

INFLUÊNCIA DA FASE DE LACTAÇÃO NAS PROTEÍNAS DO SORO LÁCTEO DE VACAS JERSEY

Raquel Fraga e Silva Raimondo, Samantha Ive Miyashiro,
Eduardo Harry Birgel Junior

Centro de Pesquisa e Diagnóstico de Enfermidades de Ruminantes (CPDER) - Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Av. Profº Dr. Orlando Marques de Paiva 87 Cidade Universitária Armando Salles de Oliveira 05508-900 São Paulo – SP.
E-mail: ehbirgel@usp.br (autor correspondente)

PALAVRAS-CHAVE: Bovinos, eletroforese, lactação, soro lácteo.

ABSTRACT

INFLUENCE OF LACTATION PHASE ON WHEY PROTEINS OF JERSEY COWS

To assess the influence of lactation phase on whey proteins, we collected 48 milk samples from 12 Jersey cows before milking. They were divided into three groups: early lactation (70 to 120 days); middle of lactation (121 to 202 days); and end of lactation (214 to 358 days). The whey was obtained by milk coagulation with renin. Furthermore, serum proteinogram was determined by biuret method and protein digest was fractionated by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). There was a gradual and significant decrease in whey components during the lactation period, such as serum albumin, lactoferrin, immunoglobulins, beta-lactoglobulin, and alpha-lactalbumin. We recommend the following mean values for whey proteins of Jersey cows: Total whey protein = 640 mg/dL; Lactoferrin = 40 mg/dL; Albumin = 30 mg/dL; Immunoglobulin heavy chain = 40 mg/dL; Immunoglobulin light chain = 80 mg/dL; Beta-lactoglobulin = 230 mg/dL; Alpha-lactalbumin = 140 mg/dL.

KEYWORDS: Bovine, electrophoresis, lactation, whey protein.

INTRODUÇÃO

As proteínas do leite são, na sua grande maioria, sintetizadas na glândula mamária, durante a galactopoiese, por células secretoras alveolares, ou, em menor quantidade, são de origem plasmática (SCHALM et al., 1971). Dentre as frações protéicas sintetizadas nos tecidos mamários, a caseína, do leite representa 80 % de toda a proteína (FONSECA & SANTOS, 2000). Neste grupo de proteínas sintetizadas na mama, também, devem ser

destacadas algumas proteínas presentes no soro lácteo como as frações α -lactoalbumina e β -lactoglobulina.

SCHALM et al. (1971) haviam relatado que a mamite determinava uma diminuição dos teores de caseína, porém que os teores lácteos de proteína total não sofriam influência significativa, devido ao aumento das proteínas do soro em decorrência as alterações de permeabilidade. Apesar disso, até recentemente, a constituição protéica do leite não era considerada como uma importante característica no diagnóstico das doenças da glândula mamária, porém os resultados obtidos por SANT'ANA (2004) evidenciaram a importância da determinação do teor de proteína total do leite e seu fracionamento como parâmetro para o diagnóstico das mamites.

O aumento dos teores de proteína total com diminuição dos teores de caseína e aumento dos teores de proteínas de origem plasmática no soro lácteo representa sintoma evidente de alteração da glândula mamária (SCHALM et al., 1971). Nesses casos patológicos, comprovou-se, aumento dos teores de proteínas de origem plasmática (albumina e imunoglobulinas) no soro lácteo em decorrência das alterações na permeabilidade dos vasos devido ao processo inflamatório (SCHALM et al., 1971; SANT'ANA, 2004).

Dentre os fatores responsáveis pelas alterações na composição protéica do leite merecem destaque não somente aqueles decorrentes das mamites, mas também, a influência de diversos fatores, como os relacionados à fase da lactação.

MATERIAL E MÉTODOS

A fim de se estabelecer os valores de referencia, e a influencia da fase de lactação nas proteínas do soro de leite de vacas da raça Jersey foram utilizadas 48 amostras de soro lácteo obtidas de mamas de animais criados em sistema semi-extensivo com alimentação baseada em volumoso, suplementada com silagem e concentrado comercial onde adotava-se o sistema de ordenha mecânica. As amostras foram colhidas na sala de ordenha, antes da ordenha, a seleção dos animais foi baseada no exame clínico e no histórico, sendo descartados aqueles que apresentaram episódios recorrentes de mamite, alterações das características macroscópicas do leite, ou alterações na palpação da mama, que pudessem estar relacionadas à existência de um processo inflamatório agudo ou crônico (BIRGEL, 2004).

Após os procedimentos de preparo dos animais para a ordenha, seguia-se a colheita, de cerca de 3 ml de leite em tubo de plástico estéreis para o exame microbiológico, precedido por assepsia da extremidade do teto, utilizando-se compressas de gaze embebidas em álcool 70%,

e em seguida foram colhidos 50 ml em frascos de plástico para a avaliação do proteinograma. As amostras foram acondicionadas em caixas de isopor refrigeradas com gelo reciclável durante o transporte, até o momento de serem analisadas.

Primeiramente as amostras colhidas de maneira estéril foram submetidas ao exame microbiológico, semeadas em meio de ágar-sangue de carneiro e incubadas a 37°C, sendo realizadas leituras com 24, 48 e 72 horas de incubação. Todas as 48 amostras utilizadas tiveram resultado negativo no exame microbiológico, sendo divididas em três grupos de acordo com a fase de lactação que se encontravam: 16 amostras no terço inicial da lactação (entre 70 e 120 dias de lactação); 16 amostras no terço médio de lactação (entre 121 e 202 dias de lactação) e 16 amostras no terço final de lactação (entre 214 e 358 dias de lactação).

O soro lácteo foi obtido através da coagulação do leite pela adição de 5 % de solução de renina utilizando técnica sugerida por SANT'ANA & BIRGEL (2003), sendo as amostras turvas de soro lácteo submetidas a processo de centrifugação durante 20 minutos a 13.000 rpm. Após o estabelecimento de curva-padrão, os teores de proteína total do soro lácteo foi determinado pela técnica do biureto, utilizando-se 3 ml do reativo de biureto e 50ul de amostra de soro lácteo. A absorbância da amostra foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de ondas igual a 555 nm, sendo utilizada a seguinte fórmula para cálculo dos teores de proteína: Proteína no soro lácteo = (Absorbância - 0,005) / 0,050.

Para o fracionamento das proteínas foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida (12 %) contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme as recomendações de FAGLIARI & SILVA (2002). Ao final do procedimento as frações protéicas foram separadas e quantificadas em: proteínas com peso molecular acima de 81 KDaltons, lactoferrina (81 KDaltons), albumina de origem plasmática (68 KDaltons), imunoglobulinas de cadeia leve (26 KDaltons), imunoglobulinas de cadeia pesada (56 KDaltons), β -lactoglobulina (16 KDaltons) e α -lactoglobulina (13 KDaltons).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de proteína do soro de leite de vacas da raça Jersey considerando as 48 amostras foi em média 640 ± 250 mg/dl valores próximos aos encontrados por LARSON & KENDALL (1953) que estudaram o fracionamento do soro lácteo de vacas holandesas através da técnica de eletroforese em papel e obtiveram teores de proteínas do soro de leite que variavam de 700 a 1.100 mg/dl. Entretanto, os presentes resultados discordaram, por serem

maiores dos apresentados por SCHALM et al. (1971), equivalentes a 540 mg/dl, todavia eles utilizaram técnica semi-quantitativa, de menor sensibilidade. Os resultados da presente pesquisa foram menores do que os encontrados por SANT´ANA (2004) que utilizou a técnica do biureto realizado em analisador bioquímico automático LIASYS, e encontrou para vacas Jersey teores médios de proteína do soro lácteo iguais a $1.010,31 \pm 111,34$ mg/dl.

Os teores de proteínas do soro lácteo encontrados na presente pesquisa foram influenciados pela fase de lactação. No terço inicial da lactação os valores médios foram iguais a 800 ± 140 mg/dl e no terço médio iguais a 730 ± 210 mg/dl valores estes significativamente maiores do que os observados no terço final da lactação 380 ± 150 mg/dl. AULDIST et al. (1995) avaliaram dois rebanhos leiteiros na Austrália e encontraram resultados controversos, em um dos rebanhos afirmaram que o teor da proteína do soro lácteo não apresentou variações, que pudessem ser atribuídas à influência do estágio de lactação, no segundo rebanho, as concentrações de caseína e de proteína total no leite foram maiores no início e no terço final da lactação. SANT´ANA (2004) também avaliou a influencia da fase de lactação na proteína do soro lácteo, porém a constituição dos grupos experimentais da referida autora levou em consideração amostras colhidas durante a fase colostrar e verificou que os valores nesta fase foram maiores do que os encontrados no terço inicial, médio e final da lactação.

O fracionamento das proteínas do soro de leite das 48 amostras permitiu que as seguintes frações protéicas fossem caracterizadas: proteínas com peso molecular acima de 80 KDaltons ($10,0 \pm 15,0$ mg/dl), Lactoferrina ($40,0 \pm 22,0$ mg/dl), Albumina sérica ($30,0 \pm 19$ mg/dl), Imunoglobulinas cadeia pesada ($40,0 \pm 24,0$ mg/dl) imunoglobulinas cadeia leve ($80,0 \pm 64$ mg/dl) (imunoglobulinas divididas em duas cadeias, pesada e leve decorrentes do uso do 2-mercaptoetanol utilizado no tampão de preparação das amostras para a eletroforese), Beta-lactoglobulina ($230,0 \pm 87$ mg/dl) e Alfa-lactoalbumina ($140,0 \pm 70,0$ mg/dl).

Os teores médios de Lactoferrina encontrados na presente pesquisa ($40,0 \pm 22,0$ mg/dl) discordaram, por serem maiores, dos apresentados por SCHANBACHER & LARRY SMITH (1974) - 35 mg/dl e por WELTY et al. (1975) - 20 mg/dl ($63,95 \pm 28,30$ mg/dl) e se aproximam dos valores médios obtidos por SANT´ANA (2004) que obtiveram valores médios iguais a $63,95 \pm 28,30$ mg/dl. A lactoferrina é influenciada pela fase de lactação, pois seus valores diminuem significativamente no terço final da lactação chegando a $20,0 \pm 10,0$

mg/dl, informações estas que discordam de SANT´ANA (2004) que não observou influencia do estágio de lactação nos teores de lactoferrina.

Os teores médios de albumina séria ($30,0 \pm 19$ mg/dl) encontrados na presente pesquisa são semelhante aos encontrados por SCHALM et al. (1971) que utilizou técnica semi-quantitativa pouco específica, obteve o valor de 40 mg/dl, e discordam de SANT´ANA (2004) que obteve valor médio de albumina sérica igual a $70,70 \pm 21,06$ mg/dl. Com o evoluir da lactação os teores de albumina sérica diminuíram no terço final da lactação observações estas que não foram mencionadas por SANT´ANA (2004).

Os teores de imunoglobulinas encontrados no presente estudo como citado anteriormente, são divididas em duas cadeias em decorrência da técnica utilizada, cadeia pesada ($40,0 \pm 24,0$ mg/dl) imunoglobulinas cadeia leve ($80,0 \pm 64$ mg/dl) portanto, houve dificuldade para compará-los aos relacionados na literatura, pois a maioria dos pesquisadores utilizou técnicas imunológicas e apesar de SANT´ANA (2004) ter utilizado a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida a autora obteve apenas uma fração única de imunoglobulinas. Os teores de imunoglobulinas diminuem com o evoluir da lactação, concordando com SCHALM et. al., (1971) e SANT´ANA (2004).

Os teores médios de Beta-lactoglobulina, $230,0 \pm 87$ mg/dl, foram menores dos que o encontrados por SANT´ANA (2004) $538,89 \pm 72,88$ em vacas da raça Jersey. E diminuem com o evoluir da lactação (início $280,0 \pm 60$ mg/dl; meio $260,0 \pm 60$ mg/dl e final $150,0 \pm 70,0$ mg/dl), SANT´ANA (2004) observou que os teores desta referida proteína foi maior na fase colostrar e final da lactação (respectivamente: $726,10 \pm 291,20$ mg/dl e; $668,24 \pm 92,60$ mg/dl).

As médias encontradas no presente estudo para alfa-lactoalbumina foram iguais a $140,0 \pm 70,0$ mg/dl valores estes que concordam com os encontrados por SANT´ANA (2004) $142,85 \pm 28,57$ para vacas da mesma raça. A fase de lactação influencia os teores de alfa-lactoalbumina que diminuem com o evoluir da lactação, observações que concordam com SANT´ANA (2004) que encontrou maiores valores na fase inicial da lactação (fase colostrar e primeiro terço da lactação), a seguir observou uma diminuição (segundo terço da lactação) e uma nova diminuição dos resultados na fase final da lactação, concordando com as conclusões apresentadas por LARSON & KENDALL (1953) e LEVIEUX & OLLIER (1999).

CONCLUSÕES

Os valores médios de referencia para as proteínas do soro lácteo de vacas da raça Jersey são: Proteína total do soro lácteo – 640,0 mg/dl; 80 KDaltons - 10,0 mg/dl; Lactoferrina - 40,0 mg/dl; Albumina sérica - 30,0 mg/dl; Imunoglobulinas cadeia pesada - 40,0 mg/dl; Imunoglobulinas cadeia leve 80,0 mg/dl; Beta-lactoglobulina - 230,0 mg/dl e Alfa-lactoalbumina 140,0 mg/dl.

As proteínas do soro lácteo de vacas da raça Jersey diminuem com o evoluir da lactação.

AGRADECIMENTOS

A FAPESP, pelo auxílio pesquisa nº 2008 / 04109-9 e bolsa de doutorado processo nº nº 06/61571-1.

REFERÊNCIAS

AULDIST, M. J.; COATS, S.; ROGERS, G. L.; MC DOWELL, G. H.; Changes in the composition of milk from healthy and mastitic dairy cows during the lactation cycle. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v. 35, n. 4, 427-436, 1995.

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

FAGLIARI J. J.; SILVA, S. L. Hemograma e proteinograma plasmático de equinos hígdos acometidos por abdômen agudo, antes e após laparotomia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 54, n. 6, p. 559-586, 2002.

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

LARSON, B. L.; KENDALL, K. A. Protein production in the bovine daily production of the specific milk proteins during the lactation period. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 40, n. 3, p. 377, 1957.

LEVIEUX, D.; OLLIER, A. bovine immunoglobulins G, beta-lactoglobulin, alfa-lactoalbumin and serum albumin in colostrums and milk during the early post partum period. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 66, n. 3, p. 421-430, 1999.

SANT'ANA, V. A. C. **Proteinograma do leite de vacas: padrões e variabilidade**. 2004. 161 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SANT'ANA, V. A. C.; BIRGEL, E. H. Obtenção do soro lácteo para o fracionamento das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida. In: CONGRESSO

LATINOAMERICANO DE BUIATRIA. 9, CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA. 5 E CONGRESSO NORDESTINO DE BUIATRIA. 3. 2003, Salvador. **Anais...** Salvador: Associação Brasileira de Buiatria, 2003. p.31.

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

SCHANBACHER, F. L.; LARRY SMITH, K. Formation and role of unusual whey proteins and enzymes: relation to mammary function. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 58, n. 7 p. 1048-1062, 1974.

WELTY, F. K.; LARRY SMITH, K.; SCHANBACHER, F. L.; Lactoferrina concentration during involution of bovine mammary gland. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 9, n. 2. p. 224-231, 1975.