

ANA PAULA RODRIGUES GAIATO

**Pico de lactação, persistência e apoptose
mamária em cabras da raça Saanen: alterações
causadas pelo estresse**

Dissertação apresentada a Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. João Alberto Negrão

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às minhas duas famílias:

A primeira, constituída pelos meus pais, Paulo e Débora e meu irmão, Marcelo, a quem devo amor incondicional e gratidão por ser quem sou hoje em dia.

A segunda, formada pelas irmãs que não tive, mas tive a sorte de conhecer quando entrei na graduação e que me acompanham até hoje, Daniele, Letícia e Michelle.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, prof. Dr. João Alberto Negrão, que me ajudou a conduzir o experimento.

Ao prof. Dr. César Gonçalves de Lima, que além de ser meu professor PAE ajudou-me a desvendar os resultados estatísticos do experimento.

À Ms. Sandra Aparecida de Oliveira, técnica do Laboratório de Fisiologia Animal, que passou muitos dias centrifugando amostras de leite comigo e me direcionando nas metodologias do experimento.

À prof^a Mariza Pires de Melo por me ter concedido a utilização do Laboratório de Química Biológica, para a centrifugação e aprimoramento das técnicas de isolamento celular no leite.

À Silvana Piccoli Pugine, técnica do Laboratório de Química Biológica, por ter me passado conhecimento e técnicas para isolamento celular no leite.

Ao prof. Dr. Antonio Augusto Mendes Maia por ter me concedido a utilização do Laboratório de Parasitologia.

À técnica Márcia Ramos Monteiro da Silva por ter me concedido a centrífuga do Laboratório de Parasitologia.

Ao Antônio (China) pela grande ajuda, conhecimento e conversa durante as infundáveis manhãs manejando os animais.

À Dr. Fernanda Alves de Paiva, pela ajuda durante o experimento, além da amizade e das boas risadas em cansativos dias de coleta e experimentação.

Ao Ms. Thiago Ferreira Gonçalves Delgado, braço direito durante o experimento, grande amigo desde a graduação e parceiro nos momentos mais cansativos e sacrais do experimento, ajudando e alegrando o momento.

Á Ms. Taíssa de Souza Canaes, pela grande ajuda no cansativo processo de centrifugação do leite e pela paciência para ensinar a contar as Células Somáticas.

À estagiária Innaê Borges da Silva e Oliveira, muito importante para o experimento, sempre presente e me ajudando em todos os processos, desde arrumação antes dos dias de coleta, nos dias de coleta e no laboratório.

Aos estagiários André Soligo Vizeu de Palma e Fernanda Lunardi, pela grande ajuda durante o experimento, ordenhando, manejando e tratando dos animais.

Aos companheiros do laboratório, Diogo César Gomes da Silva, Alice Deléo Rodrigues, Monalissa de Melo Stradiotto e Rodrigo Emediato, que apesar de terem chegado ao final do período experimental, ajudaram bastante durante os dias de coleta e laboratório.

Ao Mário, estagiário de São Paulo, que, em dias de coleta nos fazia rir e a noite nos fazia macarronadas deliciosas, além de nos “apresentar” a ópera.

Às amigas da república Curinga, que me acolheram após a graduação e me “aguentaram” durante a pós-graduação, Eliza, Innaê, Viviane, Viviann, Naira, Letícia, Natasha, Mariana e Kathleen, vivemos momentos memoráveis e muito engraçados juntas.

À amiga sumida, Melissa, com quem passei momentos agradáveis, além das aulas em São Carlos.

Ao meu namorado, Ivo, que tem paciência e muito amor por mim. Sempre presente e “segurando as pontas”.

A FAPESP, pela concessão de Bolsa e Auxílio Pesquisa, processo nº 06-59296/2, para implementação da dissertação.

A todas as pessoas que indiretamente colaboraram para a execução desta dissertação meu MUITO OBRIGADO!

Sabemos que não fazemos um experimento sozinhos!!

EPÍGRAFE

Aprender sem pensar é tempo perdido.
Confúcio

RESUMO

GAIATO, A.P.R. **Pico de lactação, persistência e apoptose mamária em cabras da raça Saanen: alterações causadas pelo estresse.** 2009. 72 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

A seleção de animais mais produtivos e a melhoria da qualidade do leite são os principais objetivos dos caprinocultores. Desta forma, o presente estudo, sob a hipótese de que o estresse pode intensificar o processo de apoptose durante a lactação, propõe estudar o efeito do estresse (via administração de ACTH) em animais estressados pontualmente (durante toda a lactação) e submetidos a estresse prolongado (durante três dias seguidos), sobre os níveis de cortisol, quantidade e qualidade do leite produzido e taxa de apoptose das células mamárias. Durante o experimento foram utilizadas 12 cabras primíparas da raça Saanen, subdivididas em 2 grupos e submetidas a aplicação de ACTH/Placebo bimensalmente. Ao longo de todo experimento foram realizadas coletas de sangue pontuais e durante os desafios, além de coletas de leite para mensurar os componentes e a Contagem de Células Somáticas (CCS). Não houve diferenças entre os grupos na produção leiteira e dos componentes do leite (proteína, gordura, lactose e CCS). Nos dias de desafio, animais que receberam ACTH obtiveram picos de produção de cortisol, diferentemente das fêmeas que receberam Placebo. Portanto conclui-se que mesmo produzindo cortisol, as fêmeas não obtiveram queda na qualidade tampouco na quantidade de leite produzido, o estresse de curta duração não traz prejuízos produtivos ao animal.

Palavras-chave: ACTH, Cortisol, proteína, gordura, lactose

ABSTRACT

GAIATO, A.P.R. **Lactation peak, persistency and mammary apoptosis in Saanen goats: alterations caused by stress.** 2009. 72 f. M. Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

The selection of productive animals and milk quality improvement are the main goals of goat breeders. According to the hypothesis that stress can intensify the apoptosis process during lactation, the purpose of this research is to study stress effect through ACTH administration in animals stressed during lactation and submitted to a three day stress period. Twelve first-rate pregnancy Saanen goats were subdivided in two groups and submitted to ACTH and Placebo treatment once every two months. During the experiment, blood and milk samples were collected to measure Somatic Cell Count (SCC), protein, fat and lactose. Cortisol levels, quantity and quality of produced milk and mammary cells apoptosis rate were analyzed. As a result, there were no differences in milk production, protein, fat, lactose and SCC levels between both groups. On the other hand, animals who received ACTH obtained cortisol peaks, differently than those who received Placebo. Despite cortisol production, the quality and quantity of produced milk did not changed. Concluding, a short stress period does not impact on the goat milk production.

Keywords: ACTH, Cortisol, protein, fat, lactose

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Animais experimentais	26
Figura 2 - Instalações	26
Figura 3 – Sala de ordenha experimental.....	27
Figura 4 – Piquete de manejo.....	27
Figura 5 – Lâminas para CCS	29
Figura 6 – Pelete formado a partir da centrifugação.....	30
Figura 7 – Esfregaços corados (Rosenfeld)	32
Figura 8 – Esfregaços de citocentrifugação corados (Rosenfeld)	32
Figura 9 – Esfregaços de Ficoll corados (Panótico)	33
Figura 10 – Esfregaço de citocentrifugação corado (Papanicolaou)	33

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1 – Teores de proteína no leite de ambos os grupos durante a lactação. ...	35
Gráfico 2 – Teores de proteína no leite de ambos os grupos na última semana de lactação.....	37
Gráfico 3 – Teores de gordura no leite de ambos os grupos durante a lactação.	39
Gráfico 4 – Teores de gordura no leite de ambos os grupos na última semana de lactação.....	40
Gráfico 5 – Teores de lactose no leite de ambos os grupos durante a lactação.	43
Gráfico 6 – Teores de lactose no leite de ambos os grupos na última semana de lactação.....	44
Gráfico 7 – Contagem de Células Somáticas no leite de ambos os grupos durante a lactação.....	46
Gráfico 8 – Contagem de Células Somáticas no leite de ambos os grupos na última semana de lactação.	48
Gráfico 9 – Produção leiteira de ambos os grupos na durante a lactação.	50
Gráfico 10 – Produção leiteira de ambos os grupos na última semana de lactação.	50
Gráfico 11 – Níveis plasmáticos médios de cortisol durante o período experimental em dias de aplicação de ACTH/Placebo.	51
Gráfico 12 – Níveis plasmáticos médios de cortisol durante o período experimental em dias consecutivos de aplicação de ACTH/Placebo.	53
Gráfico 13 – Níveis basais de cortisol de ambos os grupos.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Médias das concentrações protéicas do leite de cabras Saanen durante a lactação.....	36
Tabela 2 - Médias das concentrações de gordura do leite de cabras Saanen na última semana de lactação.....	41
Tabela 3 - Médias das concentrações de lactose do leite de cabras Saanen durante a lactação.....	43
Tabela 4 - Médias das concentrações de lactose do leite de cabras Saanen na última semana de lactação.....	44
Tabela 5 - Médias das concentrações de Log de CCS do leite de cabras Saanen durante a lactação.....	47
Tabela 6 - Médias das concentrações de Log de CCS do leite de cabras Saanen na última semana de lactação.....	48
Tabela 7 - Médias das concentrações de Cortisol plasmático de cabras Saanen submetidas a aplicação de ACTH/Placebo.	52

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	7
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
Síntese Láctea.....	10
<i>Qualidade do Leite</i>	10
Proteína	11
Gordura	13
Lactose.....	14
População Celular	14
Contagem de Células Somáticas (CCS)	16
Mastite e Resposta Imune	18
Pico e Persistência na Lactação.....	19
Apoptose mamária.....	21
Estresse.....	22
MATERIAIS E MÉTODOS	25
Animais, alimentação e manejo	25
Tratamentos e dosagens hormonais	27
Coleta de dados.....	28
<i>Sangue e obtenção de plasma</i>	28
<i>Leite</i>	29
<i>Dosagem hormonal</i>	33
RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
Componentes do leite	35
<i>Proteína</i>	35
<i>Gordura</i>	39
<i>Lactose</i>	42
<i>Contagem de Células Somáticas (CCS)</i>	46
Produção leiteira	49
Níveis plasmáticos de Cortisol.....	51
CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

INTRODUÇÃO

Os caprinos foram os primeiros animais domesticados pelo homem e há cerca de 10 mil anos são capazes de produzir alimentos para os seres humanos (RIBEIRO, S., 1997).

Por ser um animal bastante rústico e adaptável, os caprinos habitam praticamente todas as regiões do globo fornecendo carne, leite, pele e pêlos tanto em locais tropicais quanto temperados, áridos e úmidos, frios e quentes e em ambientes montanhosos (RIBEIRO, A., 1997; PRINA, 2007).

O Brasil possui um rebanho caprino de pouco mais de 11 milhões de cabeças. Cerca de 90% desse rebanho está localizado na Região Nordeste e apenas 2,5% na região Sudeste, que é a maior produtora de leite caprino, representando 55% do total produzido no país (ANUALPEC, 2007).

Na produção de leite e derivados, os caprinos são responsáveis por 1% da produção de leite no mundo (WANDER; MARTINS, 2008). A média de produção cabra/ano no Brasil ainda é de 30kg, já a média mundial é de 80kg/cabra/ano.

Tendo em vista o cenário nacional do mercado de leite caprino, é fundamental que os produtores primem pela qualidade, controlando o volume produzido e a composição do leite, aperfeiçoando a higiene durante a ordenha e a saúde do rebanho (WANDER; MARTINS, 2008).

Ao mesmo tempo em que o controle da qualidade é importante, a produtividade dos animais também deve ser observada pelos produtores, já que para o aumento das margens de lucro é necessária a redução dos custos de produção. Por isso o aumento da produtividade dos animais, com a diminuição do capital investido por quilo de leite produzido torna-se o diferencial entre os caprinocultores leiteiros (WANDER; MARTINS, 2008). Assim, estudos relacionados

ao estresse na produtividade dos animais tornam-se uma ferramenta para que os produtores possam elevar a quantidade e qualidade do leite que produzem, considerando o bem-estar animal.

Existem situações em que o manejo normal dos animais (desmame, vacinação, desvermifugação, pesagem e mudança de instalações) pode estar associado ao estresse e aumento exponencial na concentração plasmática de ACTH e CORT (FULKERSON; JAMIESON, 1982; MARNET; NEGRÃO, 2000; RUSHEN *et al.*, 2001). Ao mesmo tempo, outros fatores estressantes relacionados à lactação (parto, desmame, restrição alimentar e sub-nutrição) foram associados ao aumento da taxa metabólica dos animais (ELVINGER *et al.*, 1992; RENANVILLE *et al.*, 2000).

Alguns autores sugerem que a somatória de eventos estressantes pontuais (parto, desmame, déficit energético) pode a longo termo, promover a manutenção de níveis elevados de CORT causando alterações metabólicas que reduzem a produtividade dos animais leiteiros, principalmente daqueles mais produtivos (MOBERG, 1987; MAYER; LEFCOURT, 1987; MACUHOVA *et al.*, 2002).

Por esta razão, a administração exógena do ACTH, que promove a liberação de CORT, vem sendo utilizada para mensurar a habilidade dos animais em suportar adequadamente as diferentes situações estressantes impostas ao longo da vida produtiva dos animais domésticos (FULKERSON; JAMIESON, 1982; NEGRÃO *et al.*, 2004; DELGADO, 2008).

Desta forma, o presente estudo, sob a hipótese de que o estresse pode intensificar o processo de apoptose durante a lactação, propõe estudar o efeito do estresse (via administração de ACTH) em animais estressados pontualmente (durante toda a lactação) e submetidos a estresse prolongado (durante três dias

seguidos), sobre os níveis de CORT, quantidade e qualidade do leite produzido e taxa de apoptose das células mamárias.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Síntese Láctea

O desenvolvimento da glândula mamária na vida pós-fetal tem início com a puberdade, apesar de permanecer relativamente sub-desenvolvida até a gestação (CUNNINGHAM, 2004). Em grande parte dos animais domésticos, o desenvolvimento do úbere torna-se evidente na metade da gestação, já a secreção láctea tem início durante o último trimestre (principalmente devido ao aumento na secreção de prolactina), resultando na formação de colostro (CUNNINGHAM, 2004).

Ao final da gestação, a glândula mamária, que anteriormente era formada por uma estrutura envolvendo em sua maior parte estruturas de estroma (tecido conjuntivo) é transformada em uma estrutura preenchida com células alveolares que são ativamente sintetizadoras e secretoras de leite (CUNNINGHAM, 2004).

Wilde *et al.* (1986) descobriram que a capacidade de síntese das células da glândula mamária tem muito a ver com o aumento da produção no início da lactação, porém não é responsável pela fase de declínio da produção de leite em ruminantes.

Qualidade do Leite

O leite é “a secreção láctea obtida pela ordenha completa de uma ou mais fêmeas sadias, que contenha, no mínimo, 8,25% de sólidos não gordurosos (proteínas, lactose, minerais, ácidos, enzimas e vitaminas) e 3,25% de gordura láctea” (POIATTI, 2001).

A digestão do leite caprino é mais rápida devido a diversos fatores, como a constituição de 20% de seus ácidos graxos de cadeias curtas e médias, com quatro

a 12 carbonos, facilitando a ação das lípases, também a quase ausência de caseína do tipo α_1 , formando assim um coágulo mais delicado e friável quando acidificado. Sua ligeira alcalinidade, em decorrência do conteúdo protéico e seu diferente arranjo dos fosfatos, em relação ao leite bovino também facilitam a digestão do leite caprino (MARTINS, 2003).

O aroma e sabor característicos do leite de cabra estão associados à presença de duas vezes mais ácidos graxos voláteis, quando comparado ao leite bovino (MARTINS, 2003).

Ao falar sobre a qualidade do leite, relaciona-se o termo à qualidade higiênica, composição, volume, nível tecnológico e saúde do rebanho. A qualidade da matéria prima é um atributo cada vez mais considerado pelas indústrias de laticínios, já que os ganhos em eficiência no processo industrial, aliados às características organolépticas têm estrita relação com o produto final (TOSETTO, 2005).

A proporção de cada componente do leite é influenciada, em diferentes graus, pela nutrição do animal. Assim, a alimentação responde por aproximadamente 50% das variações de gordura e proteínas do leite, porém praticamente não afeta o conteúdo de lactose (FREDEEN, 1996).

Proteína

As proteínas são consideradas macro-moléculas e compostos de carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio. Os diferentes arranjos dos aminoácidos conferem às proteínas variadas formas e funções (MEDEIROS, 2004; CASTRO *et al.*, 2005).

As proteínas do leite encontram-se suspensas em solução e possuem diferentes frações, dentre elas, as de maior presença são as caseínas (α , β e κ), α -

lactoalbumina e β -lactoglobulina, sendo as duas últimas proteínas presentes no soro do leite (KODA; BARBIERI, 1984; AGUIAR *et al.*, 2005; CASTRO *et al.*, 2005).

Para Castro *et al.*(2005), ao comparar as diferentes frações do leite bovino, a fração alergênica de maior positividade foi a β -lactoglobulina, que é a proteína presente em maior quantidade no soro do leite bovino (AGUIAR *et al.*, 2005). Sua função ainda não está bem elucidada, por esse motivo diversos estudos estão sendo feitos com o objetivo de minimizar a presença dessa proteína no leite (ALI; CLARK, 1988; PEREZ; CALVO, 1995; ANTUNES, 2003).

Estudos adicionais, comparando leite caprino e bovino, sobre a hipoalergenicidade e seu significado terapêutico fazem do leite de cabra uma importante alternativa na alimentação humana, já que a grande quantidade de proteínas e fósforo no leite de cabra dá maior capacidade tamponante ao leite, protegendo as células estomacais, sendo utilizado no tratamento de úlceras. O leite de cabra também possui uma maior bio-disponibilidade de ferro, suas proteínas possuem maior digestibilidade, com isso, o leite de cabra será digerido em 40 minutos no estômago humano enquanto que o leite de vaca levará duas horas e meia (PARK, 1994).

O percentual de proteína no leite de cabra está entre 2,3 e 4,2% (Le JAQUEN, 1972; RAMOS; JUÁREZ, 1981; KARIN; LOFTI, 1987; ESPIE; MULLAN, 1990). O conteúdo de proteína varia consideravelmente entre as espécies, de 1% até 14% e geralmente está positivamente correlacionado com o percentual de gordura (GONZÁLEZ *et al.*, 2001).

Gordura

A gordura possui como componente básico os triglicerídeos, que quando digeridos são degradados em ácidos graxos e glicerol. As gorduras podem fornecer 50% ou mais das necessidades energéticas nos humanos (BADAWI, 2006). Já a energia total do leite de cabra é derivada de 50% de gordura, 25% de lactose e 25% de proteína (JENNESS, 1980).

As gorduras são nutrientes importantes, não só como fonte energética como também para sintetizar muitos compostos valiosos, como hormônios, e tecidos vitais para o funcionamento normal do organismo (BADAWI, 2006).

Tanto o leite caprino quanto o bovino possuem quantidades de proteína e gordura semelhantes, porém a diferença significativa está no tipo de gordura e proteína, além da presença de componentes secundários (GRZESIAK, 1997).

No leite caprino os glóbulos de gordura são pequenos e de fácil dispersão, o que, somado à proteína de coagulação, forma uma coalhada fina e macia (COSTA, 2002). O reduzido tamanho das partículas de gordura e a ausência de aglutinina (enzima presente no leite de vaca responsável pela junção dos glóbulos de gordura, formando um coalho de difícil digestão) permitem que exista uma maior área de superfície para o ataque das enzimas, conferindo ao leite caprino uma ótima digestão em um curto espaço de tempo (CHANDAN, 1992).

O percentual de gordura no leite de cabra está entre 3,0 e 3,7% (Le JAQUEN, 1972; RAMOS; JUÁREZ, 1981; KARIN; LOFTI, 1987), e, em outras espécies, pode variar desde 1% até mais de 50%, como em alguns mamíferos aquáticos (GONZÁLEZ *et al.*, 2001).

Lactose

A lactose é um dissacarídeo formado por glicose e galactose, que quando aquecido, libera cálcio (GRUDTNER *et al.*, 1997), faz parte da composição do leite de vaca de 37 a 54g/L e é considerado um açúcar raro, já que praticamente só se encontra no leite, e em uma composição muito constante (MORITZ, 2008), sendo o principal carboidrato sintetizado pelos mamíferos (AGUIAR *et al.*, 2005).

Células da mucosa do intestino delgado possuem a enzima responsável pela digestão da lactose, conhecida como lactase, que disponibiliza para absorção, nesse mesmo órgão, os dois monossacarídeos (CAMPOS, 2003). Pessoas cujas células não produzem a quantidade suficiente da lactase possuem impossibilidade de digestão de leite e produtos lácteos, sendo intolerantes à lactose (GARDNER, 2007).

O percentual de lactose no leite de cabra está entre 3,9 e 4,9% (MBA *et al.*, 1975; JENESS, 1980; VOUTSINAS *et al.*, 1990; PRATA *et al.*, 1998). A quantidade média de lactose pode variar desde traços até menos de 7% em outras espécies (GONZÁLEZ *et al.*, 2001).

População Celular

Residentes assim como recém- recrutados, os leucócitos mamários são constituídos por vários tipos de células, incluindo polimorfonucleares (PMNs), macrófagos e linfócitos. Tais células mediam tanto a resposta inata quanto a resposta imune adquirida (CONCHA, 1986; PAAPE *et al.*, 2002).

De acordo com a coloração que os grânulos presentes no citoplasma das células adquirem ao serem corados e observados em microscópio, as PMNs são classificadas em basófilos, eosinófilos e neutrófilos (PAAPE *et al.*, 2003).

As PMNs são as células encontradas em maior quantidade nos tecidos mamários e secreções durante o período inicial do processo inflamatório (JENSEN; EBERHART, 1981). Enquanto a quantidade das PMNs é relativamente baixa em uma glândula mamária saudável, esses números aumentam em 90% na CCS total durante a mastite (BURVENICH *et al.*, 1994; PAAPE *et al.*, 2002). Como resposta ao processo inflamatório, os mediadores das PMNs migram do sangue ao úbere para fagocitarem e exterminarem os patógenos bacterianos (CRAVEN, 1983; PERSSON *et al.*, 1993).

Outro tipo celular presente no leite são os macrófagos, células mononucleares, que possuem como precursores os monócitos do sangue. Os monócitos sanguíneos ao penetrarem no tecido ou no leite maturam-se como macrófagos mamários (SARIKAYA, 2006).

Os macrófagos são as células presentes em maior quantidade no leite de uma glândula mamária saudável (de 30 a 74%), sua função, assim como os neutrófilos, é de fagocitarem as bactérias e destruí-las com proteases ou espécies reativas de oxigênio. Esse tipo celular é menos eficiente que os neutrófilos para fagocitar os antígenos (LEE *et al.*, 1980; MULLAN *et al.*, 1985, ÖSTENSSON *et al.*, 1988; SARIKAYA, 2006).

Já durante o processo inflamatório a população de macrófagos tende a ser menor. A habilidade dos macrófagos liberarem mensageiros químicos facilitam a migração dos neutrófilos, sendo de grande importância para a resposta imune não específica (CASSATELLA, 1995; HOEBEN *et al.*, 2000; WITTMANN *et al.*, 2002).

O terceiro tipo celular presente na glândula mamária é constituído por células arredondadas e pequenas, com núcleo grande, conhecidas como linfócitos. São as únicas células do sistema imune capazes de reconhecer os antígenos através de

receptores específicos de membrana, portanto representam a imunidade específica do sistema imune (TAYLOR *et al.*, 1997).

Os linfócitos são subdivididos em dois grupos, as células T e B. As células T (T-CD4 e T-CD8) estão envolvidas na mediação da imunidade celular, já o papel primário das células B é a produção de anticorpos contra os antígenos invasores (RIOLLET *et al.*, 2000). Estas células são supostamente responsáveis pela defesa em infecções da glândula mamária, atuando principalmente no tecido mamário mas também no leite (RIOLLET *et al.*, 2001).

Além das células do sistema imune também são encontradas no leite células epiteliais provenientes da descamação do tecido alveolar, presença que sugere a eliminação de células “mortas”, relacionada ao término de sua vida secretória (BOUTINAUD; JAMMES, 2002).

Contagem de Células Somáticas (CCS)

São consideradas somáticas todas as células presentes no leite, sendo elas originárias tanto da descamação dos alvéolos apoptóticos quanto da corrente sangüínea, como os leucócitos ou glóbulos brancos do sangue (macrófagos, linfócitos e neutrófilos) (PHILPOT; NICKERSON, 1991; BRITO; BRITO, 1998), sendo eliminadas com o leite durante o curso normal da lactação (GALIERO; MORENA, 2000).

Dentre os fatores que influenciam a Contagem das Células Somáticas (CCS), pode-se citar a idade da fêmea raça, estresse, estágio de lactação, número de lactações, problemas nutricionais, estações do ano e condições climáticas. As oscilações na CCS também ocorrem em animais livres de infecções na glândula

mamária (SCHUTZ *et al.*, 1990; LAEVENS *et al.*, 1997; OSTRENSKY, 1999; VIANA, 2000) e esta influência pode ocorrer tanto no início quanto no final da lactação.

O aumento na CCS influencia negativamente a composição do leite, a atividade enzimática, o tempo de coagulação, a produtividade e a qualidade dos derivados lácteos (KITCHEN, 1981).

A curva de CCS de uma lactação normal, isto é ausente de infecções é caracterizada por elevadas concentrações no início, valores constantes até o meio da lactação, seguida de queda gradual até o final da lactação (PETERS, 2002). Em contrapartida Jones *et al.* (1984), Harmon (1994), Pereira (2000) e Coldebella (2003) afirmam que há correlação negativa entre a CCS e a produção de leite, portanto quanto maior a CCS menor a produção de leite.

A CCS no leite de cada animal e do tanque é uma ferramenta valiosa na avaliação do nível de mastite sub-clínica no rebanho, na estimativa das perdas quantitativas e qualitativas de produção do leite e derivados, como indicativo da qualidade do leite produzido na propriedade e para estabelecer medidas de prevenção e controle da mastite (JONES *et al.*, 1984; MÜLLER, 2002). Diversos autores afirmam que há correlação negativa entre a CCS e a produção de leite (JONES *et al.*, 1984; HARMON, 1994; PEREIRA, 2000; COLDEBELLA, 2003).

Conforme Paape *et al.*, 2001 cabras com mastite possuem uma CCS de 0,659 a $4,213 \times 10^6$ cel/mL de leite, já em animais sadios essa contagem está em uma faixa que varia de 0,27 a 2×10^6 cel/mL de leite. Já Min *et al.* (2007) verificaram valores médios de $4,76 \times 10^6$ cel/mL para cabras com mastite e $2,25 \times 10^6$ cel/mL para animais sadios. Borges *et al.* (2004) observaram valores medianos de $1,24 \times 10^6$ cel/mL em cabras sadias, valores superiores ao indicado por Haenlein (2001) para fêmeas sadias, que não deveriam ultrapassar 1×10^6 cel/mL.

Mastite e Resposta Imune

Após a infecção intramamária, as bactérias interagem com diversos tipos celulares, especialmente os macrófagos e os neutrófilos residentes. Estas células liberam fatores quimiotáticos e monocíticos, atraindo os macrófagos para o local, que causam uma rápida migração dos PMNs do sangue para o leite (PERSSON *et al.*, 1993; BURVENICH *et al.*, 1994; RIOLLET *et al.*, 2000, MADUREIRA, 2006). As células PMNs agem rapidamente para eliminarem as bactérias, sendo uma reação não específica (PAAPE *et al.*, 2002).

Toxinas, enzimas e componentes da parede bacteriana estimulam a produção de mediadores químicos da inflamação, tais como serotonina, interleucinas e histamina, que somados aos leucócitos presentes no leite, atraem os leucócitos da corrente sanguínea, através de mensageiros químicos ou quimiotaxia (HARMON,1994; MADUREIRA, 2006).

O progresso da reação anti-inflamatória é determinado pelo balanceamento entre forças opostas à inflamação intramamária e as forças favoráveis à reação. Mediadores químicos produzidos pelos fagócitos são necessários para eliminar a bactéria invasora (PAAPE *et al.*, 2002).

Os neutrófilos promovem reações no tecido mamário e causam distúrbios na função mamária, uma vez que geram espécies reativas de oxigênio e liberação de enzimas granulares. De qualquer modo, os mediadores químicos, tal como espécies reativas de oxigênio derivadas dos PMNs causam grande prejuízo nas células secretoras de leite, reduzindo a produção leiteira (MILLER *et al.*, 1993; PAAPE *et al.*, 2002).

Caso a inflamação persista por muito tempo, outras células como macrófagos, linfócitos, plasmócitos, fibroblastos e células mononucleares entram em ação, o que

indica lesão subaguda ou crônica (THOMPSON, 1983; COTRAN *et al.*, 1984; MADUREIRA, 2006).

Pico e Persistência na Lactação

O pico de lactação possui correlação negativa com a persistência na lactação, portanto animais com maior persistência tendem a apresentar pico de lactação menos acentuado (GUIMARÃES *et al.*, 2006).

A persistência na lactação pode ser definida como a capacidade da fêmea em manter sua produção de leite após atingir a produção máxima na lactação (COBUCI *et al.*, 2004). Silva (2008) definiu persistência como a velocidade de declínio da produção diária, entre meses consecutivos próximos.

Cobuci *et al.* (2004) citaram quatro métodos para mensurar a persistência na lactação: 1) baseado em razões entre produção de leite em diferentes fases da lactação; 2) baseado na variação da produção de leite, ao longo da lactação; 3) baseado em parâmetros de modelos matemáticos; e 4) baseado nos valores genéticos obtidos por meio de coeficientes aleatórios dos modelos de regressão aleatória.

Um animal que possui persistência satisfatória tem sua produção diminuída em torno de 10% de um mês ao outro (SOARES FILHO *et al.*, 2001; SPINA, 2003), portanto é persistência que define como será a curva de lactação da fêmea em questão (SILVA, 2008).

Para Ludwick e Petersen (1943) persistência na curva de lactação, pico de produção e duração do período de lactação são os três componentes do ponto de vista biológico da curva de lactação. Segundo Wood (1967), entre esses componentes, a persistência é o mais importante, por este motivo Guimarães *et al.*

(2006) afirmam que a persistência possui forte influência na produção leiteira (GUIMARÃES *et al.*, 2006).

Com maior persistência os animais produzem por mais tempo, por isso a persistência possui direta relação com aspectos econômicos da atividade leiteira (TEKERLI *et al.*, 2000; JAKOBSEN *et al.*, 2002; STEFANON *et al.*, 2002), pois se pode obter maior lucro com a produção de leite adicional (DEKKERS *et al.*, 1998).

Vacas com menores taxas de declínios da produção (maior persistência), devido à ausência de elevadas produções no pico de lactação, têm menor incidência de doenças de origem metabólica e problemas reprodutivos (GROSSMAN *et al.*, 1999; TEKERLI *et al.*, 2000, COBUCCI *et al.*, 2004).

Para Stefanon *et al.* (2002) o desafio é compreender os mecanismos que controlam a perda na produção de leite após o pico de lactação, ou seja, identificar os determinantes fisiológicos do declínio após pico de produção de leite para encontrar formas de reduzir este declínio, de modo a aumentar a persistência da lactação.

Rodrigues *et al.* (2006) observou coeficientes de persistência na lactação de cabras Saanen primíparas de 0,79, através da fórmula:

$$P = \frac{A_n}{A(n-1)}$$

Onde A_n equivale à produção leiteira média diária de um mês

e $A(n-1)$, produção leiteira média do mês anterior, após o pico de lactação.

Apoptose mamária

Grivicich, *et al.* (2007) descrevem apoptose ou morte celular programada como um processo essencial para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, sendo importante para eliminar células supérfluas ou defeituosas.

A morte programada da célula depende da interação entre os diferentes receptores de superfície celular e sinais externos, como hormônios, nutrientes, drogas e outros fatores (FERRARI, 2000a). Um dos principais grupos de substâncias tóxicas capazes de induzir a apoptose é representado pelos radicais livres do oxigênio e nitrogênio (FERRARI, 2000b).

Substâncias antioxidantes, isto é que protegem contra os radicais livres são constituídas por ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, substâncias hidrossolúveis e enzimas, derivam principalmente da dieta, como no caso das vitaminas E, C, beta caroteno e dos elementos-traço zinco, cobre e selênio (LEITE; SARNI, 2003), essas substâncias ainda estão sendo estudadas quanto a sua eficiência na proteção contra os radicais livres.

Modificações morfológicas na célula, ativação interna do gene p53 (e a produção de sua proteína P53) e presença das enzimas caspases, que executam a morte celular apoptótica e a fragmentação nuclear, são os principais indicativos da apoptose (FERRARI; TORRES, 2002).

Durante a apoptose ocorre condensação citoplasmática, sem que haja rompimento da membrana celular, formando corpos apoptóticos ou vesículas apoptóticas, que são prontamente reconhecidas e ingeridas pelos fagócitos locais, o que impede reações inflamatórias em tecidos adjacentes, diferentemente da necrose, onde há esvaziamento do conteúdo celular (FERRARI, 2000a).

Já que a proliferação e a diferenciação das células mamárias preparam a glândula para a próxima lactação (WILDE *et al.*, 1986), a apoptose é uma característica chave do desenvolvimento e da função da glândula (CLARKSON; WATSON, 1999; GREEN; STREULI, 2004), podendo ser percebida durante toda a lactação (ROSFJORD; DICKSON, 1999, WILDE *et al.*, 1999).

No início da lactação, existe equilíbrio entre os processos de divisão (hiperplasia) e morte celular (apoptose) na glândula mamária, porém a partir do pico de lactação o processo de apoptose das células alveolares aumenta gradualmente, reduzindo progressivamente a síntese de leite até a fase final da lactação (BOUTINAUD *et al.*, 2004; TIAN *et al.*, 2005). Por este motivo, o manejo que aumentar a sobrevivência das células ao final da lactação, poderá aumentar a eficiência da produção de leite do animal (FURTH, 1999).

A prenhez parece promover a apoptose e gradual involução na glândula mamária (CAPUCO; AKERS, 1999), além de mudanças na frequência de ordenha (na fase de secagem das fêmeas), que também modificam o número de células epiteliais nos alvéolos (BOUTINAUD, *et al.*, 2004), fazendo com que os animais parem de produzir leite antes do próximo parto, preparando a glândula para uma subsequente lactação.

Segundo Boutinaud *et al.* (2004) ainda subsistem dúvidas relativas a cerca da longevidade de células epiteliais mamárias ou a taxa relativa de perda de células mamárias devido à apoptose e abrasão epitelial.

Estresse

As principais respostas neuroendócrinas observadas em situações de estresse são: ativação do sistema nervoso autônomo (SNA), liberação de

neurotransmissores noradrenérgico e colinérgico; ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, aumento nas concentrações plasmáticas do hormônio liberador de corticotrofina (CRH), adrenocorticotrófico (ACTH), noradrenalina, adrenalina e cortisol (CORT) (AXELROD; REISINE, 1984; MOSTL; PALME 2002). Embora, os níveis de todos estes hormônios, bem como de seus receptores ou das enzimas envolvidas em suas respectivas síntese e metabolização, venham sendo utilizados no estudo do estresse (AXELROD; REISINE, 1984; MOSTL; PALME 2002), a variação do nível plasmático de CORT continua sendo utilizada como indicador universal de estresse, sendo que a elevação de seus níveis se contrapõe aos conceitos de conforto e bem-estar (MOBERG, 1987; BROOM, 1991; MOSTL; PALME 2002).

Diferentes estudos demonstram que o estresse promove aumento na síntese e liberação dos hormônios ACTH e CORT causando alterações metabólicas, imunológicas e comportamentais nos ruminantes (MOBERG, 1987; BROOM, 1991; NEGRÃO *et al.*, 2003; NEGRÃO *et al.*, 2006).

Nos últimos anos, vários autores têm estudado as respostas fisiológicas causadas pelo estresse utilizando a administração exógena de ACTH mensurando assim a habilidade dos animais em responder ao estresse (FULKERSON; JAMIESON; 1982; NEGRÃO *et al.*, 2004).

O aumento dos níveis plasmáticos destes hormônios também pode ser relacionado a alguns estímulos positivos, por exemplo, a ordenha e o aumento da ingestão de alimentos promovem aumentos nos níveis de CORT, mesmo quando os animais apresentaram comportamentos que caracterizavam seu conforto (GOREWIT *et al.*, 1992, TANCIN *et al.*, 1995, NEGRÃO *et al.*, 2006). Este último tipo de aumento dos níveis de ACTH e CORT é associado às alterações metabólicas

normais que facilitam a síntese de leite (TANCIN *et al.*, 1995; MARNET; MCKUSICK, 2001). Estes fatos demonstram que a relação entre os níveis de ACTH e CORT e a lactação ainda não estão bem estabelecidos.

Todavia em muitas situações, o manejo normal dos animais (desmame, vacinação, desvermifugação, pesagem e mudança de instalações) pode ser associado ao estresse e aumento exponencial na concentração plasmática de ACTH e CORT (FULKERSON; JAMIESON, 1982; MARNET; NEGRÃO, 2000; RUSHEN *et al.*, 2001). Ao mesmo tempo, outros fatores estressantes relacionados à lactação (parto, desmame, restrição alimentar e sub-nutrição) foram associados ao aumento da taxa metabólica dos animais (ELVINGER, 1992; RENANVILLE *et al.*, 2000).

Aparentemente, o estresse aumenta a taxa metabólica causando o desequilíbrio entre as taxas de redução e oxidação celular acelerando o processo de apoptose na glândula mamária, modificando assim a organização funcional da glândula mamária (STEFANON *et al.*, 2002; BOUTINAUD *et al.*, 2004).

Alguns autores sugerem que a somatória de eventos estressantes pontuais (parto, desmame, déficit energético) pode a longo termo, promover a manutenção de níveis elevados de CORT causando alterações metabólicas que reduzem a produtividade dos animais leiteiros, principalmente daqueles mais produtivos (MOBERG, 1987; MAYER; LEFCOURT, 1987; MACUHOVA *et al.*, 2002). Outros autores já demonstraram que o estresse aumenta as espécies reativas de oxigênio alterando os processos de divisão (hiperplasia) e morte celular (apoptose) em diferentes tecidos. Conjuntamente as informações apresentadas anteriormente sugerem que o estresse pode intensificar o processo de apoptose na glândula mamária durante a lactação (STEFANON *et al.*, 2002; TIAN *et al.*, 2005).

MATERIAIS E MÉTODOS

Com duração de 10 meses, desde dezembro de 2007 até setembro de 2008, o experimento foi conduzido no Laboratório de Fisiologia Animal, no *campus* da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA-USP) em Pirassununga, que apresenta clima tropical de altitude (634 metros de altitude), localizado na latitude 22° 00' 00" sul e longitude 45° 25' 42" oeste.

Animais, alimentação e manejo

Como animais experimentais foram utilizadas 12 cabras da raça Saanen saudáveis nascidas de parto natural que apresentavam peso ao nascimento compatível com seu padrão racial (Figura 1).

As fêmeas recebiam como alimento volumoso silagem e, como concentrado uma mistura de milho, casca de soja e soja extrusada em cocho coletivo. Também tinham livre acesso à água em bebedouros coletivos providos de bóia. Assim todos os animais experimentais receberam uma dieta semelhante, ajustada de acordo com o AFRC (Technical Committee on Responses to Nutrients, 1997) em função da idade, peso vivo e categoria das fêmeas experimentais.

Os animais permaneceram alocados em baias de 72m², com cobertura e piso ripado em 20m², portanto tendo acesso a solário com piso de concreto, equivalente a mais da metade da baia (Figura 2).



Figura 1 – Animais experimentais



Figura 2 - Instalações

A fim de assegurar a sanidade dos animais durante a fase experimental foram realizados exames coproparasitológicos e desvermifugação quando necessária.

Todas as cabras eram ordenhadas uma vez por dia, com a ordenhadeira regulada para manter um nível de vácuo de 48KPa e uma taxa de pulsação de 120 ciclos/minuto (Figura 3). Esta ordenhadeira é equipada com medidores individuais de leite, do tipo proveta, que possibilitam colher amostras individuais de leite e mensurar a produção de leite diária de cada animal experimental. A mesma rotina de ordenha era seguida: o ordenhador realizava o teste de mastite, realizava o pré-dipping e secava os tetos da cabra, colocava o copo das teteiras da ordenhadeira e, ao término, realizava o pós-dipping.

Os animais consumiam durante a ordenha, 300g de fubá de milho que eram colocados no canzil. Depois de ordenhadas, na parte da manhã as fêmeas

permaneciam em um piquete de manejo, para que as baias e bebedouros pudessem ser limpos e a ração fornecida (Figura 4).



Figura 3 – Sala de ordenha experimental



Figura 4 – Piquete de manejo

Tratamentos e dosagens hormonais

As 12 cabras foram subdivididas casualmente em 2 grupos e submetidas a um estresse padrão via administração exógena de ACTH (Sigma). Durante a lactação, seis as cabras receberam bimensalmente via intravenosa 0,06 UI de ACTH/kg PV (FULKERSON; JAMIESON, 1982) e as outras seis, também via intravenosa, uma solução placebo de soro fisiológico (controle), para se avaliar a influência do estresse pontual durante a lactação.

Já na semana anterior à secagem, as cabras experimentais receberam diariamente ACTH exógeno ou solução placebo, para se avaliar os efeitos do estresse prolongado.

Coleta de dados

Sangue e obtenção de plasma

A colheita composta de sangue coincidia com a administração do ACTH (ou placebo) e foi executada nos seguintes dias experimentais: 30^o, 60^o, 120^o, 180^o e nos três primeiros dias da última semana de lactação.

A coleta de sangue foi iniciada às 12:00, sendo este horário padronizado até o final do experimento, assim como os tempos da coleta composta (-30, 0 (logo antes da aplicação de ACTH ou placebo), 60, 120 e 300 minutos), segundo metodologia descrita por Escobar *et al.* (1998).

Além da colheita composta, nos meses em que não havia administração de ACTH, foram executadas colheitas simples de sangue para monitorar os níveis basais de CORT.

As amostras foram obtidas através da punção da veia jugular da cabra por sistema Vacutainer®, por meio de agulhas 25x10 e tubos plásticos heparinizados providos de tampa de borracha, com capacidade de 9mL cada. Após colheita, os tubos eram mantidos em gelo, logo após a colheita de todos os animais, o sangue era centrifugado à 3000rpm, à 4°C, durante 17 minutos para obtenção do plasma.

O plasma sanguíneo era recuperado por aspiração com pipetas automáticas, acondicionado em tubos e estocado a -20°C para posterior análise.

Leite

A partir do parto, a produção leiteira das cabras foi mensurada diariamente. Quinzenalmente o leite era colhido e, imediatamente após a colheita, as lâminas para CCS eram confeccionadas.

Na CCS através da contagem microscópica direta, 10 μ L de leite eram distribuídos em um retângulo de 1cm², em uma lâmina de microscopia, previamente lavada e flambada. Em seguida, as lâminas eram secas em temperatura ambiente por 24 horas apoiadas em uma superfície plana e protegidas (PRESCOTT; BREED, 1910) e coradas com Azul de Toluidina.

Para contagem do número de células, foram observados 60 campos em cada cm², utilizando-se microscópio óptico comum com objetiva de imersão. Cada amostra foi confeccionada em duplicata (Figura 5). O resultado das contagens de cada amostra foi obtido calculando-se a média dos campos e multiplicando esse valor pelo fator do microscópio, obtendo-se a quantidade de células/mL de leite em cada duplicata, tendo que calcular a média entre as duplicatas.



Figura 5 – Lâminas para CCS

A maior alíquota do leite era congelada *in natura* no freezer para posterior envio à Clínica do Leite (ESALQ-USP) em frascos contendo pastilhas do conservante bronopol (2-bromo-2nitropropane-1,3-diol) para análise dos principais

componentes do leite (proteína, gordura e lactose), determinados por infravermelho (Bentley, 2000). Para assegurar a perfeita mistura do leite com o conservante, era necessário descongelar as amostras e as homogeneizar com a pastilha de bronopol até que o leite adquirisse coloração rosada.

Também se realizou alguns testes para mensurar apoptose a partir de amostras de leite. As coletas da amostra de leite para apoptose foram realizadas de ordenha manual e total dos animais, sendo que 1 litro de leite por animal foi necessário para a formação de 3 peletes (Figura 6). Um pelete para análise histológica (condensação de cromatina), outro para fragmentação de DNA e o terceiro como duplicata, para tal foi preciso centrifugar o leite puro em tubos Falcon por 10 minutos, a 4°C, a 2000rpm, após a primeira centrifugação a parte líquida foi desprezada e o botão celular suspenso em PBS (NaCl, KCl, KH₂PO₄, Na₂HPO₄ anidro, H₂O q.s.p.) e essa mistura foi centrifugada novamente da mesma forma como descrito anteriormente.



Figura 6 – Pelete formado a partir da centrifugação

Outro teste foi realizado para a separação dos peletes, porém nesse caso a centrifugação das alíquotas de leite foi feita durante 20 minutos, a 4°C sob uma Força Centrífuga Relativa de 450g e o leite foi previamente misturado com PBS em diferentes concentrações para avaliar a limpidez do pelete. Após centrifugação, a parte líquida foi desprezada e o botão celular suspenso em PBS. Essa mistura foi

recuperada com auxílio de pipeta automática e transferida para eppendorfs, que foram centrifugados novamente sob uma Força Centrífuga Relativa de 28g, por 6 minutos a 4°C.

Um terceiro teste foi realizado, os procedimentos descritos anteriormente também foram utilizados (centrifugação do leite puro e lavagem com PBS), porém após a centrifugação usual, também foram centrifugadas alíquotas de botões celulares suspensos em PBS em cito-centrífuga por 6 minutos sob uma Força Centrífuga Relativa de 28g.

Outro teste foi realizado, utilizando Ficoll Paque Plus, já que sua densidade e osmolaridade são ótimas para isolar linfócitos sanguíneos. Após centrifugação descrita anteriormente (centrifugação do leite puro e lavagem com PBS), os botões foram ressuspensos em 1mL PBS e adicionados a 6,5mL de Ficoll para centrifugação sob 2000rpm, por 30 minutos a 4°C, com isso formaram-se 4 diferentes camadas que foram utilizadas para esfregaços.

Posteriormente foram testados diferentes corantes para identificação das células epiteliais apoptóticas presentes nos peletes e nos esfregaços provenientes da cito-centrifugação e lidos em microscópio óptico comum com óleo de imersão.

Quando foram obtidos peletes, os mesmos foram recuperados dos tubos Falcon com auxílio de uma alça e colocados em lâminas previamente preparadas (lavadas e secas) em uma área de 4x2cm para realização do esfregaço, após secagem do conteúdo colocado nas lâminas procedeu-se a coloração: cobertura do esfregaço com solução corante (Rosenfeld), lavagem em água corrente até sair totalmente o corante e secagem com gaze ou papel higiênico macio. Quando lidas no microscópio as células ficaram sobrepostas, já que o esfregaço ficou muito grosso, sendo difícil visualizar e diferenciar as células (Figura 7).

As lâminas provenientes da cito-centrifugação também foram coradas com Rosenfeld e, nesse caso, o esfregaço ficou mais fino e, portanto, de fácil leitura, porém também foi difícil identificar as células epiteliais (Figura 8).

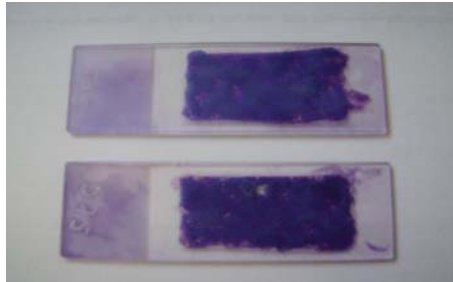


Figura 7 – Esfregaços corados (Rosenfeld)

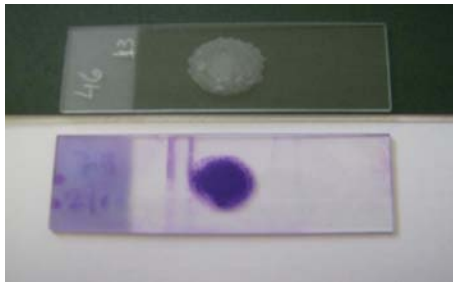


Figura 8 – Esfregaços de citocentrifugação corados (Rosenfeld)

Os esfregaços feitos a partir das alíquotas de Ficoll foram corados com o corante Panótico (Instant Prov). As camadas obtidas concentraram diferentes quantidades de células, sendo visíveis muitos leucócitos e estruturas que não foram identificáveis (Figura 9).

Para tentar diferenciar as células epiteliais das demais, utilizamos o kit de corantes para Papanicolaou (Sigma), composto dos seguintes corantes: Hematoxilina de Harris, Orange G e EA 36 (verde luz, eosina amarelada e marrom Bismarck), responsáveis pela coloração de células esfoliantes, ou, nesse caso, as células epiteliais alveolares apoptóticas. Seguindo as instruções recomendadas pelo produto, procedeu-se a coloração. Os esfregaços ficaram muito espessos, sendo

difícil visualizar as células de forma a poderem ser quantificadas, porém o corante apresentou-se de forma satisfatória (Figura 10).



Figura 9 – Esfregaços de Ficolin corados (Panótico)

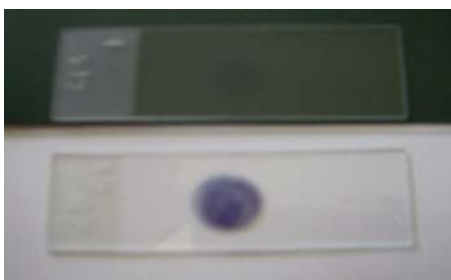


Figura 10 – Esfregaço de citocentrifugação corado (Papanicolaou)

Dosagem hormonal

O plasma era descongelado oportunamente para ser utilizado para as análises de cortisol (CORT), que foram realizadas através de kits imunoenzimáticos (Diagnostic Systems Laboratory Inc) e executadas no Laboratório de Fisiologia Animal da FZEA/USP.

O procedimento segue o princípio básico do imunoensaio enzimático, onde existe competição entre um antígeno não marcado e um antígeno marcado com enzima por um número fixo de sítios de ligação no anticorpo. A quantidade de antígeno marcado com enzima ligada ao anticorpo é inversamente proporcional à concentração da substância não marcada que está sendo analisada na amostra. O material não ligado é removido por decantação e lavagem das cavidades.

Para mensuração do CORT uma curva padrão foi determinada utilizando-se 7 pontos com concentrações variando de 0,5 a 60 $\mu\text{g/dL}$ de cortisol, a leitura dos resultados foi feita em leitor do tipo Elisa (Multiscan MS, Labsystem) utilizando comprimento de onda de 450nm. Os coeficientes intra e interensaio foram calculados para CORT a partir do valor médio da curva padrão utilizada e amostras controle.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Componentes do leite

Os teores de proteína, lactose e gordura foram monitorados mensalmente para investigar se existe correlação com o nível plasmático de CORT já na semana final do experimento, diariamente, para investigar se há influência da liberação de CORT causada pela administração freqüente ACTH.

Proteína

O Gráfico 1 possui as médias dos teores de proteína do leite das fêmeas que não receberam ACTH durante a lactação, portanto, o grupo controle e o das fêmeas do grupo ACTH, com seus respectivos coeficientes de determinação.

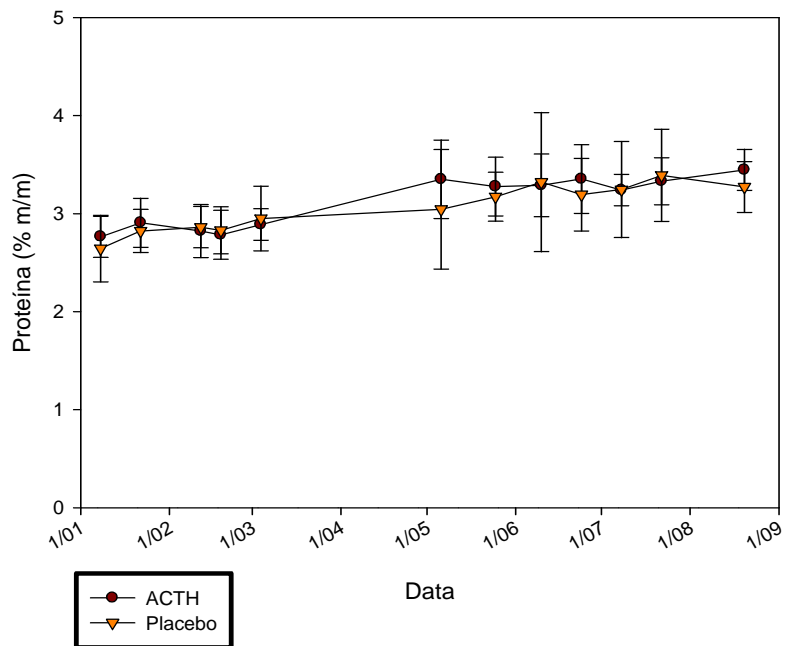


Gráfico 1 – Teores de proteína no leite de ambos os grupos durante a lactação.

Em ambos os grupos houve distribuição linear, com efeito do tempo sobre a concentração de proteína durante o período de lactação (Tabela 1), porém sem efeito do tratamento sobre essa concentração ($p>0,05$).

Tabela 1 – Médias das concentrações protéicas do leite de cabras Saanen durante a lactação

Datas	Grupos	
	Placebo	ACTH
8/1	2,64 ± 0,34 ^{A a}	2,76 ± 0,21 ^{A a}
22/1	2,82 ± 0,22 ^{A ab}	2,91 ± 0,25 ^{A a}
12/2	2,86 ± 0,21 ^{A ab}	2,82 ± 0,27 ^{A a}
19/2	2,83 ± 0,24 ^{A ab}	2,78 ± 0,25 ^{A a}
4/3	2,95 ± 0,33 ^{A bc}	2,89 ± 0,16 ^{A a}
6/5	3,04 ± 0,61 ^{A bcd}	3,35 ± 0,40 ^{A b}
25/5	3,17 ± 0,25 ^{A cde}	3,28 ± 0,30 ^{A b}
10/6	3,32 ± 0,71 ^{A e}	3,29 ± 0,32 ^{A b}
24/6	3,19 ± 0,37 ^{A de}	3,35 ± 0,35 ^{A b}
8/7	3,25 ± 0,49 ^{A de}	3,24 ± 0,16 ^{A b}
22/7	3,39 ± 0,47 ^{A e}	3,33 ± 0,24 ^{A b}
20/8	3,27 ± 0,26 ^{A de}	3,45 ± 0,21 ^{A b}

Letras maiúsculas para linhas (tratamentos) e minúsculas para colunas (lactação). Letras não coincidentes indicam diferença significativa (Tukey, $\alpha=0,05$).

Quando se analisou a concentração de proteína de animais submetidos a estresse prolongado, isto é, com aplicação de ACTH por três dias consecutivos, a curva que melhor explicaria a distribuição da média dessas concentrações foi polinomial, o que se pode observar no gráfico 2.

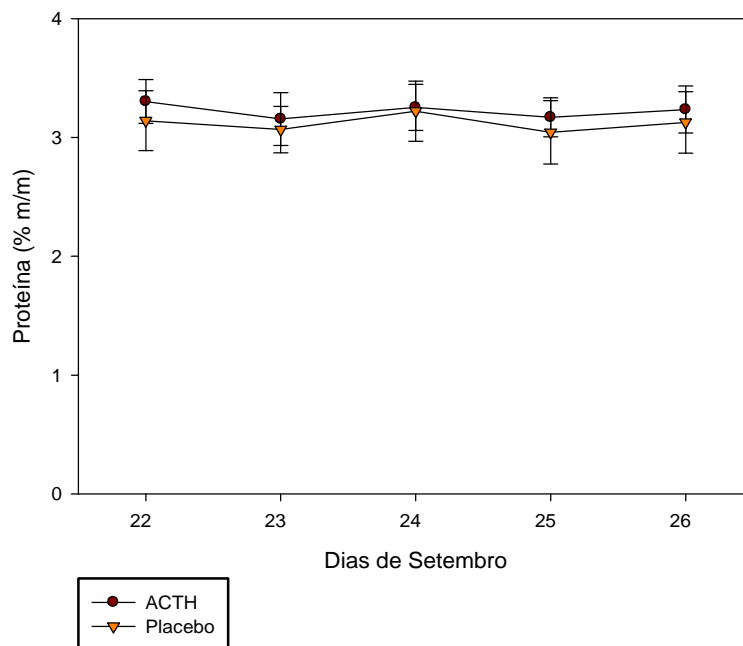


Gráfico 2 – Teores de proteína no leite de ambos os grupos na última semana de lactação.

A distribuição dos valores de ambos os grupos não foi diferente entre si, nem durante os dias de coleta ($p > 0,05$).

A concentração protéica nos dois diferentes momentos do experimento (estresse pontual e prolongado) obteve curvas de distribuição diferenciadas, pois houve ascensão dos valores durante a lactação, com distribuição linear quando se estudou o estresse pontual, já no estudo do estresse prolongado, a distribuição das médias da concentração protéica obteve distribuição polinomial, com valores oscilando entre $3,13 \pm 0,09$ e $3,23 \pm 0,07\%$ para animais do grupo Placebo (controle) e ACTH respectivamente.

Os valores encontrados no período experimental caracterizado pelo estresse prolongado são semelhantes aos valores encontrados no mês anterior a esse estresse, isto é, quando os animais encontravam-se em período de estresse pontual,

portanto não houve influência do estresse por três dias consecutivos na evolução da curva de distribuição da concentração protéica.

Segundo Queiroga *et al.* (2007) a proteína é um dos componentes do leite que apresenta concentração mais estável e não apresenta grandes variações ao longo de toda a lactação, afirmativa que contradiz o que foi observado no experimento, já que houve diferenças entre o início e final da lactação independentemente do tratamento com ACTH.

A ascensão dos teores protéicos durante a lactação foi observada por Barbosa *et al.* (2002), que encontraram valores medianos de $3,0 \pm 0,5\%$, ao mesmo tempo, porém, Gomes *et al.* (2004) obtiveram valores estáveis em toda a lactação, com média de 3,27%, assim como Prata *et al.* (1998), que observou valores por volta de 2,97% em cabras Saanen.

Barbosa *et al.* (2002) relacionaram os teores de proteína à produção de leite, portanto quando houve o pico de produção a concentração protéica era menor e no final da lactação os teores eram maiores, corroborando com os dados encontrados, já que as cabras iniciaram a lactação com teores de, em média, 2,70% e finalizaram a lactação com média de 3,36%.

Brasil *et al.* (2000) ao submeter cabras ao estresse calórico não observaram valores semelhantes de proteína, pois animais estressados obtiveram menores teores protéicos, equivalente a, em média, 2,82%, contra 3,01% de média do teor protéico dos animais não estressados. Porém estes valores estão associados a alimentação dos animais, já que os submetidos a estresse calórico ingerem menos nutrientes (alimentos e água).

Fredeen (1996) relaciona a nutrição dos animais a alterações no teor protéico do leite, assim como Brito (2004), que cita a ingestão de energia através de

carboidratos como principal fator de variável nos teores protéicos. Sabe-se que os aminoácidos presentes no plasma sanguíneo servem como fontes para síntese de proteínas pelas células da glândula mamária, em experimento, Canaes (2007) constatou que animais submetidos a estresse via transporte, com aumento dos níveis de CORT não apresentaram aumento nos teores de proteína sanguínea, o que explica a semelhança da distribuição das concentrações de proteína no leite das fêmeas do presente experimento.

Gordura

Os coeficientes de determinação do gráfico abaixo (Gráfico 3) foram elaboradas através dos valores médios da gordura no leite das cabras, durante toda a lactação, de ambos grupos experimentais.

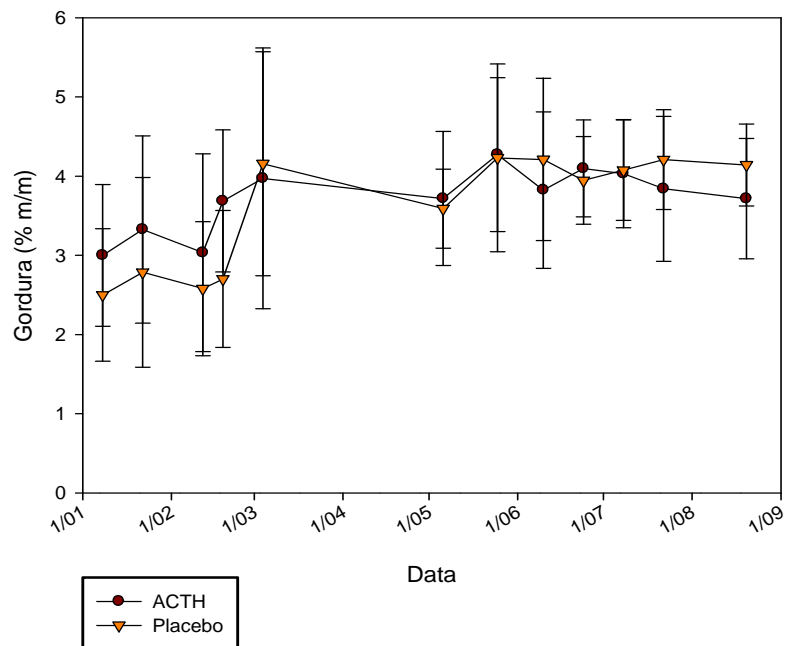


Gráfico 3 – Teores de gordura no leite de ambos os grupos durante a lactação.

A distribuição média dos teores de gordura ajustou-se melhor a uma curva, porém obteve coeficiente de correlação pouco menor quando os pontos foram dispostos em uma reta ascendente. A concentração dos teores de gordura foi igual durante toda a lactação em ambos os grupos ($p>0,05$).

Já quando os animais foram submetidos a estresse prolongado, a curva polinomial de terceira ordem obteve alto coeficiente de correlação, no gráfico 4 observa-se a distribuição das concentrações de gordura.

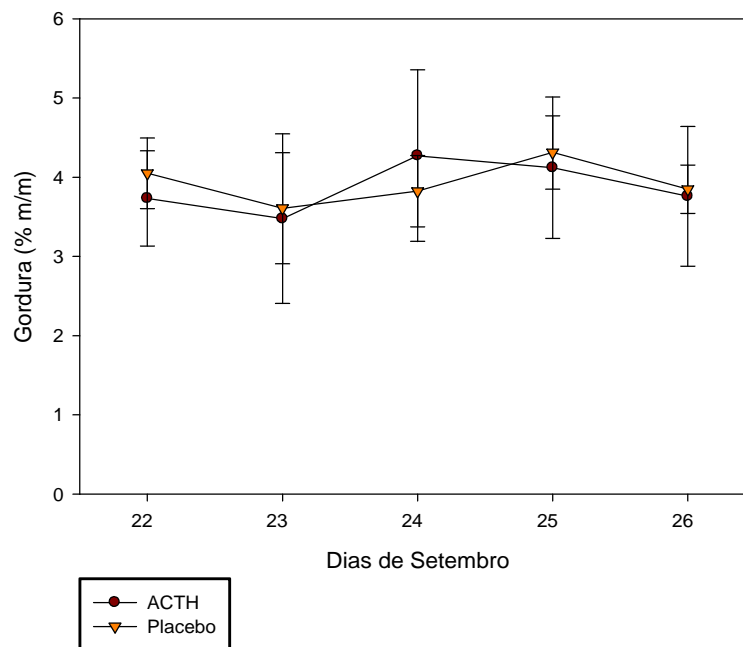


Gráfico 4 – Teores de gordura no leite de ambos os grupos na última semana de lactação.

Não houve diferenças entre os grupos, em ambos a distribuição das concentrações apresentou o mesmo comportamento, porém houve efeito do tempo em ambos ($p>0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Médias das concentrações de gordura do leite de cabras Saanen na última semana de lactação.

Datas	Grupos	
	Placebo	ACTH
22/9	4,05 ± 0,45 ^{A bc}	3,73 ± 0,60 ^{A ab}
23/9	3,61 ± 0,70 ^{A a}	3,48 ± 1,07 ^{A a}
24/9	3,83 ± 0,45 ^{A ab}	4,27 ± 1,08 ^{A c}
25/9	4,31 ± 0,46 ^{A c}	4,12 ± 0,89 ^{A c}
26/9	3,85 ± 0,30 ^{A ab}	3,76 ± 0,88 ^{A b}

Letras maiúsculas para linhas (tratamentos) e minúsculas para colunas (lactação). Letras não coincidentes indicam diferença significativa (Tukey, $\alpha=0,05$).

Em ambos os momentos experimentais (estresse pontual e prolongado) a distribuição dos teores de gordura obteve melhor ajuste a uma curva, porém durante a lactação a variação dos teores foi de $3,37 \pm 0,87$ e $3,64 \pm 0,64\%$ para o grupo Placebo (controle) e ACTH respectivamente. Já nos dias em que os animais foram estressados continuamente, houve variação de $3,88 \pm 0,4$ e $3,96 \pm 0,35\%$ para ambos os grupos (Controle e ACTH respectivamente).

Apesar de obterem menor variação durante o estresse prolongado, os teores de gordura foram diferentes devido ao menor período estudado se compararmos aos teores de uma lactação inteira. Segundo Queiroga *et al.* (2007) durante a lactação, os teores de gordura no leite de cabras Saanen sofrem variações que oscilam de 2,9 a 3,5% (apenas 0,6% de variação), diferentemente dos valores encontrados no presente experimento, que variaram entre 2,75 e 4,25%. No presente estudo houve variação de até 1,5%, assim como no estudo de Ramos e Juárez (1981), cujo percentual de variação foi de 1,9, com teores protéicos que oscilaram de 2,5 a 4,4%.

Teixeira *et al.* (2003) ao estudarem a lactação de vacas Holandesas não encontraram valores diferentes de gordura, assim como Chagas (2005), que ao suplementar cabras não observou alterações no percentual de gordura durante a lactação. Já Zeng e Escobar (1995), com valores medianos de 3,73% e Zeng *et al.*

(1997), com valores de $2,91 \pm 0,16\%$ observaram médias de gordura decrescentes durante a lactação de cabras.

Em contrapartida, Voutsinas *et al.* (1990) verificaram valores crescentes de gordura durante a lactação de cabras, variando de 2,6 a 4,9%, Rota *et al.* (1993) também verificaram aumento dos teores de gordura, assim como Barbosa *et al.* (2002), que citaram aumento nos teores de gordura (3,5 a 4,5%), relacionando à produção de leite, portanto conforme diminui a quantidade de leite, aumenta a percentagem de gordura.

Brasil *et al.* (2000) verificaram valores menores de gordura em cabras submetidas a estresse calórico, fato explicado pela diminuição da ingestão de fibras e também pelo aumento da taxa metabólica (GONZÁLEZ, 2003).

Conforme Brito (2004) e Gomes *et al.* (2004) a gordura é o componente que sofre maior variação durante a lactação, sendo dependente de fatores nutricionais, excesso de concentrado ou escassez de fibra, talvez seja a explicação dos teores de gordura não terem sido diferentes entre os grupos durante o experimento, já que ambos os grupos experimentais receberam a mesma dieta durante o experimento.

Lactose

O gráfico 5 possui teores médios das concentrações de lactose no leite das cabras do grupo controle e do grupo ACTH e coeficientes de determinação para os dois grupos experimentais.

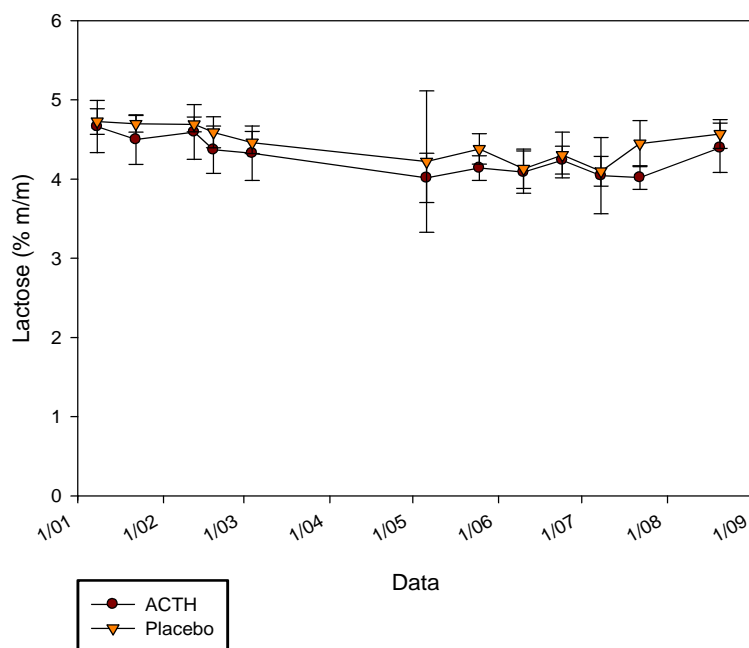


Gráfico 5 – Teores de lactose no leite de ambos os grupos durante a lactação.

Tanto no grupo controle quanto no grupo ACTH as concentrações médias de lactose obtiveram distribuição polinomial. Apesar de não ter havido efeito do tratamento, a concentração de lactose sofreu alterações durante a lactação em ambos os grupos ($p > 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Médias das concentrações de lactose do leite de cabras Saanen durante a lactação.

Datas	Grupos	
	Placebo	ACTH
8/1	4,73 ± 0,16 ^{A e}	4,66 ± 0,33 ^{A g}
22/1	4,70 ± 0,10 ^{A e}	4,50 ± 0,31 ^{A efg}
12/2	4,69 ± 0,09 ^{A e}	4,59 ± 0,34 ^{A fg}
19/2	4,59 ± 0,20 ^{A de}	4,37 ± 0,30 ^{A def}
4/3	4,46 ± 0,14 ^{A cd}	4,33 ± 0,35 ^{A cde}
6/5	4,22 ± 0,89 ^{A ab}	4,01 ± 0,31 ^{A a}
25/5	4,38 ± 0,19 ^{A bcd}	4,14 ± 0,16 ^{A abc}
10/6	4,13 ± 0,25 ^{A a}	4,09 ± 0,27 ^{A ab}
24/6	4,30 ± 0,29 ^{A abc}	4,24 ± 0,18 ^{A bcd}
8/7	4,10 ± 0,19 ^{A a}	4,04 ± 0,48 ^{A ab}
22/7	4,45 ± 0,29 ^{A cd}	4,02 ± 0,15 ^{A ab}
20/8	4,57 ± 0,18 ^{A de}	4,39 ± 0,31 ^{A def}

Letras maiúsculas para linhas (tratamentos) e minúsculas para colunas (lactação). Letras não coincidentes indicam diferença significativa (Tukey, $\alpha = 0,05$).

Submetidas a estresse prolongado, as cabras obtiveram concentrações de lactose distribuídas em curva de quarta ordem, como se observa no gráfico 6.

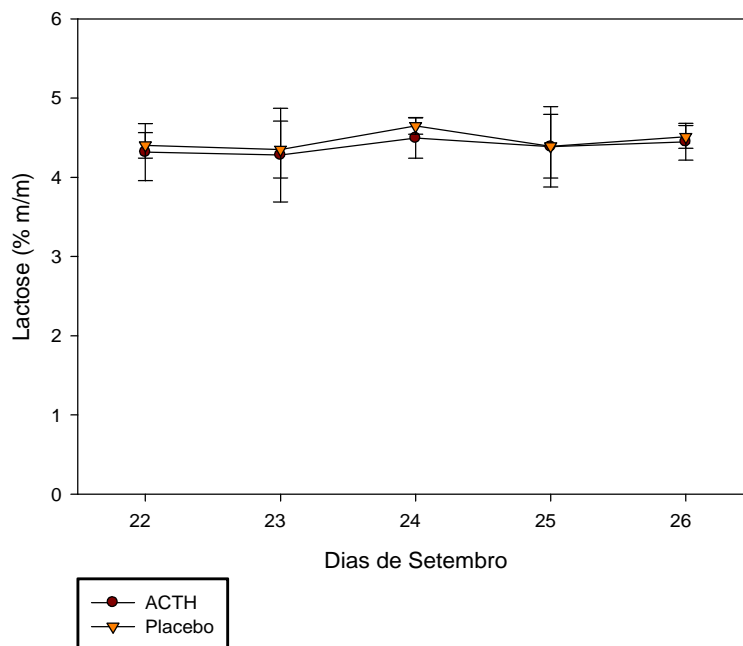


Gráfico 6 – Teores de lactose no leite de ambos os grupos na última semana de lactação.

Nesse caso, não houve diferenças entre os grupos e ambos sofreram alterações na concentração de lactose durante os dias experimentais ($p > 0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4 - Médias das concentrações de lactose do leite de cabras Saanen na última semana de lactação.

Datas	Grupos	
	Placebo	ACTH
22/9	4,40 ± 0,16 ^{A ab}	4,32 ± 0,36 ^{A ab}
23/9	4,35 ± 0,36 ^{A a}	4,28 ± 0,59 ^{A a}
24/9	4,65 ± 0,11 ^{A c}	4,50 ± 0,26 ^{A d}
25/9	4,39 ± 0,40 ^{A ab}	4,39 ± 0,51 ^{A bc}
26/9	4,51 ± 0,15 ^{A b}	4,45 ± 0,23 ^{A d}

Letras maiúsculas para linhas (tratamentos) e minúsculas para colunas (lactação). Letras não coincidentes indicam diferença significativa (Tukey, $\alpha = 0,05$).

A lactose é o componente mais estável do leite, já que ela é responsável por 50% da pressão osmótica do leite, sendo sua concentração estabilizada pelo volume

de água necessário para que o leite seja isotônico ao citoplasma celular. Assim, mesmo com a maior disponibilidade de glicose no sangue e, conseqüente, aumento na síntese de lactose, não haverá aumento da concentração deste componente no leite e sim aumento do volume de leite produzido (GONZÁLEZ; CAMPOS, 2003), portanto possui pequena relação com a nutrição dos animais (FREDEEN, 1996), se analisada sem levar em consideração a produção leiteira, já que a síntese de lactose depende da glicose sanguínea advinda da alimentação dos animais.

No início da lactação os valores de lactose do presente estudo foram maiores (4,4 e 4,32%) que os valores encontrados ao final, resultado também encontrado por Voutsinas *et al.* (1990), que obteve valores oscilando de 3,9 a 4,7% durante a lactação, Zeng *et al.* (1997) e Gomes *et al.* (2004) também relataram queda na concentração de lactose com o avanço da lactação de cabras. Já Zeng e Escobar (1995) encontraram teores constantes para toda a lactação de, em média, 4,42%, assim como Barbosa *et al.* (2002).

Brasil *et al.* (2000) encontraram valores diferentes na concentração de lactose ao submeterem cabras Pardas-Alpinas a estresse térmico, sendo de 4,66% para animais em termoneutralidade, contra 4,63% para as fêmeas submetidas ao estresse, esse fator é explicado pelos autores como consequência da ingestão de nutrientes, já que o grupo estressado ingere menos alimento e água, produzindo menos leite com menos componentes (proteína, gordura e lactose).

As concentrações médias de lactose no leite das cabras do presente experimento (4,42%) foram muito semelhantes às encontradas por Prata *et al.* (1998), que apresentou média de 4,35% de lactose no leite de cabras Saanen criadas na região sudeste do Brasil.

A concentração de glicose no plasma sanguíneo influencia a quantidade de lactose sintetizada pela glândula mamária, Delgado (2008), ao tratar animais com ACTH não observou aumento nos níveis de glicose plasmática, o que explica a semelhante curva de distribuição das concentrações de lactose de ambos os grupos do presente experimento.

Em ambas as fases do experimento a concentração de lactose apresentou-se de forma semelhante, o que nos leva a concluir que o estresse pontual (ao longo da lactação) e o estresse prolongado (durante três dias seguidos) não influenciaram a concentração desse componente no leite das cabras.

Contagem de Células Somáticas (CCS)

O gráfico 7 demonstra as distribuições das médias do Log de CCS dos grupos experimentais.

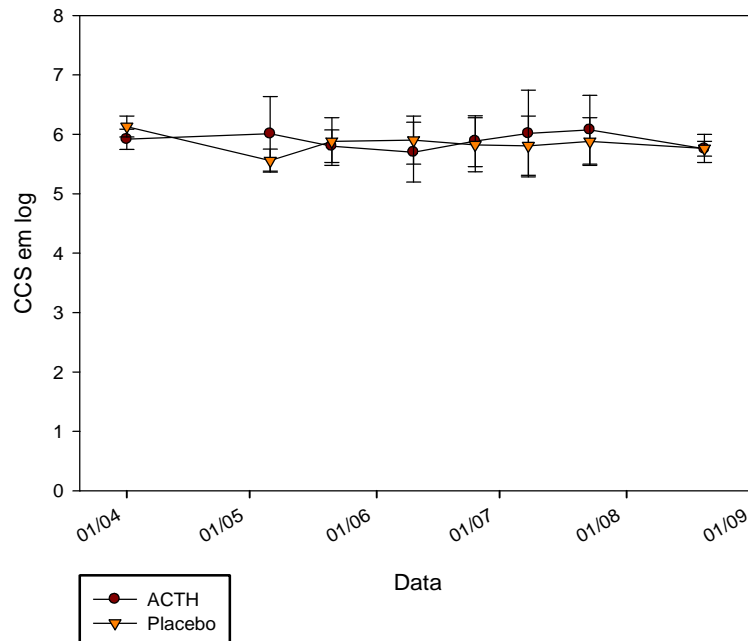


Gráfico 7 – Contagem de Células Somáticas no leite de ambos os grupos durante a lactação.

Apesar de apresentarem curvas de distribuição de Log de CCS diferentes, os valores compreendidos nelas são semelhantes, portanto não houve efeito do tratamento sobre a concentração das células somáticas, porém houve efeito do tempo sobre essa distribuição ($p > 0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5 - Médias das concentrações de Log de CCS do leite de cabras Saanen durante a lactação.

Datas	Grupos	
	Placebo	ACTH
1/4	6,131 ± 0,176 ^{A c}	5,916 ± 0,170 ^{A cd}
6/5	5,557 ± 0,194 ^{A a}	6,010 ± 0,627 ^{A de}
21/5	5,880 ± 0,401 ^{A b}	5,802 ± 0,273 ^{A abc}
10/6	5,902 ± 0,406 ^{A b}	5,700 ± 0,504 ^{A a}
25/6	5,825 ± 0,454 ^{A b}	5,885 ± 0,430 ^{A bc}
8/7	5,809 ± 0,498 ^{A b}	6,014 ± 0,730 ^{A de}
23/7	5,880 ± 0,400 ^{A b}	6,077 ± 0,579 ^{A e}
20/8	5,762 ± 0,235 ^{A b}	5,757 ± 0,125 ^{A ab}

Letras maiúsculas para linhas (tratamentos) e minúsculas para colunas (lactação). Letras não coincidentes indicam diferença significativa (Tukey, $\alpha = 0,05$).

Fêmeas submetidas a estresse prolongado apresentaram curvas de distribuição distintas, sendo a do grupo Placebo (controle), quadrática e a do grupo ACTH, linear (Gráfico 8).

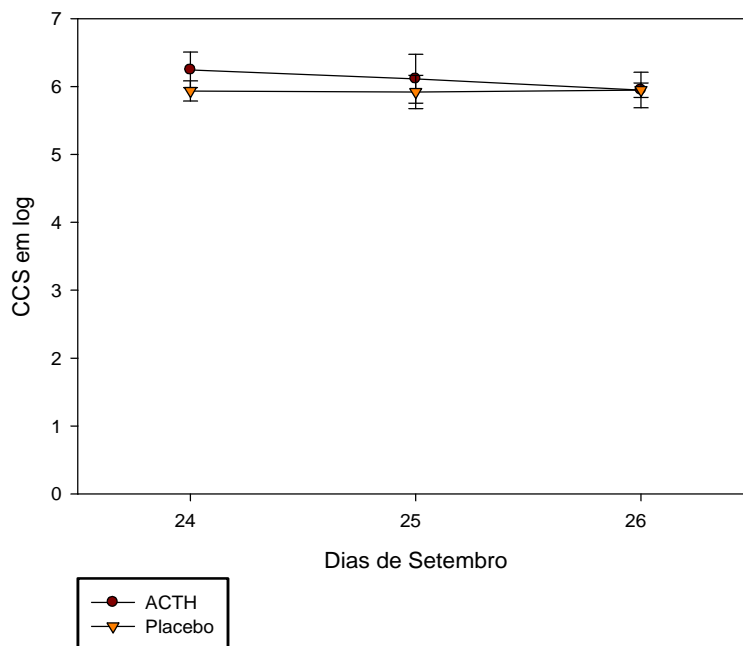


Gráfico 8 – Contagem de Células Somáticas no leite de ambos os grupos na última semana de lactação.

Nesse caso, com estresse prolongado, a concentração do Log de CCS sofreu influência do tempo apenas no grupo desafio, diminuindo ($p > 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6 - Médias das concentrações de Log de CCS do leite de cabras Saanen na última semana de lactação.

Datas	Grupos	
	Placebo	ACTH
24/9	5,935 ± 0,149 ^{Aa}	6,246 ± 0,262 ^{Ab}
25/9	5,92 ± 0,245 ^{Aa}	6,115 ± 0,359 ^{Ab}
26/9	5,948 ± 0,106 ^{Aa}	5,949 ± 0,261 ^{Aa}

Letras maiúsculas para linhas (tratamentos) e minúsculas para colunas (lactação). Letras não coincidentes indicam diferença significativa (Tukey, $\alpha = 0,05$).

As médias de CCS apresentadas neste trabalho ($1000 \pm 300 \times 10^3$ cel/mL de leite) são altas se consideradas as CCS no leite de cabras Saanen criadas na região sul do Brasil (ZAMBOM *et al.*, 2005a; ZAMBOM *et al.*, 2005b), porém Andrade *et al.* (2001) observaram valores de CCS maiores em cabras de raça Alpina de alta produção.

Os valores encontrados estão situados na faixa indicada para animais sadios (ausência de mastite) 270 a 2000x10³/mL de leite (PAAPE *et al.*, 2001), indicando que a ordenha e o manejo dos animais foram realizados de forma adequada e que não houve influência do tratamento com ACTH na CCS do leite de cabras.

O fato de a CCS ter diminuído quando as fêmeas foram submetidas a estresse prolongado (três dias consecutivos) não era o que se esperava, já que o estresse supostamente eleva a apoptose das células epiteliais (STEFANON *et al.*, 2002; BOUTINAUD *et al.*, 2004, TIAN *et al.*, 2005), porém Peters (2002) sugere que uma curva normal de CCS possui queda gradual na concentração dessas células após o pico de lactação.

Produção leiteira

O gráfico 9 contém valores da média da produção leiteira das cabras durante a lactação e o gráfico 10, produção diária dos animais submetidos a estresse pontual.

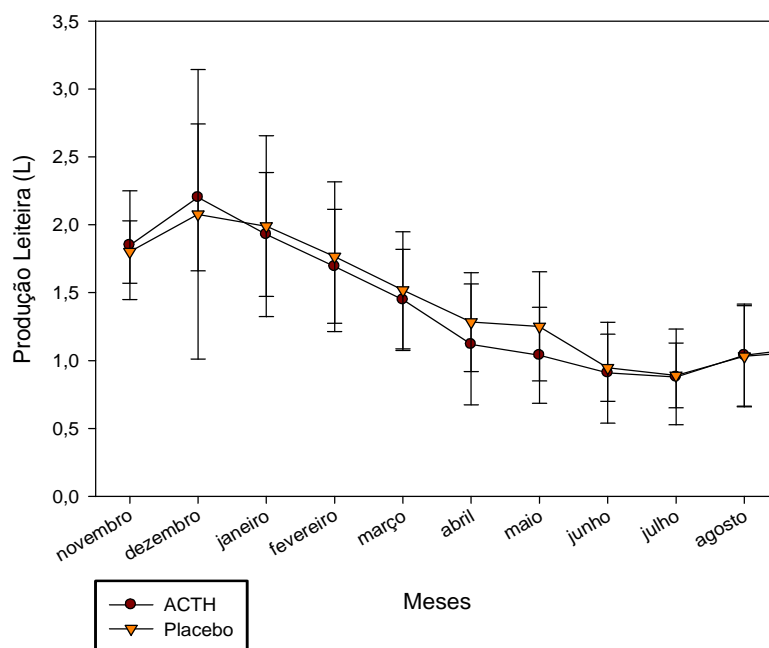


Gráfico 9 – Produção leiteira de ambos os grupos na durante a lactação.

As fêmeas não apresentaram diferenças produtivas durante a lactação. E o pico de lactação pode ser observado no gráfico 9 para ambos os grupos no mês de dezembro.

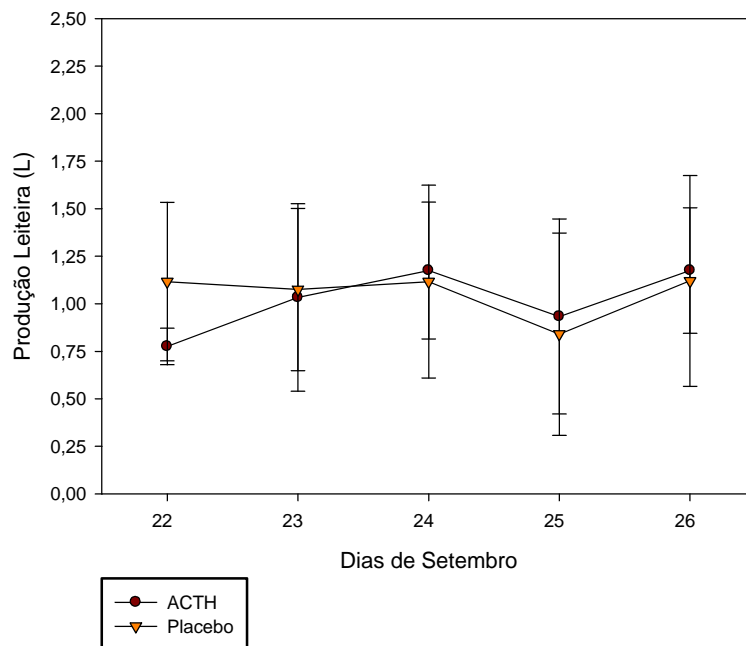


Gráfico 10 – Produção leiteira de ambos os grupos na última semana de lactação.

As fêmeas não apresentaram diferenças produtivas quando submetidas a estresse pontual e ambos os grupos obtiveram alto coeficiente de correlação quando os pontos foram dispostos em uma curva. Também não houve efeito do desafio com ACTH/Placebo sobre a produção de leite dos animais experimentais ($p > 0,05$).

Através dos valores de produção dos animais foram calculados os coeficientes de persistência, sendo em média iguais a 0,85 para o grupo Placebo (controle) e 0,83 para o grupo ACTH, que indica que não houve diferenças entre os grupos. Conforme Jardim (1986) cabras leiteiras especializadas apresentam coeficiente de persistência variando de 0,79 a 0,96 e segundo Graminha (1999) a persistência é ainda maior e animais de primeira lactação.

Animais submetidos a estresse térmico apresentam menor média de produção leiteira (NAAS; ARCARO Jr., 2001; ARCARO Jr. *et al.*, 2003), porém no presente experimento não houve influência do estresse via ACTH sobre a produção de leite, já que as médias mensais de produção apresentaram-se de forma usual, iniciando com $1,95 \pm 0,05L$ e finalizando a lactação com produção média de $1,09 \pm 0,02L$, valores pouco menores que os encontrados por Rodrigues *et al.* (2006), que foram de 2,40L ao início da lactação de cabras Saanen primíparas e 1,90L ao final da lactação, porém semelhantes aos citados por Barros *et al* (1992).

Níveis plasmáticos de Cortisol

O gráfico 11 possui curvas de distribuição calculadas através das médias dos níveis plasmáticos de CORT durante os dias de desafio.

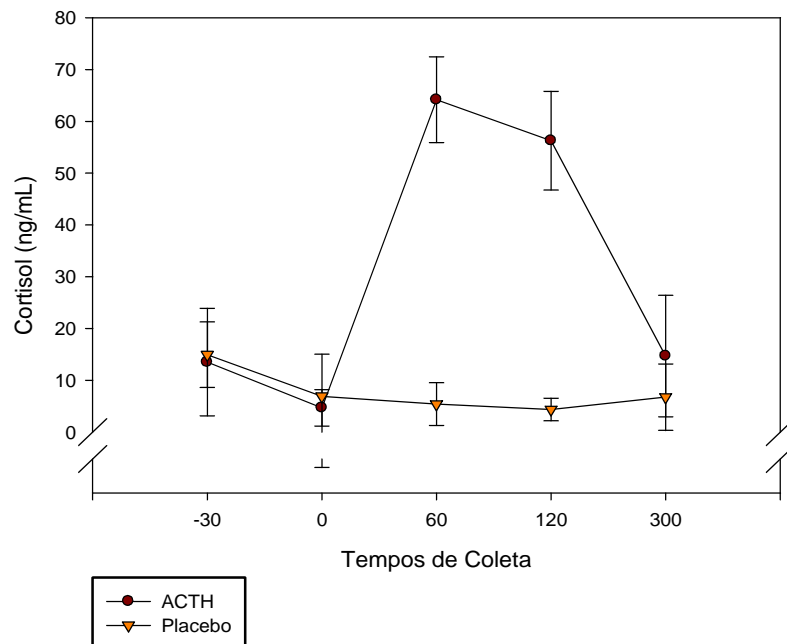


Gráfico 11 – Níveis plasmáticos médios de cortisol durante o período experimental em dias de aplicação de ACTH/Placebo.

Os níveis plasmáticos de CORT obtiveram o mesmo modelo de distribuição (gráfico 11) em todos os dias de desafio. Antes de receberem ACTH/Placebo ambos os grupos apresentaram concentrações basais de CORT, nos tempos -30 (meia hora antes da aplicação de ACTH/Placebo) e 0 (momentos antes da aplicação), indicando que não houve estresse durante a aplicação do ACTH/Placebo, assim como relataram Duvaux-Ponter *et al.* (2003) e Canaes (2007), a diferença entre os grupos é percebida 60 minutos após a aplicação do hormônio, já que a concentração de CORT foi maior no grupo ACTH, quando comparado ao grupo Placebo (controle) (Tabela 7), no momento em que há o pico de liberação de CORT (ESCOBAR *et al.*, 1998).

Já no tempo 120 a concentração de CORT ainda se encontrava em níveis altos no grupo que recebeu ACTH, também elucidado por Escobar *et al.* (1998), os valores retornaram ao basal após 300 minutos da aplicação do ACTH ($p>0,05$).

Tabela 7 - Médias das concentrações de Cortisol plasmático de cabras Saanen submetidas a aplicação de ACTH/Placebo.

Tempos da coleta (min)	Grupos	
	Placebo	ACTH
-30	13,70 ^{A a}	14,67 ^{A a}
0	5,49 ^{A a}	5,40 ^{A a}
60	7,26 ^{A a}	63,54 ^{B b}
120	6,65 ^{A a}	53,70 ^{B b}
300	6,91 ^{A a}	15,35 ^{A a}

Letras maiúsculas para linhas (tratamentos) e minúsculas para colunas (lactação). Letras não coincidentes indicam diferença significativa (Tukey, $\alpha=0,05$).

O grupo Placebo (controle) não obteve diferenças nas concentrações de CORT plasmático ($p>0,05$), valores esperados e citados por Delgado (2008), já que não houve estímulo da adrenal, pelo ACTH ou outro tipo de agente estressor, para que houvesse a liberação de CORT (PINEDA; DOOLEY, 1999). Em contrapartida o grupo experimental que recebeu ACTH obteve médias plasmáticas de CORT nos

tempos 60 e 120 superiores às médias do outro grupo, indicando que houve efeito do ACTH. O que indica que animais estressados tendem a diminuir a qualidade e produtividade do leite não somente devido aos níveis de CORT.

Essa mesma disposição dos pontos da curva de CORT também foi observada nos dias em que houve estresse prolongado, como se pode visualizar no gráfico 12.

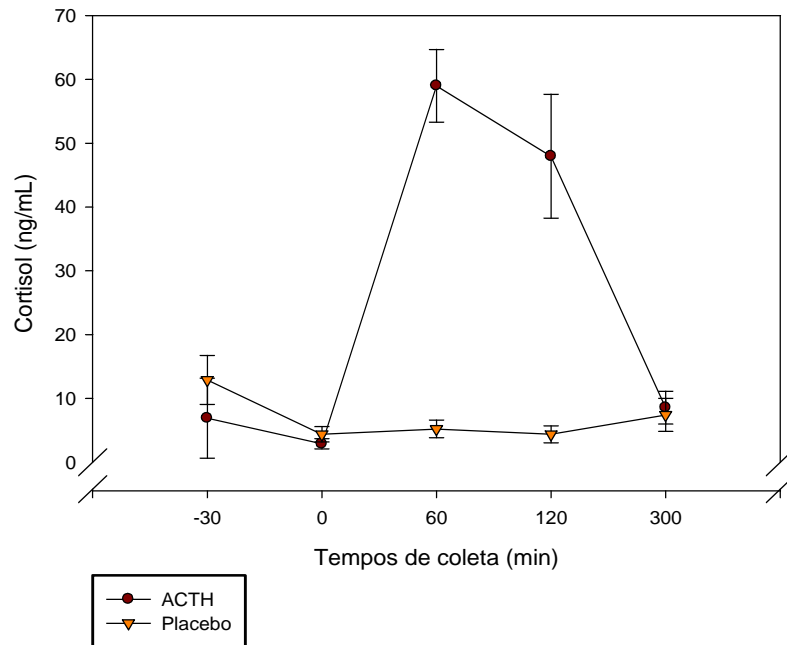


Gráfico 12 – Níveis plasmáticos médios de cortisol durante o período experimental em dias consecutivos de aplicação de ACTH/Placebo.

Os pontos obtiveram a mesma disposição em ambos os gráficos (12 e 13), o que também indica que houve produção de CORT após a aplicação de ACTH em dias consecutivos, isto é, em dias de estresse prolongado.

Durante a lactação, nos meses em que não houve aplicação de ACTH, foram feitas coletas simples, apenas para monitorar os níveis basais dos animais e avaliar se as fêmeas do grupo desafio não obteriam valores de CORT maiores, devido à adaptação à aplicação do hormônio.

Não houve diferenças entre os grupos, quando se analisaram os níveis basais de CORT, fato que indica que não houve elevação de CORT nas fêmeas do grupo que recebia ACTH a cada dois meses, fato que pode ser percebido através do gráfico 13.

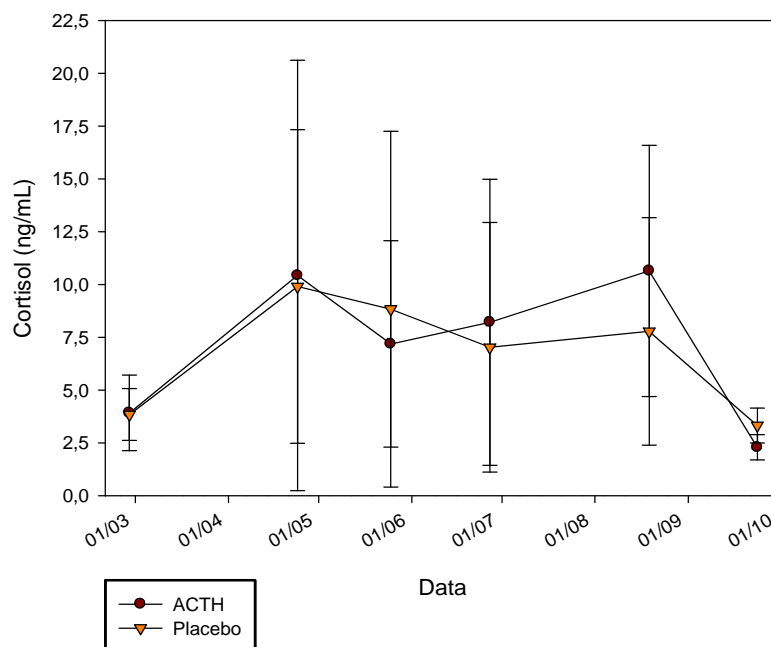


Gráfico 13 – Níveis basais de cortisol de ambos os grupos.

Os animais submetidos a estresse pontual durante a lactação apresentaram valores crescentes na concentração de CORT basal, porém sem diferenças. Provavelmente se as fêmeas continuassem com o tratamento com ACTH, o hormônio poderia promover a manutenção dos níveis elevados de CORT causando alterações metabólicas que reduziriam a produtividade dos animais leiteiros, principalmente daqueles mais produtivos (MOBERG, 1987; MAYER; LEFCOURT, 1987; MACUHOVA *et al.*, 2002).

Em ambas as fases experimentais a distribuição das concentrações de CORT apresentaram-se da mesma forma, apesar das fêmeas terem sido submetidas a

estresse prolongado, os níveis basais de CORT foram semelhantes em ambos os grupos durante os três dias de aplicação do hormônio ($p>0,05$).

Analisando as médias de produção leiteira e de CORT, observa-se que não há correlação entre esses valores, isto é, nem sempre animais mais produtivos apresentam elevados níveis de CORT, reduzindo a produção leiteira, assim como todas as fêmeas menos produtivas não apresentam padrões na distribuição dos níveis de CORT, ou abaixo ou acima da média.

A produção de CORT também não pareceu influenciar na qualidade do leite produzido pelas fêmeas experimentais, já que as variações nos componentes do leite (proteína, gordura e lactose) não acompanharam as variações nos níveis de CORT, tanto no grupo ACTH quanto no grupo Placebo (controle).

Podemos afirmar que não houve uma tendência na correlação entre níveis de CORT, qualidade e quantidade de leite.

CONCLUSÃO

Como não houve diferenças entre os componentes do leite, concluímos que apesar dos animais terem produzido CORT, não houve queda na qualidade tampouco na quantidade de leite produzido, portanto o estresse de curta duração não traz prejuízos produtivos ao animal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFRC. Technical Committee on Responses to Nutrients, Report n.10. The nutrition of goats. **Nutrition Abstracts and Reviews (series B)**, v.67, n.11, p.765-830, 1997.

AGUIAR, C.L.; CORÓ, F.A.G.; PEDRÃO, M.R. Componentes ativos de origem animal. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v.23, n.2, p.413-434, 2005.

ALI, S.; CLARK, A.J. Characterization of the gene encoding ovine β -lactoglobulin. **Journal of Molecular Biology**, v.199, n.3, p.415-426, 1988.

ANDRADE, P.V.D.; SOUZA, M.R.; BORGES, I.; PENNA, C. Contagem de células somáticas em leite de cabra. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 53, n. 3, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010209352001000300021&lng=&nrm=iso>. Acesso em 02 fev. 2009.

ANTUNES, A.J. **Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino**. Barueri: Manole, 2003. 135p.

ANUALPEC – **Anuário da Pecuária Brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio: Editora Argos, 2007. 368p.

ARCARO JÚNIOR, I.; ARCARO, J.R.P.; POZZI, C.R.; FAGUNDES, H.; MATARAZZO, S.V.; OLIVEIRA, C.A. Teores plasmáticos de hormônios, produção e composição do leite em sala de espera climatizada. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.7, n.2, p.350-354, 2003.

AXELROD, J.; REISINE, T.D. Stress hormones: their interaction and regulation. **Science**, v.224, n.4, p.452-459, 1984.

BADAWI, C. **Nutrição, Exercício Físico e Desempenho**, 2006. Disponível em: <http://nutrociencia.com.br/upload_files/arquivos/Artigo%202%20-20Nutri%C3%A7%C3%A3o,%20EF%20e%20Desempenho.doc>. Acesso em 10 jan. 2009.

BARBOSA, P.G.; GONÇALVES, H.C.; WECHSLER, F.S.; RESENDE, K.T.; SARTORI, D.R.S.; PAULI, L.F.C.; PULZ, L.M.; LOSI, T.C. Uso da somatotropina bovina recombinante – rbST como alternativa para a produção de leite de cabra na entressafra. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.5, p.2011-2023, 2002.

BARROS, N.N.; MESQUITA, R.C.M.; NETO, J.S.; ALVES, J.U., BARBIERI, M.E. Efeitos de níveis de energia sobre a produção de leite em cabras da raça Anglo-Nubiana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.27, n.1, p.119-130, 1992.

BORGES, C. H. P.; CORDEIRO, P. R. C.; BRESSLAU, S. Seasonal variation of goat milk composition and somatic cell count in southeastern Brazil. In: **International Symposium – The Future of the Sheep and Goat Dairy Sectors**. Zaragoza – Espanha, 2004.

BOUTINAUD, M.; GUINARD-FLAMENT, J.; JAMMES, H. The number and activity of mammary epithelial cells, determining factors for milk production. **Reproduction, Nutrition and Development**, v.44, n.5, p.499-508, 2004.

BOUTINAUD, M.; JAMMES, H. Potential uses of milk epithelial cells: a review. **Reproduction, Nutrition and Development**, v.42, n.2, p.133-147, 2002.

BRASIL, L.H.A.; WECHESLER, F.S.; BACCARI Jr., F.; GONÇALVES, H.C.; BONASSI, I.A. Efeitos do estresse térmico sobre a produção, composição química do leite e respostas termorreguladoras de cabras da raça Alpina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.6, p.1632-1641, 2000.

BRITO, M.A. **Variação dos perfis metabólico, hematológico e lácteo em ovinos leiteiros na Serra Gaúcha**. 2004. 59f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

BRITO, M.A.V.P; BRITO, J.R.F. **Qualidade do leite**. Juiz de Fora: Embrapa São Paulo/Tortuga, capítulo 3, 1998. 88p.

BROOM, D.M. Animal-welfare: concepts and measurements. **Journal of Animal Science**, v.69, n.10, p.4167-4175, 1991.

BURVENICH, C.; PAAPE, M.J.; HILL, A.W.; GUIDRY, A.J.; MILLER, R.H.; HEYNERMAN, R.; KREMER, W.D.; BRAND, A. Role of the neutrophil leukocyte in the local and systemic reactions during experimentally induced *E. coli* mastitis in cows immediately after calving. **Veterinary Q**, v.16, n.1, p.45-50, 1994.

CAMPOS, S. **Deficiência de lactase ou intolerância à lactose**. In: Medicina Avançada, 2003. Disponível em: <<http://www.drashirleydecampos.com.br/noticias/7159>>. Acesso em 15 jan. 2009.

CANAES, T.S. **Produção e composição do leite de cabras Alpinas submetidas ao transporte, à mudança de local de ordenha e à administração de ACTH**. 2007. 70f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

CAPUCO, A.V.; AKERS, R.M. Mammary involution in dairy animals. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v.4, n.2, p.137-144, 1999.

CASSATELLA, M.A. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. **Immunology Today**, v.16, n.1, p. 21-26, 1995.

CASTRO, A.P.B.M.; JACOB.C.M.A.; CORRADI, G.A.; ABDALLA, D.; GONÇALVES, R.F.F.; ROCHA, F.T.L.; FOMIN, A.B.F.; PASTORINO, A.C. Evolução clínica e laboratorial de crianças com alergia a leite de vaca e ingestão de bebida à base de soja. **Revista Paulista de Pediatria**, v.23, n.1, p.27-34, 2005.

CHAGAS, E.C.O. **Silagem de Maniçoba (*Manihot glaziovii* Muell Arg.) em dietas para cabras da raça Moxotó em lactação**. 2005. 89f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2005.

- CHANDAN, A. Aspectos nutricionais do leite de cabra. In: **5ª Conferência Internacional sobre as cabras**, 1992, 420p. p.399-418.
- CLARKSON, R.W.E.; WATSON, C.J. NF- κ B and apoptosis in mammary epithelial cells. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v.4, n.2, p.165-175, 1999.
- COBUCI, J.A.; EUCLYDES, R.F.; COSTA, C.N.; LOPES, P.S.; TORRES, R.A.; PEREIRA, C.S. Análises da persistência na lactação de vacas da raça Holandesa, usando produção no dia do controle e modelo de Regressão Aleatória. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.3, p.546-554, 2004.
- COLDEBELLA, A. **Contagem de células somáticas e produção de leite em vacas Holandesas confinadas**. Piracicaba, 2003. 99p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2003.
- CONCHA, C. Cell types and their immunological functions in bovine mammary tissues and secretions: a review of the literature. **Nord Veterinary Medicine**, v.38, n.5, p.257-272, 1986.
- COSTA, A. Leite caprino. In: **Um novo enfoque de pesquisa**, 2002 Disponível em: <<http://www.cnpsa.embrapa.br>>. Acesso em 25 nov. 2008.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Patologia estrutural e funcional**. 2ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1984. 1354p.
- CRAVEN, N. Generation of neutrophil chemoattractants by phagocytosing bovine mammary macrophages. **Research Veterinary Science**, v.35, n.3, p.310-317, 1983.
- CUNNINGHAM, J.G. A Glândula Mamária. In: **Tratado de Fisiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Cap.38, p.418-431. 580p.
- DEKKERS, J.C.M.; TEM HAG, J.H.; WEERSINK, A. Economic aspects of persistency of lactation in dairy cattle. **Livestock Production Science**, v.53, n.3, p.237-252, 1998.
- DELGADO, T.F.G. Produção leiteira em cabras da raça Saanen: Influência dos hormônios Cortisol e IGF-I. 2008. 91f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.
- DUVAUX-PONTER, C.; ROUSSEL, S.; TESSIER, J.; SAUVANT, D.; FICHEUX, C.; BOISSY, A. Physiological effects of repeated transport in pregnant goats and their offspring. **Animal Reserach**, v. 52, p. 553-566, 2003.
- ELVINGER, F.; NATZKE, R. P.; HANSEN, P. J. Interactions of Heat Stress and Bovine Somatotropin Affecting Physiology and Immunology of Lactating Cows. **Journal of Dairy Science**, v.75, n.2, p.449-462, 1992.
- ESCOBAR, C.J.; BASRUR, P.K.; GARTLEY, C.; LIPTRAP, R.M. A comparison of the adrenal cortical response to ACTH stimulation in Angora and non-Angora goats. **Veterinary Research Communications**, v.22, n.2, p.119-129, 1998.

ESPIE, W.E.; MULLAN, W.M.A. Microbiological aspects of goat milk in Northern Ireland. **Milchwissenschaft**, v.45, n.6, p.361-362, 1990.

FERRARI, C.K.B. Apoptose: a importância da maquinaria de morte celular no controle e na patogênese das doenças. **Revista de Ciências Médicas**, v.9, n.1, p.21-31, 2000a.

FERRARI, C.K.B. Free radicals, lipid peroxidation and antioxidants in apoptosis: implications in cancer, cardiovascular and neurological diseases. **Biologia**, v.55, p.581-590, 2000b.

FERRARI, C.K.B.; TORRES, E.A.F.S. Perspectivas da pesquisa em Biologia Molecular aplicada à Nutrição. **Interciencia**, v.27, n.11, p.592-598, 2002.

FREDEEN, A.H. Considerations in the milk nutritonal modifications of milk composition. **Animal Feed Science Technology**, v.59, n.1 p.185-197, 1996.

FULKERSON, W.J.; JAMIESON, P.A. Pattern of cortisol release in sheep following administration of synthetic ACTH or imposition of various stressor agents. **Australian Journal of Biology Science**, v.35, n.2, p.215 – 222, 1982.

FURTH, P.A. Mammary gland involution and apoptosis of mammary epithelial cells. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v.4, n.2, p.123-127, 1999.

GALIERO, G.; MORENA, C. The meaning of the somatic cell count in buffalo milk. **Bubalus bubalis**, n.4, p.26-27, 2000.

GARDNER, B. **Sobre a Intolerância à Lactose**. In: Semlactose – Convivendo em harmonia com a Intolerância à Lactose, 2007. Disponível em: <<http://www.semlactose.com/index.php/sobre-intolerancia-lactose/>>. Acesso em 15 jan. 2009.

GOMES, V.; DELLA LIBERA, A.M.M.P.; 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**, v.41, n.5, 2004. Disponível em <http://www.revistasusp.sibi.usp.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95962004000500008&lng=es&nrm=iso>.

GONZÁLEZ, F.H.D. Indicadores metabólico-nutricionais do leite. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; CAMPOS, R. Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil, 1., 2003, Porto Alegre. **Anais ...** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003. p.31-47.

GONZÁLEZ, F.H.D.; DÜRR, J.W.; FONTANELI, R.S. In: **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre, 2001. 72p.

GOREWIT, R.C.; SVENNERSTEN, K.; BUTLER, W.R.; UVNAS-MORBERG, K. Endocrine responses in cows milked by hand and machine. **Journal of Dairy Science**, v.75, n.2, p.443-448, 1992.

- GRAMINHA, C.V. RESENDE, K.T.; RIBEIRO, S.D.A. Estudo comparativo entre as curvas de produção real e a curva de produção teórica em cabras leiteiras. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 36, 1999, Porto Alegre. **Anais ...** Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1999. p.552-554.
- GREEN, K.A.; STREULI, C.H. Apoptosis regulation in the mammary gland. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.61, p.1867-1883, 2004.
- GRIVICICH, I.; REGNER, A. ROCHA, A.B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.53, n.3, p.335-343, 2007.
- GROSSMAN, M.; HARTZ, S.M.; KOOPS, W.P. Persistency of lactation yield: A novel approach. **Journal of Dairy Science**, v.82, n.10, p.2192-2197, 1999.
- GRUDTNER, V.S.; WEINGRILL, P.; FERNANDES, A.L. Aspectos da absorção no metabolismo do cálcio e vitamina D. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.37, n.3, p.143-151, 1997.
- GRZESIAK, T. O leite de cabra, leite do futuro para as crianças. In: Interesses nutritivos e dietéticos do leite de cabra, 1996, Niort. **Anais ...** Paris: INRA, 1997, 37p.
- GUIMARÃES, V.P.; RODRIGUES, M.T.; SARMENTO, J.L.R.; ROCHA, D.T. Utilização das funções matemáticas no estudo da curva de lactação em caprinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.2, p.535-543, 2006.
- HAENLEIN, G.F.W. **Goat milk somatic cell count situation on the United States.** Disponível em: <[http:// ag.udel.edu/extension/information/goatmgt/gm-11.htm](http://ag.udel.edu/extension/information/goatmgt/gm-11.htm)>. Acesso em 01 abril 2009.
- HARMON, R.J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, v.77, n.7, p.2103-2112, 1994.
- HOEBEN, D.; BURVENICH, C.; TREVISI, E.; BERTONI, G.; HAMANN, J.; BRUCKMAIER, R.M.; BLUM, J.W. Role of endotoxin and TNF-alpha in the pathogenesis of experimentally induced coliform mastitis in periparturient cows. **Journal of Dairy Research**, v.67, n.4, p.503-514, 2000.
- JAKOBSEN, J.H.; MADSEN, P.; JENSEN, J. et al. Genetic parameters for milk production and persistency for Danish Holstein estimated in random regression models using REML. **Journal of Dairy Science**, v.85, n.6, p.1607-1616, 2002.
- JARDIM, W.R. Criação de caprinos, 11 ed. São Paulo: Nobel, 1986.
- JENNESS, R. Composition and characteristics of goat milk: Review 1968-1979. **Journal of Dairy Science**, v.63, p.1605-1630, 1980.
- JENSEN, D.L.; EBERHART, R.J. Total and differential cell counts in secretions of the non-lactating bovine mammary gland. **American Journal of Veterinary Research**, v.42, n.5, p.743-747, 1981.

JONES G.M.; PEARSON, G.A.; CLABAUGH, G.A.; HEALD, C.W. Relationships between somatic cells counts and milk production. **Journal of Dairy Science**, v.67, n.8, p.1823-1831, 1984.

KARIN, J.; LOFTI, A. Studies on the milk composition of crossbreed Saanen goats. **Archive of the Faculty of Veterinary Medicine/Teheran University**, v.42, n.1, p.5-13, 1987.

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

KNIGHT, C. H.; PEAKER, M. Mammary development and regression during lactation in goats in relation to milk secretion. **Quarterly Journal of Experimental Physiology**, v.69, p.331-338, 1984.

KODA, Y.K.L.; BARBIERI, D. Alergia à proteína do leite de vaca. **Pediatria São Paulo (Revisões e Ensaios)**, v.7, p.62-66, 1984.

LAEVENS, H.; DELUYKER, H.; SCHUKKEN, Y.H.; DE MEULEMEESTER, L.; VANDERMEERSCH, R.; DE MULLENAERE, E.; DE KRUIF, A. Influence of Parity and Lactation Stage on the Somatic Cell Count in Bacteriologically negative dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.80, n.12, p.3219-3226, 1997.

Le JAOUEN, J.L. Characteristic and composition of goat's milk from zootechnical point of view and as regards its utilization. **II. Seminário Nacional de Ovinos e Caprinos**, 30 Nov. – 2 Dic. Maracaibo, Venezuela. 1972.

LEE, C.S.; WOODING, F.B.; KEMP, P. Identification, properties and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry cows secretions, colostrum and milk from normal cows. **Journal of Dairy Research**, v.47, n.1, p.39-50, 1980.

LEITE, H.P.; SARNI, R.S. Radicais livres, anti-oxidantes e nutrição. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v.18, n.2, p.87-94, 2003.

LUDWICK, T.M.; PETERSEN, W.E. A measure of persistency of lactation in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.26, n.5, p.439-445, 1943.

MACUHOVA, J.; TANCIN V.; KRAETZL W.D.; MEYER H.H.D.; BRUCKMAIER R.M. Inhibition of oxytocin release during repeated milking in unfamiliar surroundings: The importance of opioids and adrenal cortex sensitivity. **Journal of Dairy Research**, v.69, p.63–73, 2002.

MADUREIRA, K.M. **Contagem celular total e diferencial no leite e sangue de cabras híbridas no Estado de São Paulo**. 2006, 96p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2006.

MARNET, P. G.; NEGRÃO J. A. The effect of a mixed-management system on the release of oxytocin, prolactin, and cortisol in ewes during sucking and machine milking. **Reproduction, Nutrition and Development**, v.40, p.271-281, 2000.

MARNET, P.G.; MCKUSICK, B.C. Regulation of milk ejection and milkability in small ruminants. **Livestock Production Science**, v.70, n.1-2, p.125-133, 2001.

MARTINS, P.R.G. **Avaliação da qualidade do leite em diferentes sistemas de produção e meses do ano**. 2003. 61p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Pelotas/Rio Grande do Sul, Pelotas, 2003.

MAYER, H.K.; LEFCOURT, A.M. Failure of cortisol injected prior to milking to inhibit milk ejection in dairy cattle. **Journal of Dairy Research**, v.54, n.2, p.173-177, 1987.

MBA, A. U., BOYO, B.S. & OYENUGA, V.A. Studies on the milk composition of West African dwarf, Red Sokoto and Saanen goats at different stages of lactation. **Journal of Dairy Research**, v.42, p.217-226, 1975.

MEDEIROS, M.A. **Proteínas**. In: Tira Dúvidas – QuiProcura, 2004. Disponível em <<http://www.quiprocura.net/prot.htm>>. Acesso em 04 jan. 2009.

MILLER, J.K.; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E.; MADSEN, F.C. Oxidative stress, antioxidants and animal function. **Journal of Dairy Science**, v.76, n.10, p.2812-2823, 1993.

MIN, B. R.; TOMITA, G.; HART, S.P. Effect of subclinical intramammary infection on somatic cell counts and chemical composition of goats' milk. **Journal of Dairy Research**, v.74, n.2, p.204-210, 2007.

MOBERG, G. P. A model for assessing the impact of behavioral stress on domestic animals. **Journal of Animal Science**, v.65, n.5, p.1228-1235, 1987.

MORITZ, D. **Lactose**. In: Bromatologia dos Alimentos- Aula 2, 2008. Disponível em: <http://www.unisul.br/content/navitacontent_/userFiles/File/pagina_dos_cursos/Nutri_o_Grande_Florianopolis/Carboidratos/Aula_2A.pdf>. Acesso em 10 jan. 2009.

MÖSTL, E.; PALME, R. Hormones as indicators of stress. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.67-74, 2002.

MULLAN, N.A.; CARTER, E.A.; NGUYEN, K.A. Phagocytic and bactericidal properties of bovine macrophages from non-lactating mammary glands. **Research Veterinary Science**, v.28, n.2, p.160-166, 1985.

MÜLLER, E.E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil, 29, 2002, Maringá. **Anais ... Maringá-PR:UEM**, 2002. p.206-217.

NAAS, I.A.; ARCARO JÚNIOR, I. Influência de ventilação e aspersão em sistemas de sombreamento artificial para vacas em lactação em condições de calor. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.5, n.1, p.139-142, 2001.

NEGRÃO, J.A.; MARNET, P.G. Cortisol, adrenalin, noradrenalin and oxytocin release and milk yield during first milkings in primiparous ewes. **Small Ruminants Research**, v.47, n.1, p.69-75, 2003.

- NEGRÃO, J.A.; PORCIONATO, M.A.F.; De PASSILLÉ, A.M.; RUSHEN, J. Behavioural responses of heifers to ACTH injections. **Applied Animal Behaviour Science**, no prelo, 2006.
- NEGRÃO, J.A.; PORCIONATO, M.A.F.; De PASSILLÉ, A.M.; RUSHEN, J. Cortisol in saliva and plasma of cattle after ACTH administration and milking. **Journal of Dairy Science**, v.87, n.6, p.1713-1718, 2004.
- ÖSTENSSON, K.; HAGELTORN, M.; ASTRÖM, G. Differential cell counting in fraction-collected milk from dairy cows. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.29, p.493-500, 1988.
- OSTRENSKY, A. **Efeitos de ambiente sobre a contagem de células somáticas no leite de vacas da raça Holandesa no Paraná**. Curitiba. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, 1999.
- PAAPE, M.J.; BANNERMAN, D.D.; ZHAO, X.; LEE, J.W. The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. **Veterinary Research**, v.34, n.5, p.597-627, 2003.
- PAAPE, M.J.; MEHZARD, J.; ZHAO, X.; DETILLEUX, J.; BURVENICH, C. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. **Journal of Mammary Gland Biological Neoplasia**, v.7, n.2, p.109-121, 2002.
- PAAPE, M.J.; POUTREL, B.; CONTRERAS, A.; MARCO, J.C.; CAPUCO, A.V. Milk somatic cells and lactation in small ruminants. **Journal of Dairy Science**, v.84, E.Suppl., E237-E244, 2001.
- PARK, Y. Hypo-allergenic and therapeutic significance of goat milk. **Small Ruminant Research**, v.14, n.2, p.151-159, 1994.
- PEREIRA, A.R. **Contagem de células somáticas e características produtivas de vacas em lactação da raça Holandesa**. Piracicaba, 2000. 53p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2000.
- PEREZ, M.D.; CALVO, M. Interaction of beta-lactoglobulin with retinol and fatty acids and its role as a possible biological function for this protein: a review. **Journal of Dairy Science**, v.78, n.5, p.978-988, 1995.
- PERSSON, K.; LARSSON, I.; SANDGREN, C.H. Effects of certain inflammatory mediators on bovine neutrophil migration in vivo and in vitro. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.37, n.2, p.99-112, 1993.
- PETERS, R. R. Evaluating herd milk quality using DHI somatic cell counts. In: **Proceedings: Arizona Dairy Production Conference**, Tucson, 2002. p.57-73.
- PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. Mastitis: counter attack. **Babson Bros Co**, p.150, 1991.

PINEDA, M.H.; DOOLEY, M.P. McDonald's Veterinary Endocrinology and Reproduction. 4º ed., p. 175-203, 597. **Blackwell Publishing**, 1999.

POIATTI, M. L. **Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química do leite cru, pasteurizado e congelado de cabra**. 2001. 65p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

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. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.4, 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20611998000400014&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 15 jan. 2009.

PRESCOTT, S.C.; BREED. R.S. The determination of the number of body cells in milk by a direct method. **American Public Health Association**, v.20, n.3, p.663-664, 1910.

PRINA, A.P.M. **A fase preparatória do parto de caprinos da raça Saanen. Manifestações clínicas indicadoras da parição iminente e avaliação do perfil hormonal**. 2007. 144f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

QUEIROGA, R.C.R.E.; COSTA, R.G.; BISCANTINI, T.M.B.; MEDEIROS, A.N.; MADRUGA, M.S.; SCHULER, A.R.F. Influência do manejo do rebanho, das condições higiênicas da ordenha e da fase de lactação na composição química do leite de cabras Saanen. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.2, p. 430-437, 2007.

RAMOS, M.; JUÁREZ, M. The composition of ewe's and goat's milk. **IDF-Bulletin, Doc. N°140**, p.5-19, 1981.

RENAVILLE, R.; VAN EENAEME, C.; BREIER, B. H.; VLEURICK, L.; BERTOZZI, C.; GENGLER, N.; HORNICK, J. L.; PARMENTIER, I.; ISTASSE, L.; HAEZEBROECK, V.; et al. Feed restriction in young bulls alters the onset of puberty in relationship with plasma insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins. **Domestic Animal Endocrinology**, v.18, n.2, p.165-176, 2000.

RIBEIRO, A.C. **Estudo dos efeitos genéticos e de ambiente sobre características de importância econômica em caprinos da raça Saanen**. 1997. 133f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1997.

RIBEIRO, S.D.A. Os Caprinos. In: **Caprinocultura: Criação Racional de Caprinos**. São Paulo: Nobel, 1997. Cap.1, p.19. 311p.

RIOLLET, C.; RAINARD, P.; POUTREL, B. Cells and cytokines in inflammatory secretions of bovine mammary gland. **Adv Experimental Medicine Biology**, v.480, p.247-258, 2000.

RIOLLET, C.; RAINARD, P. POUTREL, B. Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. **Journal of Dairy Science**, v.84, n.5, p.1077-1084, 2001.

RODRIGUES, L.; SPINA, J.R.; TEIXEIRA, I.A.M.A.; DIAS, A.C.; SANCHES, A.; RESENDE, K.T. Produção, composição do leite e exigências nutricionais de cabras Saanen em diferentes ordens de lactação. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 28, n.4, p. 447-452, 2006.

ROSFJORD, E.C.; DICKSON, R.B. Growth factors, apoptosis, and survival of mammary epithelial cells. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v.4, n.2, p.229-237, 1999.

ROTA, A.M.; GONZALO, C.; RODRIGUEZ, P.L.; ROJAS, A.I.; MARTÍN, L.; TOVAR, J.J. Effects of stage of lactation and parity on somatic cell counts in milk of Verata goats and algebraic models of their lactation curves. **Small Ruminant Research**, v.12, n.2, p.211-219, 1993.

RUSHEN, J.; MUNKSGAARD, L.; MARNET, P.G.; DE PASSILÉ, A.M. Human contact and the effects of acute stress on cows at milking. **Applied Animal Behaviour Science**, v.73, p.1-14, 2001.

SARIKAYA, H. **Somatic cell populations in milk: Importance in mammary gland physiology and behaviour during technological processing**. 2006. 97f. Tese (Doutorado) – Facultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung and Umwelt Lehrstuhl für Physiologie, Technische Universität München, 2006.

SCHUTZ, M.M. et al. Variation of milk, fat, protein, and somatic cells for dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.73, n.2, p.484-493, 1990.

SILVA, V.C. Composição do leite caprino e manejo correto na ordenha. **Pubvet – Londrina**. v.2, n.35, 2008. Disponível em: <<http://www.pubvet.com.br/texto.php?id=344>>.

SOARES FILHO, G.; McMANUS, C.; MARIANTE, A.S. Fatores genéticos e ambientais que influenciam algumas características de reprodução e produção de leite em cabras no Distrito Federal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.1, p.133-140, 2001.

SPINA, J.R. **Efeito da ordem de lactação e exigências nutricionais para cabras Saanen**. 2003. 20 p. Trabalho de Graduação (Graduação em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

STEFANON, B.; COLITTI, M.; GIANFRANCO, G.; KNIGHT, C.H.; WILDE, C.J. Mammary apoptosis and lactation persistency in dairy animals. **Journal of Dairy Research**, v.69, p.37-52, 2002.

STELWAGEN, K.; VAN ESPEN, D.C.; VERKERK, G.A.; MCFADDEN, H.A.; FARR, V.C. Elevated plasma cortisol reduces permeability of mammary tight junctions in the

lactating bovine mammary epithelium. **Journal of Endocrinology**, v.159, p.173–178, 1998.

TANCIN, V.; HARCEK, L.; BROUCEK, J.; UHRINCAT, M.; MIHINA, S. Effect of suckling during early lactation and changeover to machine milking on plasma oxytocin and cortisol levels and milking characteristics in Holstein cows. **Journal of Dairy Research**, v.62, p.249-256, 1995.

TAYLOR, B.C.; KEEFE, R.G.; DELLINGER, J.D.; NAKAMURA, Y.; CULLOR, J.S.; STOTT, J.L. T cell populations and cytokine expression in milk derived from normal and bacteria-infected bovine mammary glands. **Cell Immunology**, v.182, n.1, p.68-76, 1997.

TEIXEIRA, N.M.; FREITAS, A.F.; BARRA, R.B.. Influência de fatores de meio ambiente na variação mensal da composição e contagem de células somáticas do leite em rebanhos no Estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.55, n.4, Aug.2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352003000400016&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 15 abril 2009.

TEKERLI, M.; AKINCI, Z.; DOGAN, I. et al. Factors affecting the shape of lactation curves of Holstein cows from the Balikesir province of Turkey. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.6, p.1381-1386, 2000.

THOMPSON, R.G. **Patologia geral veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. p.411.

TIAN, S.Z.; CHANG, C.J.; CHIANG, C.C.; PEH, H.C.; HUANG, M.C.; LEE, J.W.; ZHAO, X. Comparison of morphology, viability, and function between blood and milk neutrophils from peak lactating goats. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.69, n.1, p.39-45, 2005

TOSETTO, E. M. **Avaliação da adoção de tecnologias na produção de Leite caprino**. 2005. 58p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

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

VOUSINAS, L., PAPPAS, C. & KATSIARI, M. The composition of Alpine goat's milk during lactation in Greece. **Journal of Dairy Research**, v.57, p.41-51, 1990.

WANDER, A.E.; MARTINS, E.C. Viabilidade econômica da caprinocultura leiteira. **Anuário Brasileiro de Caprinos & Ovinos**, Uberaba: Agropecuária Tropical, 2008.

WILDE, C.J.; HENDERSON, A.J.; KNIGHT, C.H. Metabolic adaptations in goat mammary tissue during pregnancy and lactation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.76, p.289-298, 1986.

WILDE, C.J.; KNIGHT, C.H.; FLINT, D.J. Control of milk secretion and apoptosis during mammary involution. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v.4, n.2, p.129-136, 1999.

WITTMANN, S.L.; PFAFFL, M.W.; MEYER, H.H.; BRUCKMAIER, R.M. 5-Lipoxygenase, cyclooxygenase-2 and tumor necrosis factor alpha gene expression in somatic milk cells. **Milchwissenschaft**, v.57, n.1, p.63-66, 2002.

WOOD, P.D.P. Algebraic model of lactation curve in cattle. **Nature**, v.216, n.5111, p.164-165, 1967.

ZAMBOM, M.A.; ALCALDE, C.R.; MARTINS, E.N.; SANTOS, G.T.; MACEDO, F.A.F.; HORST, J.A.; VEIGA, D.R. Curva de lactação e qualidade do leite de cabras Saanen recebendo diferentes relações volumoso:concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.6, p.2505-2514 (supl.), 2005b.

ZAMBOM, M.A.; ALCALDE, C.R.; SILVA, K.T.; MACEDO, F.A.F.; SANTOS, G.T.; BORGHI, E.L.; BARBOSA, E.D. Ingestão, digestibilidade das rações e produção de leite em cabras Saanen submetidas a diferentes relações volumoso: concentrado na ração. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.6, p.2505-2514, 2005a.

ZENG, S.S.; ESCOBAR, E.N. Effect of parity and milk production on somatic cell count, standard plate count and composition of goat milk. **Small Ruminant Research**, v.17, n.3, p.269-274, 1995.

ZENG, S.S.; ESCOBAR, E.N. POPHAM, T. Daily variations in somatic cell count, composition, and production of Alpine goat milk. **Small Ruminant Research**, v.26, n.3, p.253-260, 1997.