no recém-nascido e adultos, em comparação com soros humanos e de coelho MBPs é mais importante para a sobrevivência do suíno recém-nascido leitão, enquanto as vias clássica e alternativa do complemento ativação prestar um importante apoio à linha de defesa (MA et al., 2007).

Esse trabalho realizou o sequenciamento dos exons 1 e 2 do gene MBL (mannose-binding lectin) em caprinos do rebanho pernambucano. O estudo e a compreensão da imunidade inata, sua relação com a presença do polimorfismo do gene da proteína ligadora de manose poderá auxiliar na compreensão da fisiologia em trabalhos futuros e também para projetar eficientes abordagens ao diagnóstico, tratamento e controle de doenças.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. População de estudo

As amostras de sangue periférico de 70 animais provenientes da Região Metropolitana do Recife e Agreste do estado de Pernambuco, foram coletadas com tubos vacuuntainer contendo EDTA e transportadas em caixa isotérmicas sob refrigeração para o Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (LIKA). Em seguida, o DNA foi extraído utilizando o kit de extração de DNA (Wizard Genomic DNA Purification Kit - Promega), seguindo as orientações do fabricante.

2.2. Amplificação dos exons 1 e 2 do gene MBL

Para amplificação dos éxon 1 e 2 do gene MBL foi desenhado o par de primers senso (S1) e antisenso (AS2) (Tabela 1), a partir da sequência do gene caprino depositado no GenBank (AM933377.1). O DNA extraído foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR), em

volume final de 15 μ L. Foram utilizados aproximadamente 200ng de DNA, 1 x Tampão da Taq polimerase (Promega), 200 μ M de dNTP, 2,5 mM de MgCl₂ (Promega), 1 μ mol de cada primer específico e 0,05 U de Taq polimerase 5U/ μ l (Promega) As condições de termociclagem foram: 95°C por 5 min, seguido por 40 ciclos de 95°C por 1min, 58°C por 1min, 72°C por 1 min seguidos de uma extensão final de 72° C por 5 min.

2.3. Eletroforese em gel de agarose e purificação das amostras de DNA amplificadas para os exons 1 e 2 da MBL

Os produtos da amplificação foram submetidos a eletroforese (100 V/45 minutos) em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5 x (TAE 5x estoque – TrisBase 1,6 M, Acetato de Sódio 0,8 M e EDTA-Na₂ 40 mM/1000 mL água destilada), contendo 0,6 μ L de brometo de etídio (10mg/mL). Seguidamente, as amostras de DNA presentes no gel foram visualizadas sob luz ultra-violeta (302 nm) e fotografado.

2.4. Purificação dos produtos de PCR

Após a reação da eletroforese os produtos foram isolados do gel com lâmina de bisturi estéril e colocado em tubo eppendorf para serem purificados com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System Prodinol para o posterior sequenciamento, conforme as recomendações do fabricante, e armazenados a -20°C até o momento do uso.

2.5. Sequenciamento dos fragmentos amplificados

As amostras foram seqüenciadas no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. As seqüências de DNA foram determinadas em seqüenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems) utilizando-se 1 μ l de 10 X Buffer, 0,5 μ l de BigDye

(96 Well-Gene Amp PCR System 9700) (Applied Biosystems, Foster City, CA), 3,2 pmol dos oligonucleotídeos, e 2µl do produto da PCR purificado (870pb). As reações de seqüenciamento foram realizadas em termociclador Eppendorf Master Cycle, com os ciclos de temperatura programados para: 40 ciclos de 95°C por 10 seg, 55°C por 10 seg, 60°C por 4 min como recomendado pelo fabricante. Após a amplificação, as amostras foram mantidas a 4°C até a precipitação. Para cada amostra foram utilizadas 2 reações, sendo uma para o primer forward e outra para o antisenso.

2.6. Precipitação das amostras e sequenciamento

A cada reação de seqüenciamento foram adicionados 30µl de isopropanol P.A, incubando a T.A. por 20 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a velocidade de 3500 rpm por 45 min a T.A. O isopropanol foi removido invertendo a placa e, a seguir, adicionou-se 70 µl de etanol 70% e centrifugou-se a velocidade máxima por 10 min a 3700 rpm a T.A. Removeu-se todo o etanol com auxílio de micropipeta, pois qualquer etanol residual resultaria em manchas fluorescentes. As amostras foram secas em T.A. e o DNA foi eluído em 10 µl de tampão de amostra contendo Formamida Hi-Di (Applied Biosystems). No momento da aplicação em seqüenciador automático ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, USA) as amostras foram aquecidas a 95°C por 3 min e rapidamente transferidas para o gelo.

3. RESULTADOS

3.1. Amplificação dos exons 1 e 2

A figura 1 apresenta a amplificação de fragmentos de 16 amostras de DNA genômico de caprino amplificadas com os primers S1 e AS2, específicos para amplificação dos exons 1 e 2 do

gene da MBL, resultando num produto de 870pb. Na Figura 2 estão apresentados os fragmentos após amplificação do gel.

3.2. Sequenciamento das amostras

A figura 3 representa o perfil do seqüenciamento de uma das amostras analisadas, o que demonstrou uma boa qualidade do seqüenciamento.

Oitenta e oito vírgula cinquenta e sete por cento das amostras analisadas (88,57/70) mostraram 100 % de homologia com a seqüência depositada no banco de dados GenBank (AM933377.1), porém 11,4% das amostras apresentaram um polimorfismo na base 1662 do gene da MBL. Nesse estudo observamos a presença de polimorfismo na posição 1662 do exon 2 do gene da MBL (figura 4).

4. DISCUSSÃO

Os Polimorfismos de uma única base (SNPs) representam a maior fonte de variações inter-individuais genéticas (BRAY et al., 2001) e podem ser utilizadas para identificar as contribuições poligênicas em determinadas doenças funcionando como uma extraordinária ferramenta na análise de marcadores genéticos devido a sua abundância (SCHWARTZ et al., 1999; HOWELL et al., 1999).

Os SNPs podem ser encontrados mais frequentemente nas regiões não codificantes e em mudanças silenciosas que não alteram ou substituem os aminoácidos, devido ao código genético ser degenerado. Isto reflete a grande pressão seletiva das regiões codificantes (NOWOTNY et al., 2001). Em outras palavras, os SNPs podem ou não alterar a expressão gênica, a síntese protéica ou o enovelamento protéico, que afeta a sua atividade, dependendo da sua localização ao longo do genoma.

A presença de polimorfismos no gene MBL tem sido descrita em uma ampla variedade de organismos. Lipscombe et al., 1992 ao seqüenciar o gene da MBL humana, encontrou três mutações de uma única base no exon 1 mas especificamente nos códons 52, 54 e 57. Além disso, duas mutações sem sentido nos exons 3 e 4 resultaram em falha no processo de splicing do íntron 1 (GUO et al., 1998). Os alelos decorrentes dos SNPS nos códons 52, 54 e 57 são denominados de MBL-D, MBL-B e MBL-C, respectivamente, e estão associados com um decréscimo significativo nos níveis séricos de MBL, quando comparados com os homozigotos do alelo normal, denominado MBL-A (Kilpatrick, 2002). Alves et al. (2007) investigaram a freqüência das mutações na região promotora do gene, nas posições -550 e -221 em 75 amostras do vírus linfotrópico humano de células T (HTLV) em doentes infectados e 96 amostras de indivíduos soronegativos, a fim de avaliar a ocorrência de uma possível associação entre a polimorfismo e a infecção pelo HTLV.

Arraes et al. (2006) encontraram polimorfismo em crianças com os três MBL2 variantes (Arg52Cys, Gly54Asp, Gly57Glu), as quais foram agrupadas e chamadas de alelo 0.

Schafanski et al. (2008), observaram a presença de polimorfismos no éxon 1 e na região promotora do gene MBL2 que foram determinadas por PCR-SSP e os quais foram associados com o nível de produção de MBL em indivíduos com cardiopatia aguda e doentes com artrite com uma história de febre reumática.

Para comparar a seqüência de aminoácidos da MBL suína com outras MBL, as seqüências de aminoácidos foram alinhadas. As análises de seqüências mostraram que a lectina exibiu 61,4% de similaridade com a MBL humana (28), 69,9% com MBP-A e 52% com MBP-C (29), 66,9% com MBP-A de rato e 56,6% com MBP-C (3), 80% com MBP-A de *rhesus*, e 59% com MBP-C (30) e 54,6% de MBP de coelho. A MBL suína exibiu uma alta homologia com MBP-A do *rhesus* e alta homologia com o tipo MBPs (MA et al., 2007).

A MBL bovina é a mais homóloga a MBL humana que possui 65% de identidade na sequência de aminoácidos (DRICKAMER et al., 1986; SASTRY et al., 1991; TAYLOR et al., 1989). Camundongos e ratos possuem 58% identidade com a MBL bovina.

Agah et al. (2001) em estudo em suínos, encontrou um homólogo da MBL humana. Em seguida, Lilie et al. (2006), realizou um estudo de polimorfismo dos genes da MBL em suínos e encontrou 3 SNPs na região codificadora da MBL 1 em diversas raças de suínos, o mesmo não ocorrendo na MBL 2. Estes polimorfismos foram associados com a susceptibilidade à doenças.

Em caprinos, apenas uma sequência do gene MBL foi depositada no banco de dados. No presente estudo, 70 amostras de DNA de caprino foram amplificadas e sequenciadas, evidenciando um SNP na região do exon 2 do gene da MBL. Contudo, não foi objetivo da pesquisa verificar a funcionabilidade deste polimorfismo no nível de expressão da proteína. Estudos adicionais podem verificar qual o significado do polimorfismo genético detectado na quantidade ou qualidade da proteína formada.

Em primatas, foram detectadas mutações nos genes da MBL-A e MBL-C. Além das duas mutações nonsense sentido e de alteração no sítio de corte de splicing, ocorreu uma substituição de Glicina por Arginina no códon 53 que alinha com o códon 54 da MBL-C humana. Esta mutação também está presente em gorilas e chimpanzés, mas não em primatas mais distantes. Substituições de glicina também foram encontradas nos códons 50, 62 e 94 de chimpanzés, gorilas e orangotangos (SEYFATH et al., 2005). Moguees et al. (1996) em estudo onde realizou sequenciamento em rhesus, encontrou um alto nível de homologia entre a MBL-C do rhesus e MBL humana, com 90% de identidade na sequência de aminoácidos.

Kawai et al. (1998) em estudo realizado analisando-se a MBL proveniente do soro e do fígado de coelho, concluiu que não há diferença genética entre as respectivas proteínas nessa espécie, assemelhando-se ao gene da MBL humana.

Garrate et al. (2004), em estudo comparado das MBL em diversas *Acanthamoebas*, encontrou homologia em várias regiões que variam de 29 a 44% nas regiões: 274-606, 275-590, 270-593, 102-251, 272-689, 190-680, 260-690, 270-550 e 280-580.

5. CONCLUSÃO

Nesse trabalho foi encontrado polimorfismo em 11,4% das amostras analisadas no exon-2 do gene da MBL, em amostras de DNA de caprino. Porém faz-se necessário mais estudos a fim de melhor esclarecer o papel deste polimorfismo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGAH, A.; MONTALTO, M. C.; YOUNG, Y.; STAHL, G.L. Isolation, cloning and functional characterization of porcine mannose-binding lectin. **Immunology**. v.102, p.338-343, 2001.
- ALVES, A.E.M.; HERMES, R.B.; TAMEGÃO-LOPES, B.; MACHADO, L.F.A.; AZEVEDO, V.N.; ISHAK, M.O.G.; ISHAK, R.; LEMOS, J.A.R.; VALLINOTO, A.C.R. Polymorphism in the promoter region of the mannose-binding lectin gene among human T-cell lymphotropic virus infected subjects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Vol. 102, No. 8, p. 991-994, December, 2007.
- ALONSO, D. P. Mutações no gene que codifica a lectina ligante da manose e suas relações com a infecção por *Leishmania chagasi*. **Dissertação de Mestrado** – Botucatu – SP, 2007.
- ARRAES, L. C; DE SOUZA, P. R.; BRUNESKA, D.; CASTELO FILHO, A.; DE SOUZA CAVADA, B.; DE LIMA FILHO, J. L.; CROVELLA, S. A relação custo-eficácia

- temperatura ensaio para a detecção de um único nucleotídeo polimorfismo no gene da MBL2 Infectadas pelo HIV-1 criança **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v.39, p.719-723, 2006.
- BONIOTTO, M. et al. Variant mannose-binding lectin alleles are associates with celiac disease. **Immunogenetics**, New York, v. 54, n. 8, p.596-598, 2002.
- BONIOTTO, M. et al. Evidence of a correlation between mannose binding lectin and celiac disease: a model for other autoimmune diseases. **Journal of Molecular Medicine**, Berlin, p. 1432-1440 (online), 2005.
- BRAY, M.S.; BOERWINKE, E.; DORIS, A.P. High-throughput multiplex SNP genotyping with MALDI-TOF mass spectrometry: practice, problems and promise. **Human Mutation** 17, p.296-304, 2001.
- CARVALHO, E.G. Investigação da Lectina Ligante de Manose (Mbl) em Pacientes com Doença Celíaca. **Dissertação de Mestrado**, Curitiba – PA, 2007.
- DORNELLES, L. N. Concentração sérica da lectina ligante de manose (mbl) em pacientes portadores de hanseníase. **Dissertação de Mestrado**, Curitiba – PA.
- DRICKAMER, K.; DORDAL, M. S.; REYNOLDS, L. Mannose-binding proteins isolated from rat liver contain carbohydrate-recognition domains linked to collagenous tail. **J Biol. Chem.** v.261, p.6878, 1986.
- EISEN, D.P., MINCHINTON R.M., Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases. **Clinical Infectious Diseases**, v.37, n.11, p.1496-505, 2003.
- ENDO, Y.; TAKAHASHI, M.; NAKAO, M.; SAIGA, H.; SEKINE, H.; MATSUSHITA, M.; NONAKA, M.; FUJITA, T. Two Lineages of Mannose-Binding Lectin-Associated Serine Protease (MASP) in Vertebrates^{1, 2}. **The Journal of Immunology**, v.161, p.4924–4930, 1998.

- EPSTEIN J, EICHBAUM Q, SHERIFF S, AND EZEKOWITZ RA. The collectins in innate immunity. *Curr Opin Immunol*, v.8, p.29-35, 1996.
- FONSECA, L. F.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, p.175, 2000.
- GARRED, P. et al. Dual role of mannan-binding protein in infections: another case of heterosis. **European Journal of Immunogenetics**, Oxford, v. 21, p. 125-131, 1994.
- GARATE, M.; CAO, Z.; ERIK BATEMAN, E.; PANJWANI, N. Cloning and Characterization of a Novel Mannose-binding Protein of *Acanthamoeba*. **The journal of biological chemistry**. v.279, No. 28, Issue of July 9, p.29849–29856, 2004.
- GUO N, MOGUES T, WEREMOWICZ S, MORTON CC, SAS TRY KN. The human ortholog of rhesus mannan-binding protein-A gene is an expressed pseudogene that localizes to chromosome 10. **Mamm Genome** v.9, p.246–249, 1998.
- HOLMSKOV U., HOLT P., REID K.B.M., WILLIS A.C., TEISNER B. & JENSENIUS J.C. Purification and characterization of bovine mannan-binding protein. **Glycobiology** v.3, p.147, 1994.
- HOWELL W., JOBS M., GYLLENSTEN U., BROOKES A. Dynamic allele-specific hybridization. A new method for scoring single nucleotide polymorphisms. **Nat Biotechnol**. v.17, n.1, p.87-8, 1999.
- ILTANEN, S. et al. The association between mannan-binding lectin gene alleles and celiac disease. **The American Journal of Gastroenterology**, New York, v. 98, p. 2808-2809, 2003.
- KAWAI, T.; SUZUKI, Y.; EDA, S.; OHTANI, K.; KASE, T.; SAKAMOTO, T.; HIDETOSHI UEMURA, H.; WAKAMIYA, N. Molecular and biological characterization of rabbit mannan-binding protein (MBP). **Glycobiology** v.8, n.3, p.237–244, 1998.

- KAWASAKI N., KAWASAKI T. & YAMASHINA I. Isolation and characterization of a mannan-binding protein from human serum. **J Biochem Tokyo** v.94, p.937, 1983.
- KILPATRICK, D.C. Mannan-binding lectin and its role in innate immunity. **Transfusion Medicine**, v.12, n.6, p.335-52, 2002.
- LAURSEN S.B., HEDEMAND J.E., THIEL S. et al. Collectin in a non-mammalian species: Isolation and characterization of mannan-binding protein (MBP) from chicken serum. **Glycobiology** v.5, p.553, 1995.
- Lillie, B. N.; Keirstead, N. D.; Squires, E. J.; M. Anthony Hayes, M. A. Single-nucleotide polymorphisms in porcine mannan-binding lectin A. **Immunogenetics** v.58, p.983–993, 2006.
- LIPSCOMBE RJ, SUMIYA M, HILL AV, LAU YL, LEVINSKY RJ, Summerfield JA, Turner MW High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. **Hum Mol Genet** v.1, p.709–715, 1992
- KOZUTSUMI Y., KAWASAKI T. & YAMASHINA I. Isolation and characterization of a mannan-binding protein from rabbit serum. **Biochem Biophys Res Commun** v.95, p.658, 1980.
- MA, B. Y.; Nakamura, N.; Dlabac, V.; Naito, H.; Yamaguch, S.; Ishikawa, M.; Nonaka, M.; Ishiguro, M.; Kawasaki, N.; Oka, S. and Kawasaki, T. **Isolation, Cloning, and Characterization of a Novel Phosphomannan-binding Lectin from Porcine Serum. The journal of biological chemistry** vol. v.282, n 17, p. 12963–12975, April 27, 2007.
- MOGUES T., OTA T., TAUBER ALI. & SASTRY K.N. Characterization of two mannose-binding protein cDNAs from rhesus monkey structure and evolutionary implicat o. **Glycobiology** v.6, n.5, p.543, 1996.

- MOTA, R.A.; DE CASTRO, F.J.C.; DA SILVA, L.B.G.; OLIVEIRA, A.A.F. Etiologia e sensibilidade a antimicrobianos in vitro das bactérias isoladas do leite de cabras com mastite procedentes da Região Metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v.19, n.114, p.26 – 29, 2000.
- MURICY, R. F.; SELLA, A.; SILVA, L.E.; SCHMIDT, V.; CARDOSO, M. I. Pontos de contaminação de leite produzido em uma propriedade de caprinos no município de Viamão-RS. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia.**, v.9, n.1, p.42-47, 2002.
- NOWOTNY, S., SCHAREK, S., ZIERIS, R., NAUMANN, T., BEYER, E. Hybridtechnologie und Präzisionstechnik zum Laserstrahl-Auftragsschweißen. **LaserOpto**, v.33, n.01, p.57-60, 2001.
- OKA S., IKEDA K., KAWASAKI T. & YAMASHINA I. (1988) Isolation and characterization of two distinct mannan-binding proteins from rat serum. *Arch Biochem Biophys* 260, 257, 1988.
- PODOLSKY, M. J.; LASKER, A.; FLAMINIO, M. Julia BF; Gowda Lakshmi D.; EZEKOWITZ R. Alan B.; TAKAHASHI Kazue. Characterization of an equine mannose-binding lectin and its roles in disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 343(3):928-36, 2006.
- RAPOPORT, E. Mastitis caused by mycoplasmas in goats and in dairy sheep. **Goat Vet. Soc. J.**, v.93, p.67-70, 1993.
- SASTRY K., ZAHEDI K., LELIAS J.M., WHITEHEAD A.S. & EZEKOWITZ R.A. Molecular characterization of the mouse mannose-binding proteins. The mannose-binding protein A but not C is an acute phase reactant. **J Immunol.** 147, 692, 1991.
- SCHAFRANSKIA, M. D.; FERRARI A. L. P.; SCHERNERA, D.; TORRES, B. R.; JENSENIUS, J. C.; MESSIAS-REASON, I. J. de High-producing *MBL2* genotypes increase

- the risk of acute and chronic carditis in patients with history of rheumatic fever **Molecular Immunology**. v. 45, p.3827–3831, 2008.
- SCHWARTZ, S. A.; M. P. NAIR. Current concepts in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *Clin Diagn Lab Immunol*, v.2, n.3, p.295-305. 1999.
- SEYFARTH J, GARRED P, MADSEN HO. The ‘involution’ of mannosebinding lectin. *Hum Mol Genet* v.14, p.2859–2869, 2005.
- SUGI S. & HIRORA Y. Identification and carbohydrate specificity of a chicken serum mannan-binding protein reactive with Ra chemotype strain of *Salmonella typhimurium*. **J Vet Med Sci** v.56, p.747, 1994.
- SUMIYA, M., SUPER, M., TABONA, P., LEVINSKY, R. J., ARAI, T., TURNER, M. W., SUMMERFIELD, J. A. Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children. **Lancet**, v.337, n.8757, p.1569-70, 1991.
- STORGAARD P., NIELSEN E.H., ANDERSEN O. Isolation and characterization of porcine mannan-binding proteins of different size and ultrastructure. **Scand J Immunol** v.43, p.289, 1996.
- TAYLOR , W. F.; JOHNSON, J.M.; KOSIBA, W. A.; KWAN, C. M. Cutaneous vascular responses to isometric handgrip exercise. **J Appl Physiol** v.66, p.1586–1592, 1989.
- THIELENS, N.M., TACNET-DELORME, P., ARLAUD, G.J. Interaction of C1q and mannan-binding lectin with viruses. **Immunobiology**, v.205,;p.563–574, 2002.
- TURNER, M. W. The role of mannose-binding lectin in health and disease. **Molecular Immunology**, London, v. 40, n.7, p.423-429, 2003.

Tabela 1. Seqüências dos Primers do senso 1 e antisenso 2 do gene MBL utilizados no estudo.

SEQÜÊNCIA DE PRIMERS USADOS	
S1 (forwad)	5'-TAGATAAAGA GAACAAGATG-3'
AS2 (reverse)	5'-GGAAGCAGAGTTGGGCATCT-3'

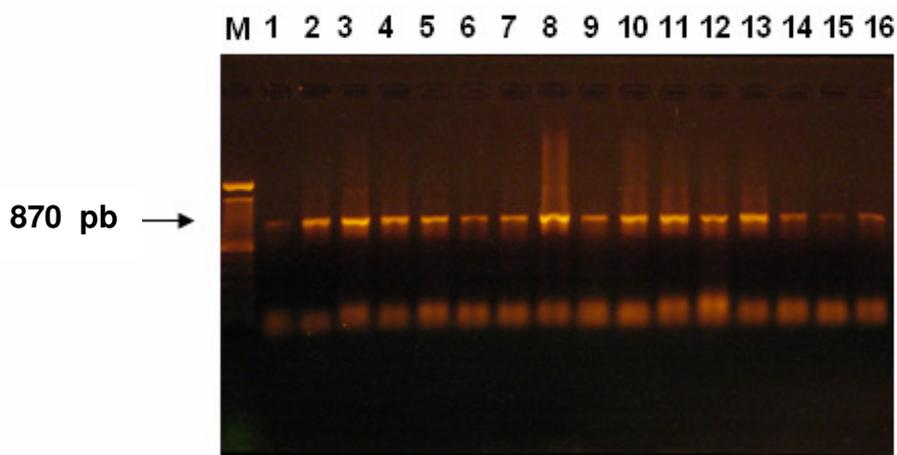


Figura 1. Eletforese em gel de agarose à 1% das amostras amplificadas com os primers S1 e AS2. Coluna M-Padrão de peso molecular (100 pb) colunas de 1 a 16- Produtos da amplificação de 870pb correspondentes ao exons 1 e 2 do gene MBL em caprinos.

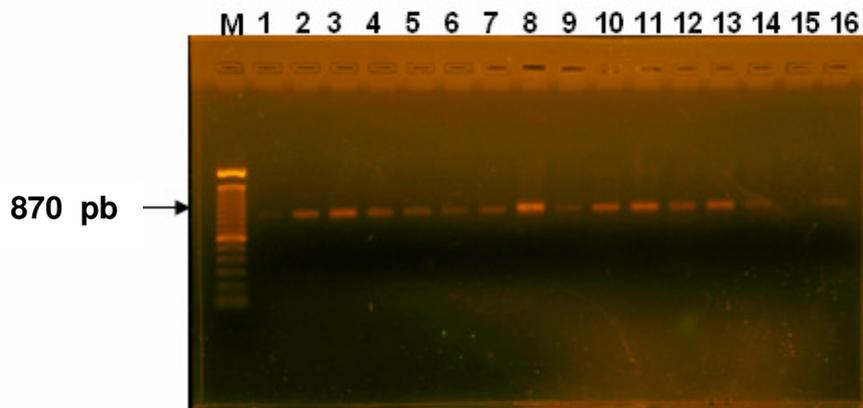


Figura 2. Produtos da PCR purificados após amplificação com kit de purificação (Promega). Eletroforese em gel de agarose à 1%. Coluna M-Padrão de peso molecular (100 pb); colunas de 1 a 16 corresponde ao produto amplificado, 870pb do exon 1 e 2.

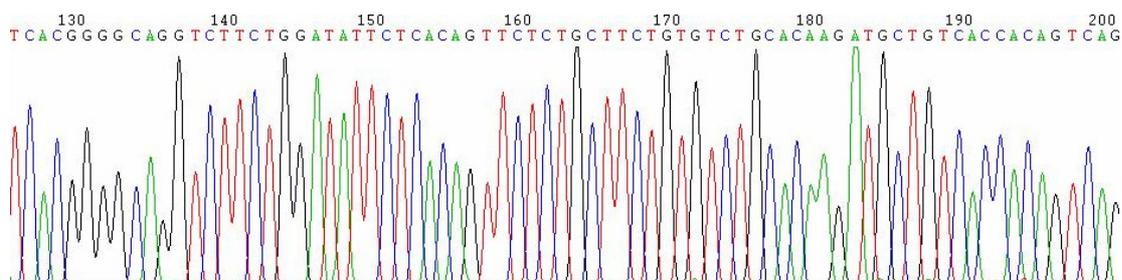


Figura. 3 Imagem representativas do seqüenciamento de uma amostra para os exons 1 e 2 do gene da MBL (picos coloridos referentes às bases).

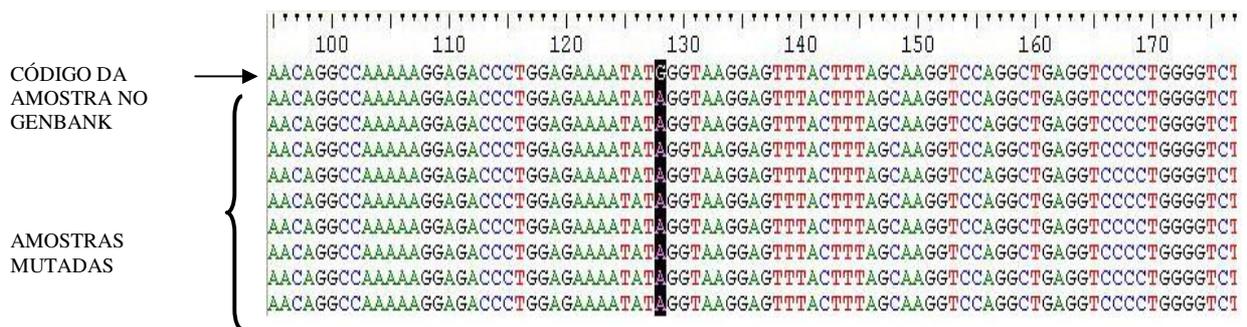


Figura. 4 Comparação da seqüência conhecida com a das amostras pesquisadas da região do exon 2 do gene da MBL de caprinos, evidenciando o polimorfismo encontrado.

6. ANEXO – NORMAS EDITORIAIS DA REVISTA ARQUIVOS DO INSTITUTO BIOLÓGICO

A Revista Arquivos do Instituto Biológico aceita, para submissão, artigos originais de pesquisa científica em sanidade animal e vegetal voltados ao agronegócio e suas implicações no agroambiente, incluindo nesse escopo a qualidade e a segurança alimentar. Aceita, também, artigos sobre pragas sinantrópicas. Todos os trabalhos devem se enquadrar nas normas redatoriais.

Os trabalhos enviados para publicação deverão ser inéditos e destinados exclusivamente a esta Revista. A matéria publicada será de inteira responsabilidade do(s) autor(es). Os trabalhos não aceitos para publicação serão comunicados aos autores pelo Comitê Editorial.

O Comitê Editorial fará análise dos trabalhos antes de submetê-los aos Consultores Científicos.

A publicação dos trabalhos dependerá da análise efetuada pelo Corpo de Consultores Científicos e da aprovação do Comitê Editorial.

Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

Serão considerados para publicação Artigos Científicos e Comunicações Científicas. Artigos de Revisão poderão ser aceitos a critério do Comitê Editorial.

A transcrição parcial ou total de trabalhos dos "Arquivos do Instituto Biológico" para outras revistas é permitida desde que citada a origem.

O original deve ser submetido apenas na forma eletrônica através do e-mail arquivos@biologico.sp.gov.br. O arquivo não deverá exceder 2Mb. No e-mail de encaminhamento deverá constar nome por extenso, endereço completo (Instituição/Universidade, Centro/Faculdade, Laboratório/Departamento, endereço postal), endereço eletrônico e CPF de todos os autores.

Eventuais dúvidas podem ser encaminhadas ao editor da Revista "Arquivos do Instituto Biológico", Dra. Silvia Regina Galleti, Instituto Biológico - Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002, São Paulo, SP - Fone: (11) 5087-1749 - E-mail: arquivos@biologico.sp.gov.br.

A versão imprensa da revista será publicada exclusivamente em preto e branco. Não serão fornecidas separatas. Os artigos estarão disponíveis para consulta e download gratuitos no site da revista www.biologico.sp.gov.br/arquivos.

Forma de apresentação: os trabalhos deverão ser digitados em Word 97 ou versão superior, página A4, com margens de 2,5 cm, fonte Times New Roman, tamanho 12, espaço duplo e páginas numeradas em seqüência. As linhas deverão ser numeradas de forma contínua, utilizando a ferramenta Layout em Configurar Página. O máximo de páginas será 25 para artigos de revisão, 20 para artigos científicos e 10 para comunicação científica, incluindo tabelas e figuras.

Artigo científico: compreenderá os seguintes itens: título, nome do(s) autor(es), endereço do primeiro autor e local de origem dos demais autores, resumo em português, palavras-chave, título em inglês, abstract, key words, introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusões, agradecimentos e referências.

Quando o trabalho envolver estudos em animais de experimentação e/ou organismos geneticamente modificados, incluir o número do processo no trabalho e encaminhar uma cópia da aprovação fornecida pelo respectivo Comitê responsável da Instituição de origem do primeiro autor.

Idioma: o trabalho poderá ser redigido em português, espanhol ou inglês. Quando escrito em português, o resumo deverá ter uma versão em inglês. No caso de artigo escrito em inglês ou espanhol deverá ter um resumo em inglês ou espanhol e outro em português.

Título: embora breve, deverá indicar com precisão o assunto tratado no artigo, focalizando bem a sua finalidade principal.

Endereço(s) do(s) autor(es): abaixo do(s) nome(s) do(s) autor(es), com chamada numérica. Descrever endereço postal (Instituição/Universidade, Centro/Faculdade, Laboratório/Departamento, estado, país) e eletrônico do autor principal. No rodapé da primeira lauda descrever somente a Instituição e Departamento dos demais autores.

Resumo: deverá apresentar concisamente o objetivo do trabalho, material e métodos e conclusões, em um único parágrafo. Não ultrapassar 250 palavras.

Palavras-chave: abaixo do resumo e separado por um espaço, citar no máximo cinco palavras-chave, separadas por vírgula. Evitar termos que apareçam no título.

Abstract: apresentar uma tradução para o inglês, do título do trabalho e do resumo. A seguir, relacionar também em inglês (ou espanhol) as mesmas palavras-chave (key words, palabras-clave) já citadas. Não ultrapassar 250 palavras.

Introdução: descrever a natureza e o objetivo do trabalho, sua relação com outras pesquisas no contexto do conhecimento existente e a justificativa da pesquisa feita.

Material e Métodos: apresentar descrição breve, porém suficiente para permitir uma repetição do trabalho. Técnicas e processos já publicados, exceto quando modificados, deverão ser apenas citados. Nomes científicos de espécies, bem como drogas, deverão ser citados de acordo com regras e padrões internacionais.

Resultados: apresentá-los acompanhado de tabelas e/ou figuras, quando necessário. As tabelas e figuras devem ser inseridas após as referências.

Discussão: discutir os resultados obtidos comparando-os com os de outros trabalhos publicados (resultados e discussão poderão fazer parte de um único item).

Tabelas e Figuras: incluir título claro e conciso que possibilite o seu entendimento sem consultas ao texto. As tabelas não deverão conter linhas verticais. No texto, use a palavra abreviada (ex.: Fig. 3). As figuras devem estar no formato jpg (fotos) ou gif (gráficos e esquemas) e com tamanho inferior a 500 Kb. As figuras originais ou com maior resolução

poderão ser solicitadas após o aceite. Devem ser enviadas em arquivos individuais e nomeadas de acordo com o número da figura. Exemplos: Fig1.gif, Fig2.jpg.

Conclusões: serão citadas em ordem de importância. Poderão constituir um item à parte ou serem incluídas na discussão.

Agradecimentos: poderão ser incluídos a pessoas ou instituições.

Referências e citações no texto: citações no texto e referências estão diretamente vinculadas. Todos os autores citados devem figurar nas referências, exceção para informações obtidas por canais informais que deverão ser citadas apenas no texto: (JUNQUEIRA, comunicação pessoal), (JUNQUEIRA, informação verbal). A referência no texto deve seguir o sistema sobrenome do autor e ano de publicação e deverá estar em caixa alta reduzida ou versalete, tal como: 1 autor - ALLAN (1979) ou (ALLAN, 1979); 2 autores – LOPES; MACEDO (1982) ou (LOPES; MACEDO, 1982); mais de 2 autores - BESSE et al. (1990) ou (BESSE et al., 1990); coincidências de autoria e ano de publicação - (CURI, 1998a), (CURI, 1998b) ou (CURI, 1998a, 1998b). Nas referências seguir as recomendações da Norma NBR 6023/2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT); as referências deverão estar em ordem alfabética de primeiro autor e serem apresentadas em folha à parte. A exatidão dos dados nas referências é da responsabilidade dos autores.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)