KAMILA REIS SANTOS

**Modelo de risco para mastite no pós-parto: aspectos hematológicos e
bioquímicos**

São Paulo
2016

KAMILA REIS SANTOS

Modelo de risco para mastite no pós-parto: aspectos hematológicos e bioquímicos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:
Clínica Médica

Áreas de concentração
Clínica Veterinária

Orientador:
Prof^a. Dr^a. Alice Maria Melville Paiva Della Libera

São Paulo
2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3315
FMVZ

Santos, Kamila Reis
Modelo de risco para mastite no pós-parto: aspectos hematológicos e bioquímicos / Kamila Reis Santos. -- 2016.
97 f. il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profª Drª Alice Maria Melville Paiva Della Libera.

1. Glândula mamária. 2. Secagem. 3. Período de transição. 4. Resposta imune.
5. Vacas leiteiras. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Modelo de risco para mastite no pós-parto: Aspectos hematológicos e bioquímicos", protocolado sob o CEUA nº 9945030214, sob a responsabilidade de **Alice Maria Melville Paiva Della Libera e equipe; Kamila Reis Santos; Camila de Freitas Batista; Heloisa Godoi Bertangnon; Renata Caminha Gomes** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMZV) em reunião de 17/12/2014.

We certify that the proposal "Risk model for mastitis in postpartum: hematological and biochemical Aspects", utilizing 30 Bovines (30 females), protocol number CEUA 9945030214, under the responsibility of **Alice Maria Melville Paiva Della Libera and team; Kamila Reis Santos; Camila de Freitas Batista; Heloisa Godoi Bertangnon; Renata Caminha Gomes** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of São Paulo (CEUA/FMZV) in the meeting of 12/17/2014.

Vigência da Proposta: de 03/2012 a 08/2014

Área: Clínica Médica Veterinária

Procedência: Animais provenientes de estabelecimentos comerciais

Espécie: Bovinos

sexo: Fêmeas

idade: 2 a 3 anos

N: 30

Linhagem: Holandês PB

Peso: 400 kg

Resumo: O presente estudo objetiva avaliar as alterações na resposta imune e no período de transição e associá-las a incidência da mastite, assim como avaliar a adoção de medidas de controle da mastite dada pela terapia de vaca seca e o uso de selantes internos de tetos na incidência da mastite no período pós-parto. Desta forma, serão utilizadas 30 vacas que serão divididas uniformemente em três grupos, a saber: animais que receberão terapia de seca a base de cefalônio anidro, animais que receberão selante de tetos a base de subnitrato de bismuto e animais que não receberão nenhum tratamento (controle). Amostras de colostro e de leite serão coletadas para o exame bacteriológico, contagem automática de células somáticas, contagem diferencial de leucócitos, California Mastitis Test, e dos constituintes do leite - proteínas, lactose, gordura, sólidos totais. Ademais, serão coletadas amostras de sangue para a avaliação do metabolismo oxidativo de neutrófilos, e quantificação de imunoglobulinas.

São Paulo, 28 de março de 2016

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SANTOS, Kamila Reis

Título: **Modelo de risco para mastite no pós-parto:** aspectos hematológicos e bioquímicos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATORIAS

Dedico este trabalho aos meus pais, Valéria e Francisco, que sempre apoiaram meus sonhos, nunca me desampararam nos momentos mais difíceis, e nunca me deixaram desistir dos meus sonhos, eles sabem que o caminho percorrido até aqui foi longo e com obstáculos, cheio de dúvidas e lágrimas, mas ao meu lado, me ajudaram a superar todos.

Dedico este trabalho especialmente ao meu Padrinho Célio, que sempre esteve presente nos momentos de conquistas da minha vida, e dessa vez não será diferente, tenho certeza que ele está olhando por mim, de um lugar muito especial, vibrando por mais essa vitória.

AGRADECIMENTOS

À Deus,

Primeiramente, por sempre me dar forças e ajudar a superar todos os obstáculos, me guiando pelo caminho do bem, por ter me dado a oportunidade de aprender tanto nesta vida com pessoas tão maravilhosas.

Aos Meus Pais,

Que são meus alicerces, que me ajudaram a me tornar a pessoa que sou hoje, e por sempre terem me apoiado em todas as decisões e momentos de minha vida, muitas vezes desistindo dos próprios sonhos para tornar o meu realidade. A minha Mãe Valéria, que com sua amorosidade, me ensina todos os dias o caminho do amor, e a me tornar uma pessoa melhor, a ver a vida e as pessoas sempre pelo lado bom, ser exemplo de honestidade e humildade. Ao meu pai Francisco, também conhecido como Kevin, para os íntimos, por ser meu exemplo

maior de força, pela sua amorosidade e intensa preocupação com todos os nossos passos, por todas as palavras de motivação, por todas as vontades realizadas, além de todos os galhos quebrados, como idas à FAPESP e ao banco pagar as minhas contas. Rsrs

Às minhas Irmãs,

Jéssica e Thais, que sempre aturaram meus ataques de estresses, e seguraram a onda nos momentos mais difíceis, cada uma delas com sua personalidade diferente contribuíram para meu crescimento durante esse processo, muito obrigada pelas louças lavadas e roupas penduradas no meu lugar.

À minha Orientadora/Mãe/Guia espiritual,

Eu sempre acreditei na máxima de que tudo que acontece na nossa vida tem um propósito, e que cada pessoa que passa por ela é única, e quando eu entrei pra essa família, com uma SUPER MÃE, eu tive certeza que estava no lugar certo. Não tenho palavras pra agradecer pelos ensinamentos diários, tanto profissionais quanto pessoais, pela sua confiança no meu trabalho, e na minha dedicação, obrigada pelos puxões de orelha e pelos conselhos, acho que nunca vou poder retribuir por tudo já conquistado ao seu lado.

À equipe Della Libera, minha Família Científica,

Camila de Freitas Batista, Renata Caminha Gomes, Heloisa Godói Bertagnon, Maíara García Blagitz, Jessyca Beraldi Bellinazzi, Rodrigo Malzoni, agradeço a cada um de vocês, pois, aprendi demais com todos, e se hoje eu cheguei até aqui foi porque cada um de vocês contribuiu para isso acontecer, e guardo com muito carinho vocês todos dentro do meu coração

Ao Ferdinando

Se não fosse pela sua paciência, sapiência, e boa vontade comigo, talvez não tivesse chegado até aqui, muito obrigado pelos momentos divertidos, e por aguentar meus momentos de crise, por tudo o que você fez por mim até hoje....você realmente é o cérebro.

À Soraia Diniz

Pelas inúmeras vezes que me socorreu com a estatística, pela paciência, e boa vontade e pela brilhante ideia, juntamente com o Ferdinando, dos modelos estatísticos, foi a cereja do bolo, segundo Della Líbera.

Aos amigos da Pós

Ronaldo Gomes Gargano, Fábio Parra Sellera, Carolina dos Anjos, Bruna Stanigher, Bruno Toledo, Sílvia Novo, Camila Baccili, Cynthia Costa, Vinicius Baldecin, Juliana Reis, Gabriela Reis, Juliana Bombardelli, Caroline Seino, Carolina Shecaira, Eduardo Marques, Francisco Leonardo, Rejane Sousa, Juliana Junqueira Moreira, Thalissa Rezende, Priscila Marques, Aline Morgado, por todos os momentos divertidos vividos, todos os churrascos, festas, todas as trocas de experiências e ideias no meio do corredor, todos os perrengues vividos em aula, as preparações de referatas...enfim, o que seria da pós graduação se não fossem os colegas? Vocês ajudaram a tornar toda essa experiência mais leve.

Às meninas do laboratório

Clara Satsuki Mori, Claudia Regina Stricagnolo, Maria Helena da Silva Pelissari, Samantha Ive Miyashiro, Carmen Silvia Ribeiro, Edina

Santana dos Santos, Creide Donizete Costa, por toda ajuda durante todos esses anos.

Às secretárias do Departamento de Clínica Médica

Silvana Rossi Guedes, Maria Aparecida de Freitas e Carolina Aroma pela ajuda durante esses anos.

À Adelaide Ortega

Muito obrigada por toda ajuda durante esses anos, todos os galhos quebrados, e pelos caminhos encurtados.

Aos Funcionários da Clínica de Bovinos e Pequenos Ruminantes

Luís Rodrigues, Edson Diogo, Francisco de Souza, Edilson Duque pela ajuda, pelo carinho, pelas músicas e comidinhas, pelo cuidado com os animais.

Aos Professores do Departamento de Clínica Médica

Archivaldo Reche Junior, Carla Bargi Belli, Carlos Eduardo Larsson, Denise Saretta Schwartz, Enrico Lippi Ortolani, Fábio Celidônio Pogliani, Fernando José Benesi, Lílian Gregory, Marcia Gomes, Marcia Mery Kogika, Maria Helena Matiko Akao Larsson, Maria Claudia Araripe Sucupira, Mitika Kurubayashi Hagiwara, Raquel Yvonne Arantes Bacarin, Silvia Regina Ricci Lucas, Viviani Gomes e Wilson Roberto Fernandes, obrigada pelos ensinamentos e pela convivência.

À Elza Faquim

Pela ajuda, e esclarecimento de dúvidas com toda a parte de formatação da dissertação.

Aos órgãos de fomento

CAPES que me forneceu bolsa de estudos durante.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Pelo financiamento da bolsa (Processo FAPESP (2014/06995-7), e pelo auxílio FAPESP (2012/08982-4), possibilitando a realização deste trabalho.

A todos os meus amigos

Alessandra Luzzi, Ana Carolina, Carol Fontanetti, Iolanda Machado, Nathy Bottino, Soraya Franco, Katia Abe, Gustavinho, Thiago Souza, Shoiti Ito, Jefferson Duarte, que me aguentam a quase 20 anos, me apoiando nos melhores e piores momentos, sabem do amor dedicado a este trabalho, meu muito obrigado por existirem na minha vida.

Aos amigos de Uberaba

Erika Manzan, Marcela Barbosa, Lya Lemos, Nacim Hajar, Bruno Goltz, que se tornaram irmãos, obrigada por todos os momentos vividos, todas as histórias guardadas, e por mais esquecida que eu seja, eles sempre me lembram o quanto importante e amada sou.

EPIGRAFE

Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer.

Albert Einstein

RESUMO

SANTOS, K. R. **Modelo de risco para mastite no pós-parto**: aspectos hematológicos e bioquímicos. [Risk model for mastitis postpartum: hematological and biochemical aspects]. 2014. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Objetivou-se identificar parâmetros bioquímicos, hematológicos e imunológicos, sistêmicos e locais, associados a modelo de risco de mastite bovina, da secagem ao final do período de transição da lactação subsequente, de vacas submetidas a antimicrobiano e selante na secagem. Foram utilizadas 34 vacas da raça Holandesa, divididas em três grupos: grupo controle (GC; n = 13); grupo antimicrobiano (GA; n = 10) composto animais que receberam antimicrobiano intramamário; grupo selante (GS; n = 11), composto por animais que receberam selante intramamário. Foram coletadas amostras de leite e sangue onde avaliou-se hemograma, metabolismo oxidativo de neutrófilos (NBT), imunoglobulinas, bioquímica, e CMT, contagem de células somáticas, isolamento microbiológico do colostro e leite e imunoglobulinas do leite nos 60 dias que antecederam o parto (M1), no dia do parto (M2), três, sete, 15, 21, 30 dias pós-parto (M3, M4, M5, M6 e M7). Os dados foram analisados pelo software Stata utilizando um modelo de regressão logística. As variáveis foram analisadas primeiro individualmente para verificar o significado e em seguida, em combinação, para avaliar o efeito das variáveis individuais. Na primeira fase da análise, empregou-se modelo logístico para cada variável relacionada com os achados clínicos, com valores de P inferiores a 0,20 foram considerados como uma variável selecionada e passada para a próxima fase da análise. Dentro o modelo final, foram usadas variáveis selecionadas na primeira fase para desenvolver um modelo logístico multivariado em que as variáveis com $P \leq 0.05$ foram retidas no modelo final. Foi possível identificar que alterações nos parâmetros, proteína, albumina e fibrinogênio, servem de biomarcadores associados à mastite bovina. Alterações metabólicas específicas e características do período de transição, nos parâmetros sanguíneos, sobrepoem o efeito dos protocolos de secagem empregados e, sugere-se que o perfil sistêmico da vaca o periparto está associado à mastite.

Palavras-chave: Glândula mamária. Secagem. Período de transição. Resposta imune. Vacas leiteiras.

ABSTRACT

SANTOS, K. R. **Risk model for mastitis postpartum:** hematological and biochemical aspects. [Modelo de risco para mastite no pós-parto: aspectos hematológicos e bioquímicos]. 2015. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Objective identify biochemical, hematological and immunological systemic and local, associated with Bovine Mastitis risk model, drying at the end of the transitional period of the subsequent lactation cows treated with antimicrobial and sealant to dry. 34 cows were used the Dutch race, divided into three groups: control group (GC; n = 13); antimicrobial Group (GA; n = 10) animals receiving antimicrobial intramamário; sealant Group (GS; n = 11), composed of animals that received intramamário sealant. Milk samples were collected and evaluated blood where blood count, neutrophil oxidative metabolism (NBT), immunoglobulins, biochemistry, and CMT, somatic cell count, microbiológico isolation of colostrum and milk and milk immunoglobulins in the 60 days preceding childbirth (M1) on the day of delivery (M2), three, seven, 15, 21, 30 days postpartum (M3, M4, M5, M6 and M7). Data were analyzed by the software Stata using a logistic regression model. The variables were analyzed individually to check the meaning and then, in combination, to evaluate the effect of individual variables. In the first phase of the analysis, logistic model was used for each variable related to the clinical findings, with P values less than 0.20 were considered as a variable selected and passed to the next stage of analysis. In the final model, selected variables were used in the first phase to develop a multivariate logistic model in which the variables with $P \leq 0.05$ were retained in the final model. It was possible to identify changes in the parameters, protein, albumin and Fibrinogen, serve as biomarkers associated with Bovine Mastitis. Specific metabolic changes and characteristics of the transitional period, blood parameters, overlapping the effect of drying employees and protocols, it is suggested that the systemic profile the periparto cow is associated with mastitis.

Keywords: Mammary gland. Drying. Transition period. Immune response. Dairy cows.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Média e erro padrão para parâmetros hematológicos sanguíneos das vacas utilizadas no presente estudo no período de transição - São Paulo - 2016.....	45
Tabela 2 -	Média e erro padrão para hematócrito sanguíneos das vacas utilizadas no presente estudo no período de transição - São Paulo - 2016.....	46
Tabela 3 -	Média e erro padrão para CHCM sanguíneos das vacas utilizadas no presente estudo no período de transição - São Paulo - 2016.....	46
Tabela 4 -	Média e desvio padrão da porcentagem de leucócitos sanguíneos das vacas utilizadas no presente estudo no período de transição - São Paulo - 2016.....	47
Tabela 5 -	Média e erro padrão da porcentagem de linfócitos totais das vacas utilizadas no presente estudo no período de transição - São Paulo - 2016.	48
Tabela 6 -	Médias e desvio padrão dos valores absolutos de eosinófilos sanguíneos das vacas utilizadas no presente estudo no período de transição - São Paulo - 2016.	49
Tabela 7 -	Média e erro padrão da proteína total das vacas utilizadas no presente estudo no período de transição - São Paulo – 2016.	50
Tabela 8 -	Média e erro padrão da proteína total das vacas utilizadas no presente estudo no período de transição - São Paulo – 2016.	50
Tabela 9 -	Médias e erro padrão das proteínas sanguíneas das vacas utilizadas no presente estudo no período de transição - São Paulo – 2016.....	51
Tabela 10 -	Média e erro padrão da atividade das enzimas hepáticas sanguíneas das vacas utilizadas no presente estudo no período de transição - São Paulo – 2016.....	52
Tabela 11 -	Média e erro padrão para glicose sanguíneo das vacas utilizadas no presente estudo no período de transição - São Paulo - 2016.....	53

Tabela 12 - Média e erro padrão para BHB e ácidos graxos não esterificados sanguíneos das vacas utilizadas no presente estudo no período de transição - São Paulo - 2016.	54
Tabela 13 - Média e erro padrão para lipidograma sanguíneo das vacas utilizadas no presente estudo no período de transição - São Paulo - 2016.....	55
Tabela 14 - Média e erro padrão para cálcio sanguíneo das vacas utilizadas no presente estudo no período de transição - São Paulo – 2016.....	56
Tabela 15 - Média e erro padrão para IgM sérica das vacas utilizadas no presente estudo no período de transição - São Paulo - 2016.....	57
Tabela 16- Média e desvio padrão para perfil renal das vacas utilizadas no presente estudo no período de transição - São Paulo - 2016.....	58
Tabela 17 - Isolamento de patógenos causadores de mastite do leite de todos os quartos mamários das vacas utilizadas no presente estudo no período de transição - São Paulo - 2016.	59
Tabela 18 - Média e erro padrão dos escores obtidos pelo exame de CMT realizado em vacas no período de transição - São Paulo - 2016.....	62
Tabela 19 - Média e erro padrão dos escores obtidos pelo exame de contagem automática de células somáticas realizado em vacas submetidas a tratamento de secagem no período de transição - São Paulo - 2016.....	63
Tabela 20 - Média e erro padrão dos escores obtidos pelo exame de contagem automática de células somáticas realizado em vacas submetidas a tratamento de secagem no período de transição - São Paulo - 2016.....	63
Tabela 21 - Média e erro padrão dos escores obtidos pela determinação de CCS microscópica do leite de vacas no período de transição - São Paulo - 2016	64
Tabela 22- Média e erro padrão dos escores obtidos pelo exame de contagem automática de células somáticas realizado em vacas no período de transição - São Paulo - 2016	64

Tabela 23 - Média e erro padrão da contagem diferencial de leucócitos do leite de vacas no período de transição - São Paulo - 2016	65
Tabela 24 - Média e erro padrão dos escores obtidos pelo escore do exame microbiológico do leite de vacas no período de transição - São Paulo – 2016.....	66
Tabela 25 - Média e erro padrão da dosagem das imunoglobulinas do leite de vacas no período de transição - São Paulo – 2016.....	67
Tabela 26 - Variáveis elegíveis para entrar no modelo final de regressão logística ($P \leq 0,20$) baseadas no modelo de escore de contagem de células somáticas - São Paulo – 2016.	69
Tabela 27 - Modelo final de regressão logística ($P \leq 0,05$) das variáveis associadas à alta contagem de célula somática no período de transição - São Paulo – 2016.....	69
Tabela 28 - Variáveis elegíveis para entrar no modelo final de regressão logística ($P \leq 0,20$) baseadas no isolamento de patógenos causadores de mastite bovina - São Paulo – 2016.	70
Tabela 29 - Modelo final de regressão logística ($P \leq 0,05$) das variáveis associadas ao isolamento de patógenos causadores de mastite bovina - São Paulo – 2016.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Relação entre a demanda de energia, reservas de energia, e a associação metabólica entre ácidos graxos não esterificados (NEFA) e β -hidroxibutirato (BHB).....	24
Figura 2 -	Adaptação metabólica durante o período de transição.	27

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	PERÍODO DE TRANSIÇÃO	21
2.1.1	Glicose e Insulina	24
2.1.2	IMUNIDADE NO PERÍODO DE TRANSIÇÃO	28
2.2	MASTITE	31
3	OBJETIVO	36
4	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	ANIMAIS UTILIZADOS	37
4.2	COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE	38
4.3	ANÁLISES DAS AMOSTRAS DE SANGUE	38
4.3.1	Hemograma	38
4.3.2	Teste do tetrazólio nitroazul	39
4.3.4	Perfil metabólico, concentração sérica de cálcio e fósforo, e função hepática e renal	39
4.3.5	Fibrinogênio	40
4.3.6	Insulina	40
4.3.7	Quantificação de imunoglobulinas	40
4.4	COLETA DAS AMOSTRAS DE LEITE	41
4.5	ANÁLISES DAS AMOSTRAS DE LEITE	41
4.5.1	Exame bacteriológico	41
4.5.2	CMT	42
4.5.3	Contagem diferencial de leucócitos	42
4.5.4	CCS microscópica	43
4.5.5	CCS automática	43
4.5.6	Quantificação de imunoglobulinas	43
4.6	Análise estatística	44
5	RESULTADOS	45
5.1	PARÂMETROS SANGUÍNEOS	45
5.1.1	Hemograma	45
5.1.1.1	Leucograma	47
5.1.2	Proteinograma	50

5.1.3	Perfil Hepático.....	52
5.1.4	Perfil Metabólico.....	53
5.1.5	Cálcio e fósforo	56
5.1.6	Parâmetros imunológicos	57
5.1.7	Perfil Renal.....	57
5.2	PARÂMETROS DO LEITE.....	59
5.2.1	Exame microbiológico	59
5.2.2	CMT	61
5.2.3	Contagem de células somáticas	62
5.3	MODELOS DE REGRESSÃO LOGÍSTICA	68
6	DISCUSSÃO	71
6.2	PROTEINOGRAMA	72
6.3	PERFIL METABÓLICO	73
6.4	CÁLCIO	75
6.5	FUNÇÃO HEPÁTICA.....	76
6.6	FUNÇÃO RENAL	77
6.7	PARÂMETROS LOCAIS (GLÂNDULA MAMÁRIA).....	78
6.8	LEUCÓCITOS MONONUCLEARES E POLIMORFONUCLEARES	81
6.9	ABORDAGEM DO MODELO DE RISCO	83
7	CONCLUSÃO	88
	REFERÊNCIAS	89

1 INTRODUÇÃO

É indiscutível o desafio de produzir racionalmente dentro de áreas econômicas estratégicas como a pecuária leiteira (EMBRAPA, 2015). A necessidade de produzir racionalmente e atender às tendências internacionais de prudência no emprego de fármacos, (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 2013), torna vital superar os gargalos fisiológicos que o paciente bovino apresenta da fase de secagem ao início da lactação subsequente, período que abriga o particular desafio do período de transição, quando adaptações fisiológicas, imunológicas e metabólicas, (DRACKLEY, 1999; INGVARTSEN; ANDERSEN, 2000; SORDILLO; MAVANGIRA, 2014), aumentam a probabilidade de doenças, (GOFF; HORST, 1997; INGVARTSEN; ANDERSEN, 2000; MOYES et al., 2009), dentre as quais, a mastite.

A mastite bovina merece destaque pelo expressivo prejuízo ao produtor, compromete a qualidade do ciclo de produção que se inicia (RUEGG, 2003; SCHUKKEN et al., 2010) e, apesar de ser um processo patológico predominantemente localizado, interações sistêmicas e mesmo comorbidades, são cada vez mais investigadas (RUEGG, 2012). É fato, admitido e fundamentado, que a afecção predomina no início da lactação e a higidez em que a fêmea transpõe o período de transição tem relação direta com o desencadeamento de doenças, entre as quais a mastite (BARKEMA et al., 1998; DRACKLEY; OVERTON; DOUGLAS, 2001; MANN et al., 2015; SORDILLO, 2016).

A hipótese do presente estudo é que um modelo de risco baseado em parâmetros hematológicos e bioquímicos contribui para o diagnóstico da mastite no pós-parto, e o protocolo de secagem interfere nessa dinâmica. Isto por que, a maior parte dos estudos em mastite estão voltados para a presença ou ausência da doença e para existência de patógenos causadores da doença (LESCOURRET; COULON; FAYE, 1995), o desenvolvimento de um modelo de risco por meio de um modelo estatístico de regressão nos permite caracterizar a relação entre os parâmetros bioquímicos e hematológicos e determinar qual a variável e respectiva relação/importância para o desenvolvimento, diagnóstico e controle no período de transição.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PERÍODO DE TRANSIÇÃO

O período de transição, também conhecido como periparto é compreendido pelas três semanas que antecedem o parto até três semanas pós-parto (DRACKLEY, 1999; INGVARTSEN; ANDERSEN, 2000; SORDILLO; MAVANGIRA, 2014). Neste período há grande estresse para os animais, por ocorrerem alterações fisiológicas (FAGLIARI, et al., 1998; MEGLIA et al., 2005), hematológicas (KANEKO, 2008; SAUT; BIRGEL JUNIOR, 2012, TODOROVIC; DAVIDOVIC, 2012 SMITH, 2014), metabólicas (POGLIANI; BIRGEL JÚNIOR, 2007; MOREIRA et al., 2015) e imunológicas que acarretam em maior susceptibilidade a doenças infecciosas como mastite, metrite, além de alterações como deslocamento de abomaso, cetose e retenção de secundinas (INGVARTSEN; MOYES, 2012).

O primeiro desafio enfrentado por estas vacas é o aumento na demanda de energia neste período para o feto e para produção de leite. Com o progressivo desenvolvimento fetal, há restrição de espaço na cavidade abdominal e o animal passa a consumir menor quantidade de matéria seca (MS) e consequentemente de nutrientes para a manutenção do animal (BELL, 1995; GOFF; HORST, 1997; INGVARTSEN; ANDERSEN, 2000; CASTILLO et al., 2005). O período marcado por uma série de adaptação do período seco para o lactante passa por um processo denominado de homeoretico Bauman e Currie (1980), com uma série de elementos chave, interligados imunobiologia da glândula mamária.

Uma demanda susceptível refere-se ao cálcio (GOFF; KIMURA; HORST, 2002; GOFF, 2008), necessário para muitas funções orgânicas, inclusive a produção de leite no referido período de secagem, final de gestação e lactação subsequente, especialmente no período de transição a amplitude da demanda requer rápidas mudanças metabólicas e endócrinas (DRACKLEY, OVERTON, DOUGLAS, 2001). Associadas à diminuição da ingestão de MS, podem desenvolver um quadro de hipocalcemia, que pode ser causada por alterações no metabolismo deste, associado à lactação, e quantidades insuficientes de paratormônio (PTH) e 1,25-dihydroxycholecalciferol, a vitamina D, responsável por absorver o cálcio no intestino (DEGARIS; LEAN, 2008).

A alta demanda energética geralmente vem associada da redução no consumo de MS, o que acarreta em balanço energético negativo (BEN) (INGVARTSEN; ANDERSEN, 2000; DUFFIELD et al., 2009; ALVARENGA et al., 2015; WEBER et al., 2015). A condição de BEN eleva a concentração de ácidos graxos não esterificados (AGNE) no plasma, bem como as concentrações de β -hidroxibutirato (BHB). Há diminuição nas concentrações de glicose, insulina, fator de crescimento semelhante a insulina do tipo I (IGF-1) levando ao maior acúmulo de triglicerídeos no fígado e diminuindo o escore corporal (ADEWUYI; GRUYS; VAN EERDENBURG, 2005). Quando o animal entra em BEN o organismo dispara mecanismos compensatórios na tentativa de restabelecer a homeostase (figura1). O principal mecanismo é denominado lipomobilização, que consiste em degradar a gordura armazenada no tecido adiposo e liberá-la na circulação em forma de AGNE, para manter os níveis de glicose, sendo que parte desses AGNE vão direto para glândula mamária, e outra parte vai para o fígado, onde serão metabolizados (DRACKLEY et al., 2014; KURPIŃSKA et al., 2015; NEWMAN et al., 2016) (Figura 1). Segundo Drackley (1999), a excessiva mobilização de gordura do tecido adiposo pode aumentar a incidência de problemas no parto. No fígado, o AGNE pode seguir por diferentes vias metabólicas e: 1) ser completamente oxidado no ciclo do ácido tricarboxílico em adenosina trifosfato (ATP); 2) transportado para fora do fígado por lipoproteínas de muito baixa densidade para outros tecidos; 3) ser transformada em corpos cetônicos via β -oxidação ou por oxidação peroxissomal e serem liberados na corrente sanguínea para serem utilizados como fonte de energia para outros tecidos; 4) ser estocado novamente no fígado em forma triglicerídeos (TG) (Figura 1) (GRUNFELD; PALLADINO, 1990; KUSHIBIKI et al., 2000, 2002; POGLIANI; BIRGEL JÚNIOR, 2007; OSPINA et al., 2013).

Segundo De Koster e Opsomer (2013), o aumento nos níveis de AGNE na circulação ocorre devido a diminuição da lipogênese e o aumento da lipólise mediada, pelo menos em parte, pela redução na concentração de insulina neste período.

Em casos onde há intensa mobilização de AGNE para o fígado pode correr uma sobrecarga no órgão levando ao armazenamento hepático de TG, o que e subsequentemente acarretar em quadro de esteatose (INGVARTSEN; MOYES, 2015). No processo de oxidação o AGNE é reduzido a dois carbonos e convertido em acetilcoenzima A (acetil-CoA), e somado ao oxalacetado, entra no ciclo de Krebs resultando em ATP e CO_2 (Figura 1). Quando não há oxalato suficiente para conversão do AGNE, o acetil-CoA entra em outras vias metabólicas, e pode ser transformado em corpos cetônicos, como BHB, que podem ser

utilizados como fonte de energia por outros tecidos como coração e rim (Figura 1) (DRACKLEY, 1999).

A utilização do AGNE e do BHB tem sido amplamente empregada como marcadores de BEM e para o aumento do risco de desenvolvimento de doenças como a mastite (CONTRERAS; SORDILLO, 2011; OSPINA et al., 2013; MANN et al., 2016).

Segundo Mcart et al. (2013) é importante saber qual a frequência com que uma população de animais é afetada por determinada doença, e existem maneiras de se calcular essa frequência, e uma delas é dividindo o número de animais que desenvolveram a doença pelo número total de animais que compõe o ambiente, a isso é dado o nome de risco de incidência. A aplicação desta metodologia serve para rastrear as concentrações séricas de AGNE e BHB em propriedades com alta incidência de problemas metabólicos no período de transição, pois segundo Leblanc (2010) concentrações de AGNE acima de 0,4 mmol/L nas semanas que antecedem ao parto, aumentam o risco de desenvolvimento de deslocamento do abomaso, e retenção de secundinas, e a diminuição das taxas de concepção (ROWLANDS; LITTLE; KITCHENHAM, 1977; SCHRICK et al., 2001; PICCIONE et al., 2011). Contudo, concentrações séricas de BHB entre 1,2 e 1,4 mmol/L aumentam o risco de desenvolvimento de metrite, cetose clínica e de mastite.

As alterações endócrinas estão associadas ao processo homeorrético e tem relação com as alterações metabólicas, os principais hormônios envolvidos nesse processo são a insulina, o glucagon, a somatotoprina e o cortisol (DRACKLEY; OVERTON; DOUGLAS, 2001). A somatotropina está relacionada com a liberação do hormônio do crescimento (GH), que tem um receptor específico no fígado (GHR), e que reduz a secreção de IGF-1, e dessa forma regulam alterações metabólicas como a estimulação de lipólise, e inibem a captação de glicose pelos adipócitos. Com o aumento na síntese de leite no período final da gestação para a colostrogênese, mesmo com BEN, há uma redução na expressão do GHR pelo fígado, diminuindo a síntese de IGF-1. Isso resulta em redução do *feedback* negativo do IGF-1 com a secreção do GH, elevando a lipomobilização (NIKOLIĆ et al., 2003; MENDONÇA et al., 2013). Já o glucagon afeta o metabolismo das vacas neste período pela gliconeogênese através de estímulo da conversão de propionato e lactato em glicose. Os glicorticoides também aumentam a lipólise, e conseqüentemente as concentrações de glicose na circulação. Geralmente, observa-se aumento de sua concentração na circulação cerca de três dias antes do parto, sendo seu pico no dia do parto, e geralmente voltam a cair de três a cinco dias pós-parto (DRACKLEY; OVERTON; DOUGLAS, 2001; DE KOSTER; OPSOMER, 2013).

Figura 1 - Relação entre a demanda de energia, reservas de energia, e a associação metabólica entre ácidos graxos não esterificados (NEFA) e β -hidroxibutirato (BHB)

Fonte: Adaptado de Ospina et al. (2013)

2.1.1 Glicose e Insulina

A demanda por glicose e energia cresce de duas a três vezes no período de transição, e o fígado tem que se adaptar rapidamente para poder produzir glicose e dar suporte à produção de leite e processar o AGNE proveniente da mobilização de gordura (DRACKLEY; OVERTON; DOUGLAS, 2001).

Segundo De Koster e Opsomer (2013), ruminantes diferentemente dos monogástricos que obtêm glicose da absorção intestinal, dependem da gliconeogênese hepática e renal para manter os níveis de glicose na circulação. As cadeias curtas de ácidos graxos que são processadas no rúmen dão origem aos ácidos propionato, acetato e butirato que são os principais responsáveis pela gliconeogênese, sendo que a ação de cada um deles muda ao longo da lactação dependendo da alimentação, balanço energético e mobilização de tecidos (DRACKLEY, 1999).

A obtenção de glicose pelo organismo ocorre por duas diferentes vias, a glicogenólise e a gliconeogênese. A glicogenólise tem menor importância, pois o glicogênio que fica armazenado no fígado é rapidamente consumido no período de maior demanda. Contudo, a gliconeogênese é a principal forma de obtenção de glicose pelos ruminantes, e é regulada por hormônios como a insulina, responsável por regular os níveis de glicose no sangue, pelo glucagon, que ajuda a manter os níveis de glicose no sangue pela quebra de glicogênio hepático, a somatotropina, diminui a utilização de glicose pelas células e aumenta a utilização de gordura para produção energia pelas células através da quebra de proteínas para que sejam transformadas em glicose pelo fígado, levando por isso ao aumento da glicemia (DRACKLEY; OVERTON; DOUGLAS, 2001).

Segundo Seal e Raynolds (1993), a maior parte da glicose obtida no processo de gliconeogênese em ruminantes deriva do propionato de 32 a 73%, de 10 a 30% dos aminoácidos e 15% do lactato. O propionato deriva da fermentação ruminal e do intestino grosso, tendo sua origem em dietas ricas em concentrado. Sua melhor utilização ocorre no período do início da lactação e BEN, quando o fígado passa por alterações melhorando a eficiência na produção de glicose, mas em condições homeorreticas com alimentação balanceada e balanço energético positivo também ocorre a modulação dessa relação (DRACKLEY; OVERTON; DOUGLAS, 2001; HOFFMAN et al., 2001; SILVESTRE et al., 2011; CHAPINAL et al., 2012; TODOROVIĆ; DAVIDOVIĆ, 2012).

A glicogênese derivada dos aminoácidos tem grande contribuição na produção de energia de ruminantes. Os principais aminoácidos que contribuem são a alanina e a glutamina, que respondem por 60% do potencial gliconeogênico de todos os aminoácidos, derivam de dietas ricas em proteínas, enquanto a lisina e leucina são cetogênicas (DRACKLEY; OVERTON; DOUGLAS, 2001; MANN et al., 2015).

O transporte da glicose é feito através de difusão passiva por moléculas transportadores de glicose denominadas GLUT, e se dá basicamente pelas diferenças de concentração do meio extracelular para o meio intracelular, este transporte também ocorre através de um sistema sódio-dependente, chamado de transporte de glicose sódio-dependente (SGLT) onde ocorre diferença de concentração de sódio nas células epiteliais do intestino e tubulares do rim (SALTIEL; KAHN, 2001).

Existem 13 diferentes formas de GLUT, sendo as mais comuns GLUT1, molécula expressa em todos os tecidos ao longo do corpo que é responsável pela captação de glicose basal é a GLUT 4, responsável pela captação de glicose estimulada através da insulina, principalmente nos tecidos do músculo esquelético, tecido adiposo e coração, seu aumento

nas membranas das células induzem a insulina a redução de glicemia na circulação (SALTIEL; KAHN, 2001).

A glândula mamária é responsável pelo consumo de 50 a 85 % da glicose consumida por todo corpo, sendo esta demanda maior no período de lactação quando comparado ao período seco. Para produzir um litro de leite são necessárias 72 g de glicose (MANN et al., 2016). A captação de glicose para glândula mamária é mediada pelo GLUT1, GLUT8, GLUT12, SGLT1 e SGLT2 (DE KOSTER; OPSOMER, 2013).

A insulina é o hormônio responsável por regular a concentração de glicose no organismo, em monogástricos, que a absorvem no intestino, enquanto nos ruminantes é proveniente da digestão ruminal (DE KOSTER; OPSOMER, 2013). Ela é secretada pelas células β do pâncreas quando há aumento nas concentrações de glicose na circulação.

O efeito da insulina no fígado é diminuir a liberação de glicose para a circulação com efeito inibitório na gliconeogênese e glicogenólise. Este efeito inibitório da insulina na gliconeogênese ocorre de duas maneiras, uma através da inibição de enzimas chave no mecanismo gliconeogênico, outra por meio de redução de glicogênio disponível que influencia os tecidos periféricos, como demonstrado pela Figura 2 (DE KOSTER; OPSOMER, 2013).

Ao mesmo tempo em que, a insulina diminui a gliconeogênese, ela aumenta a utilização de propionato como substrato para gliconeogênese. Esse processo pode ser explicado pelo efeito inibitório da insulina no catabolismo da proteína, glicose, e triglicerídeos e efeito estimulatório do anabolismo da proteína, glicose, e triglicerídeos, e ainda por diminuir a concentração de aminoácidos, lactado e glicerol da circulação. (INGVARTSEN; ANDERSEN, 2000; DE KOSTER; OPSOMER, 2013).

A resistência à insulina é definida como a condição em que concentrações normais de insulina induzem menor resposta biológica nos tecidos sensíveis a ela. (DE KOSTER; OPSOMER, 2013). Nos quadros de resistência à insulina durante o período de transição os principais mecanismos com funções alteradas são a captação de glicose pelo músculo esquelético e tecido adiposo, lipogênese e lipólise no tecido adiposo, gliconeogênese no fígado, e o metabolismo de proteína no músculo esquelético (Figura 2) (DE KOSTER; OPSOMER, 2013).

A vaca desenvolve resistência à insulina como mecanismo para manter os níveis de glicose para o feto e para glândula mamária, uma vez que os níveis de glicose estão muito baixos, o organismo secreta maior quantidade de insulina na tentativa de compensar essa falta, elevando os níveis de glicose na corrente, e tecidos adjacentes (DRACKLEY, 1999).

Em humanos a presença do $\text{TNF-}\alpha$ está ligada a obesidade à resistência a insulina, o que aumenta a mobilização de gordura, o mesmo fato é associado aos animais em período de transição. Os aumentos nas concentrações de $\text{TNF-}\alpha$ podem bloquear a sinalização do mediador de insulina, aumentando a disponibilidade de glicose através da maior mobilização de AGNE, como demonstrado na Figura 1 (SORDILLO; RAPHAEL, 2013).

Figura 2 - Adaptação metabólica durante o período de transição

Fonte: (adaptado de SORDILLO; RAPHAEL, 2013).

Nota: Existe aumento na demanda de glicose para o começo da lactação. O balanço energético negativo ocorre como resultado do aumento na demanda da glicose e a diminuição do consumo de matéria seca. Diminuição na concentração sanguínea de glicose resulta em concomitante queda na concentração de insulina. A queda nas concentrações de insulina leva à liberação de ácidos graxos não esterificados (AGNE) dos tecidos adiposos através da ativação das lipases. O aumento do AG serve como fonte de Energia que ajuda a conservar a glicose para produção de leite. Quando as concentrações de insulina sobem devido a mobilização de gordura, as taxas de AGNE são subreguladas por causa da redução da ação da enzima insulina-dependente na lipase. Contudo, quando há lipomobilização intensa, excessivo acúmulo de AGNE pode interferir aumentando a expressão de fator de necrose tumoral ($\text{TNF-}\alpha$). Uma hipótese para o aumento na expressão de $\text{TNF-}\alpha$ pode interferir com a redução da insulina dependente na atividade da lipase e aumento na concentração plasmática de AGNE

2.1.2 Imunidade no período de transição

O período de transição é uma rede onde todos os sistemas do organismo estão interligados e trabalhando com único objetivo, o de manter o feto viável e a produção colostro e posteriormente de leite. Como todos esses sistemas funcionam em conjunto, às vezes um sobressai aos demais e ir os demais, e irá desequilibrar como no caso do sistema imune. A debilidade do sistema imune neste período tem componentes fisiológicos contudo, como dito anteriormente a glicose é a principal fonte de energia, inclusive para o sistema imune, onde é responsável por estimular a produção e a diferenciação de células brancas sanguíneas, melhora a quimiotaxia além da capacidade fagocítica e microbicida dos neutrófilos (PAAPE et al., 2003; INGVARTSEN; MOYES, 2015).

A função primordial do sistema imune é de prevenir a entrada de patógenos no organismo, eliminar as infecções existentes e reestabelecer as funções normais dos tecidos (SORDILLO, 2016). Esta defesa é feita por duas linhas gerais, a dos sistemas inato e adquirido, que atuam rapidamente frente a uma invasão mobilizando células e substâncias que bloqueiam e minimizam os danos. Entretanto, a imunidade adquirida que atua quando o sistema imune inato não é capaz de combater os microrganismos invasores, esse produz células de memórias, tornando sua resposta contra os agentes mais específica, tornando o sistema imune mais eficiente (TIZARD, 2014).

O sistema imune inato é ativado quando um microrganismo consegue ultrapassar a barreira física, que é composta pela pele, muco, ou tampão de queratina no caso do teto, e ativam os receptores de padrão de reconhecimento (PRR) de células sentinelas localizadas por todo corpo (TIZARD, 2014). Os *toll like* (TLR) são exemplos mais conhecidos de PRR, e são capazes de reconhecer uma grande variedade de padrões associados a patógenos (SORDILLO, 2016). Quando são expostos aos microrganismos, os TLR ativam genes que levam à síntese e secreção de três principais citocinas, o TNF- α , a interleucina-1 (IL-1) e a interleucina-6 (IL-6) (TIZARD, 2014). As citocinas são um grupo de proteínas que podem ser produzidas por células do sistema imune ou não, e são elas as responsáveis por iniciar a cascata da inflamação (SORDILLO, 2016).

Os neutrófilos fazem parte da primeira linha de ação contra os microrganismos, eles compõem o que chamamos de leucócitos polimorfonucleares (PMN), onde ainda fazem parte os eosinófilos e os basófilos. Os leucócitos PMN migram através da corrente sanguínea por um processo denominado diapedese, para o sítio de inflamação, se tornando a população

predominante no local. Após o início deste processo os macrófagos residentes juntamente com os neutrófilos iniciam a fagocitose para eliminação do agente invasor, e durante esse processo há produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO) (PESSOA et al., 2012; TIZARD, 2014).

A imunidade adquirida é ativada quando a inata não consegue combater totalmente os agentes invasores, e falha na sua eliminação. Sua resposta é mais lenta, porém sua eficiência é superior à inata, às vezes são necessários dias para se montar uma reposta frente à um estímulo (SORDILLO, 2016). Para que ocorra uma resposta imune adquirida, os patógenos precisam ser degradados no interior das células, e seu fragmento deve ser associada ao complexo de histocompatibilidade (MHC), pois é essa molécula que vai apresentar antígenos aos linfócitos (TIZARD, 2014).

Os linfócitos T são subdivididos em linfócitos T auxiliares, que secretam citocinas como interleucina-2 (IL-2), interferon- γ (IFN- γ), e células T citotóxicas, que reconhecem e eliminam células infectadas com patógeno, além de danificar células que podem aumentar a susceptibilidade à novas infecções, e os linfócitos B, que se diferenciam em células produtoras de anticorpos, como IgG1, IgG2 e IgM (DETILLEUX et al., 1995; GOMES et al., 2011; VERWEIJ; KOETS; EISENBERG, 2014; GELSINGER et al., 2015).

Durante o período de transição há uma imunossupressão inerente que envolve tanto a resposta imune inata quanto a adquirida, associado com alterações metabólicas e endócrinas que geram prejuízos ainda maiores à função imune, como por exemplo, a redução da atividade dos neutrófilos, e diminuição na proliferação de linfócitos (INGVARTSEN; MOYES, 2015). A maior incidência de enfermidades está relacionada ao período pós-parto, já caracterizado pela imunossupressão e pelo próprio fato do parto, da colostrogênese e da galactopoiese estarem associadas ao desenvolvimento de processos inflamatórios (BRADFORD et al., 2015). Assim como a glicose é primordial para o desenvolvimento fetal e para a produção de leite ela é a fonte de energia utilizada pelos leucócitos PMN ativos, macrófagos e linfócitos durante a inflamação, ela estimula a proliferação e diferenciação dos leucócitos além de incrementar a quimiotaxia e a fagocitose dos neutrófilos (INGVARTSEN; MOYES, 2012). Além disso, também é a principal fonte de energia para os monócitos, peças-chaves da imunidade inata Eger et al., (2016), estas dão origem aos macrófagos, cuja capacidade fagocítica, a produção de IL-1 β e a polarização de macrófagos depende diretamente da disponibilidade de glicose (EGER et al., 2016). Também existem dentro dos leucócitos PMN as chamadas “ilhas” de glicogênio associadas a grânulos bactericidas que são utilizadas para destruir as bactérias (PAAPE et al., 2003).

O aumento na demanda por oxigênio durante o período de transição é associado ao aumento na produção de ERO, devido à alta demanda metabólica, porém, a deficiência de antioxidantes para oxidar esse ERO produzido resulta em estresse oxidativo e consequentemente imunossupressão (SORDILLO; AITKEN, 2009).

Segundo Detilleux et al. (1995), a capacidade de fagocitar bactérias opsonizadas aumenta no período do parto, enquanto a produção de ERO fica comprometida. Isso ocorre devido à relação inversa com a reserva de energia, ou seja, se o neutrófilo gasta menos energia fagocitando uma bactéria opsonizada, enquanto que para produção de ERO é necessário um gasto muito maior de energia.

Como citado por (DRACKLEY, 1999; SORDILLO, CONTRERAS e AITKEN, 2009 E MANN et al. 2015), a grande demanda de energia no pós-parto e redução dos níveis de glicose, mobilização lipídica e produção de corpos cetônicos, especialmente BHB, influencia negativamente a atividade dos neutrófilos, diminuindo a quimiotaxia e fagocitose, bem como a produção de bastonetes (INGVARTSEN; MOYES, 2015). Sabe-se que o AGNE influencia o sistema imune, embora em menor grau quando comparado ao do BHB, e os mecanismos pelo qual isso ocorre ainda não são bem estabelecidos. Em modelo humano e em roedores observou-se que ácidos graxos insaturados tem efeito negativo sobre a resposta imune Lee et al. (2001), enquanto em bovinos ácidos graxos saturados podem estimular TLR (SORDILLO; AITKEN, 2009).

Moyes et al. (2009) justifica que a quimiotaxia diminui quando se depara com altas concentrações de BHB, pois a migração de leucócitos é dependente de glicose, e estas células não utilizam corpos cetônicos como fonte de energia suplementar. Segundo Franklin, Young e Nonnecke (1991), quando são encontradas concentrações séricas de BHB acima de 3,3 mmol/L *in vitro*, há inibição da proliferação de linfócitos, causando redução destas células na circulação, a presença de outros corpos cetônicos, como acetoacetato e acetona também podem interferir na proliferação de linfócitos, mas em menor escala do que o BHB.

Animais com quadros de cetose subclínica estão mais susceptíveis a doenças como a mastite devido ao impacto que o BHB tem na função dos leucócitos (SORDILLO E MAVANGIRA, 2014), e quando nos deparamos com concentrações de BHB séricas acima de 1,4 mmol/L, há diminuição na capacidade de produção de ERO (HOEBEN; HEYNEMAN; BURVENICH, 1997).

Assim como as de BHB, altas concentrações de AGNE (acima de 2 mmol/L) diminuem a viabilidade de células PMNs e consequentemente aumentam a porcentagem de

necrose Scalia et al. (2006) além de também interferirem na síntese de interferon- γ (IFN γ) e secreção IgM em linfócitos, enfraquecendo a resposta imune (LACETERA et al., 2004).

Também foi descrito a relação entre a ação do IGF-1 na imunidade através da regulação da proliferação celular e programação celular, além do incremento da linfopoiese e a granulopoiese (KOOIJMAN, COPPENS, HOOGHE-PETERS, 2002). Por outro lado, a presença de GH e cortisol está associada à diminuição na resposta proliferativa de leucócitos periféricos das três semanas que antecedem ao parto, até três semanas pós-parto (MALLARD et al., 1998).

2.2 MASTITE

A transição de um estado prenhe, não lactante para não prenhe e lactante expõe o animal a grandes desafios metabólicos, hormonais e imunológicos (GOFF; HORST, 1997; DRACKLEY, 1999; LEBLANC, 2010; INGVARTSEN; MOYES, 2015).

O período de secagem da vaca é muito importante na epidemiologia da mastite, pois é neste período que se deve focar prioritariamente o controle de novas infecções intramamárias (IMI), e o emprego da terapia de vaca seca e/ou utilização de selantes internos de teto (BRADLEY et al., 2015).

A fisiologia da glândula mamária durante o período seco difere notavelmente do período lactante e é dividido em três fases: 1) período de involução ativa que inicia logo após a interrupção da ordenha; 2) período de involução constante que representa a fase na qual a glândula mamária está totalmente involuída; e 3) período de colostrogênese (SMITH; HOGAN, 1982; HURLEY, 1989; STELWAGEN et al., 2009; GOMES et al., 2011; JEŽEK; MALOVRH; KLINKON, 2012; SILVA, 2014).

Durante o início deste período, denominado de período de involução ativa, que perdura por aproximadamente 21 a 28 dias, há inicialmente acúmulo de fluidos concomitante aumento de componentes antibacterianos, leucócitos, imunoglobulinas e lactoferrina, enquanto o volume decresce (SMITH; HOGAN, 1982).

Após o período de involução ativa, inicia-se a fase de involução gradual da glândula mamária. Já o período de involução constante, que não apresenta período de início e término definido, mas representa o período pelo qual a mama se mantém completamente involuída. Assim, o período de involução constante depende do período de involução ativa e do período

de colostrogênese e lactogênese. Neste período o volume mamário está bem reduzido, com concentrações mínimas dos componentes do leite, enquanto os componentes de defesa antibacterianos continuam elevados se compara-los aos do período lactacional e representa a fase de menor número de novas IMI do ciclo lactacional. Adicionalmente a isto, a taxa de cura espontânea pode ser considerada relativamente alta (SMITH; HOGAN, 1982; NICKERSON, 1989).

Na última fase do período seco, que começa geralmente nas duas a três semanas anteriores ao parto, é observado aumento no volume de fluidos com concomitante aumento de imunoglobulinas, enquanto que a concentração de lactoferina e leucócitos diminuem. Assim, cresce a susceptibilidade a novas IMI, especialmente aquelas ocasionadas por patógenos ambientais (SMITH; HOGAN, 1982; NICKERSON, 1989).

As IMI que persistem pelo período seco e chegam a nova lactação resultam em quartos afuncionais ou decréscimo na produção de leite, e contribui para aumento da taxa de IMI (SMITH; HOGAN, 1982; NICKERSON, 1989). Isto pode ser explicado, já que a IMI afeta significativamente o expressivo desenvolvimento mamário que ocorre neste período (HURLEY, 1989).

Existe uma série de fatores que influenciam o aparecimento de novos casos de mastite, como raça, número de lactações, desenvolvimento de doenças no periparto Zadoks et al., (2001), além de fatores associadas às falhas no manejo de ordenha, como a imersão feita de forma inadequada no *pré-dipping* e *pós-dipping*, e a não secagem dos tetos, ou a utilização de toalhas sujas na preparação do úbere para ordenha (DARGENT-MOLINA et al., 1988; RUEGG, 2003).

A taxa de novas IMI aumenta drasticamente logo após a secagem, e permanece elevada durante as primeiras três semanas pós-secagem. É reconhecido que durante as duas primeiras semanas pós-secagem a taxa de novas infecções pode representar cerca de 40 % do total Natzke (1982) e Pyörälä (2008), podendo o período seco representar até 60% das IMI (BRADLEY; GREEN, 2004). É ainda relatado que a prevenção de apenas 1 % de novas infecções pagaria por todo programa de tratamento em sistemas de alta produção (NICKERSON, 2001).

Além disso, a taxa de descarte de animais quando se utiliza a terapia de vaca seca em todos os animais chega à 30 %, enquanto em fazendas orgânicas que não utilizaram antimicrobianos pode chegar de 50 a 60 % (ROESCH et al., 2006). Sabe-se também que uma glândula curada durante o período seco produz cerca de 90 % da sua capacidade na subsequente lactação. Em contraste, estima-se que novas IMI contraídas durante o período

seco causem perda de 30 a 40 % da produção de leite na lactação seguinte (NICKERSON, 2001).

Notoriamente é reconhecido que alguns fatores podem predispor os bovinos á IMI durante este período como o estresse da secagem, o aumento da contagem bacteriana no teto devido da ausência da desinfecção do teto, e a interrupção na retirada do leite, que ocasiona aumento na pressão intramamária e dilatação do canal do teto decorrente do acúmulo de leite, que favorece a penetração de bactérias (NICKERSON; OWENS, 1993; DINGWELL et al., 2003). Além disso, os neutrófilos, que também representam a primeira linha de defesa celular contra a invasão de agentes patogênicos na glândula mamária, apresentam menor capacidade fagocítica e microbicida, já que estão envolvidos em indiscriminada fagocitose de debris celulares, micelas de caseína e glóbulos de gordura (BURTON; ERSKINE, 2003; PAAPE et al., 2003). Similarmente, os receptores Fc dos neutrófilos estão regulados negativamente ou bloqueados devido ao aumento da concentração de IgG₁ durante o início do período seco (BURTON; ERSKINE, 2003).

A terapia de vaca seca pode também auxiliar na redução da incidência da mastite no rebanho pela cura de infecções pré-existentes, já que concentrações maiores de antimicrobianos podem ser utilizadas evitando o descarte do leite. A maioria dos produtos antimicrobianos contém antimicrobianos de amplo espectro em veículo de liberação lenta, que mantém os níveis terapêuticos na glândula mamária por 14 a 28 dias. Estas características contribuem para maior taxa de cura neste período que durante a lactação para certos patógenos, permitindo a regeneração do tecido, redução da incidência de mastite ao parto e redução dos resíduos antimicrobianos no leite (HUXLEY et al., 2002; GODDEN et al., 2003; BERRY; HILLERTON, 2007b; CAMERON et al., 2015).

A terapia de vaca seca é eficaz no controle de *Streptococcus agalactiae* (90 a 95 %), satisfatória contra *Staphylococcus aureus* (20 a 68 %) (DODD, 1983; BRAMLEY; DODD, 1984; OSTERAS et al., 1999, ROBERT et al., 2006) e estreptococos ambientais (40 a 50 %), e pobre contra coliformes (0 a 10 %) (YANCEY et.al., 1991; ROBERT et al., 2006). No entanto, não há consenso sobre a eficácia da terapia de vaca seca sobre as IMI por estafilococos coagulase-negativos (YANCEY et al., 1991; ROBERT et al., 2006; DUFOUR; DOHOO, 2013). Contudo, a taxa de cura espontânea durante o período seco pode chegar a 50 % (CUMMINS; McCASKEY, 1987).

Neste contexto, em análise quantitativa da incidência de infecções intramamárias durante o período seco com e sem tratamento com antimicrobianos em vacas leiteiras demonstrou risco relativo de 1,54 a 1,94 maior de desenvolver novas IMI (ROBERT et al.,

2006) e 1,51 a 2,10 de cura de IMI pré-existentes Halasa et al. (2009) em quartos não tratados comparados com os quartos tratados. Este efeito foi principalmente observado devido a infecções por estreptococos e estafilococos coagulase-positiva (*S. aureus*). No entanto, efeitos benéficos nas IMI por coliformes não puderam ser preditos (ROBERT et al., 2006; HALASA et al., 2009). Ao discriminar o risco relativo para cura de IMI pré-existentes para estreptococos e estafilococos, Halasa et al. (2009) não encontraram diferença significativa entre estes patógenos, sendo o risco relativo de 1,83 (1,48 a 2,35) para estreptococos, e 1,65 (1,38 a 1,96) para estafilococos.

Porém, é citado que a terapia de vaca seca pode ocasionar o desenvolvimento de cepas bacterianas resistentes aos antimicrobianos Dingwell et al. (2003), e tornar a glândula mais susceptível à outros patógenos menos comuns Nickerson e Owens (1993). Além disso, esta terapia não protege contra infecções próximas ao parto, resíduos no leite podem ser encontrados dependendo da duração do período seco, não é eficaz contra todos os tipos de agentes envolvidos nas infecções da glândula mamária (NICKERSON; OWENS, 1993).

Um dos mecanismos de defesa da glândula mamária no período seco é a formação de um selo de queratina, que dificulta a penetração de bactérias pelo canal do teto e provavelmente evita o crescimento bacteriano. Sendo que, 83 % das mastites que ocorrem nos primeiros 21 dias durante o período seco, 97 % ocorrem em tetos considerados “abertos”. Assim, a falha na formação deste selo de queratina pode predispor o animal a desenvolver IMI (DINGWELL et al., 2003). Deste modo, a utilização de selantes na secagem tem demonstrado resultados tão eficientes na prevenção de novas infecções quanto à terapia de vaca seca, principalmente em animais com baixa CCS (≤ 200.000 células/mL) (PYÖRÄLÄ, 2003; SCHUKKEN et al., 2003; CRISPIE et al., 2004; BANSAL et al., 2005; ROBERT et al., 2006; HALASA et al., 2009; RUEGG; PANTOJA, 2013).

Segundo Dingwell et al. (2003), após o período de secagem uma porcentagem das extremidades dos tetos permanece aberta por causa de uma formação retardada do tampão de queratina, o que cria condições favoráveis a novas infecções.

O selante é formado por uma pasta viscosa que deve ser administrada no canal do teto no momento da secagem, ele forma uma barreira física na porção distal da cisterna do teto, dessa forma impede que bactérias ascendam através do canal do teto, além disso é insolúvel no leite e por não conter propriedades antibacterianas não gera resíduos no leite (GODDEN et al., 2003).

O uso de selantes internos, a base de subnitrato de bismuto, administrados à secagem demonstrou significativa redução na taxa de novas infecções no período seco Dingwell et al.

(2003), e menor número de quartos infectados neste período, assim como menor prevalência de IMI do 1º ao 3º dia de lactação quando utilizados como adjuvantes à terapia de vaca seca (GODDEN et al., 2003). A utilização de selantes internos tem se mostrado muito eficaz na prevenção de novas IMI, as vezes com melhor resultados do que o uso de antimicrobianos (BERRY; HILLERTON, 2002; HUXLEY et al., 2002), especialmente em rebanhos bem-manejados e com baixa CCS. No entanto, a terapia de vaca de seca é uma prática imprescindível no controle e prevenção da mastite bovina em rebanhos leiteiros, especialmente em rebanhos sob alto desafio (≥ 250.000 células mL^{-1} no tanque) e consequentemente redução das perdas produtivas e da contagem de células somáticas.

3 OBJETIVO

Identificar parâmetros bioquímicos, hematológicos e imunológicos, sistêmicos e locais, associados a modelo de risco de mastite bovina, da secagem ao final do período de transição da lactação subsequente, de vacas submetidas a antimicrobiano e selante no período seco.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS UTILIZADOS

Foram utilizadas 34 vacas da raça holandesa preto e branco criadas em sistema semi-intensivo submetidas a produção de leite tipo B, com produção média diária individual de 19 litros de leite no último mês de lactação antes da secagem. Durante o período de seca, foram alimentadas com ração farelada com 20% de proteína e silagem de milho, e no período de chuva, foram mantidas em sistema de pastejo rotacionado com capim Tanzânia.

As vacas foram alocadas em três grupos homogêneos, dentre os quais, o grupo controle (GC) foi composto por 13 animais que não receberam o tratamento de secagem. O grupo A (GA) composto por 10 animais tratados por via intramamária com uma bisnaga de antimicrobiano para vaca seca a base de cefalônio anidro (0,25g de cefalônio anidro, CEPRAVIN[®], MSD, São Paulo, Brasil) após a última ordenha em cada quarto mamário. O grupo S (GS) composto por 11 animais tratados por via intramamária com uma bisnaga de selante a base de subnitrato de bismuto (TEAT SEAL[®], Zoetis, São Paulo, Brasil) após a última ordenha em cada quarto mamário).

Foram colhidas amostras de sangue e leite em sete momentos: primeiro momento (M1) antes da secagem, aproximadamente 60 dias antes da data prevista do parto; segundo momento (M2) no dia do parto; terceiro momento (M3), terceiro dia após o parto; quarto momento (M4), sétimo dia após o parto; quinto momento (M5), 15^o dia após o parto; sexto momento (M6), 21^o dia após o parto; e sétimo momento (M7), 30^o dia após o parto.

As amostras de leite foram utilizadas para o exame bacteriológico, contagem automática de células somáticas (CCS), contagem microscópica de células somáticas, contagem diferencial de leucócitos, *California Mastitis Test* (CMT) e quantificação de imunoglobulinas. Enquanto, as amostras de sangue foram utilizadas para a realização do hemograma, avaliação de metabolismo oxidativo de neutrófilos, quantificação das concentrações séricas de albumina e proteína total, mensuração da concentração sérica de cálcio e fósforo, avaliação do perfil metabólico, avaliação das funções hepática e renal, quantificação de imunoglobulinas e quantificação plasmática de fibrinogênio.

4.2 COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE

As amostras de sangue foram colhidas da veia abdominal subcutânea após higienização da pele com álcool 70°. . Amostras obtidas em frascos do tipo Vacutainer® contendo *Ethylenediamine tetraacetic acid* (EDTA) dipotássico foram utilizadas para a realização do hemograma e quantificação plasmática de fibrinogênio. Amostras obtidas em tubos com anticoagulante heparina foram utilizadas para a avaliação do metabolismo oxidativo de neutrófilos. Amostras obtidas em frascos sem anticoagulantes foram utilizadas para a obtenção do soro para quantificação da concentração sérica de albumina e proteína total, mensuração da concentração sérica de cálcio e fósforo, avaliação do perfil metabólico [colesterol, triglicérides, lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL), β -hidroxibutirato (BHB), ácidos graxos não esterificados (AGNE)], função hepática [alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamiltransferase (GGT)], função renal (uréia e creatinina), e quantificação de imunoglobulinas.

4.3 ANÁLISES DAS AMOSTRAS DE SANGUE

Nas amostras de sangue foram realizadas as análises de hemograma; teste do tetrazólio nitroazul; perfil metabólico; concentração sérica de cálcio e fósforo; função hepática e renal; fibrinogênio; insulina; e quantificação de imunoglobulinas.

4.3.1 Hemograma

Para o eritograma, as amostras foram diluídas pelo líquido de Gower, e a contagem total de eritrócitos foi realizada pelo método do hemocítômetro em câmara de *Neubauer*. A hemoglobina foi dosada pelo método da cianometahemoglobina. A contagem total do número de leucócitos foi realizada utilizando a técnica de contagem em câmara de *Neubauer*, e a contagem diferencial de leucócitos foi feita por esfregaços sanguíneos, coradas com

Rosenfeld para a diferenciação do padrão leucocitário ao microscópio óptico com aumento de 100 X (Birgel & Benesi, 1982).

4.3.2 Teste do tetrazólio nitroazul

A avaliação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos foi realizado pela técnica de tetrazólio nitroazul¹ (NBT) conforme método citoquímico descrito por Park e Good (1970), e modificado por Costa et al. (2008). Para tal, 50 µL de solução de 1,5% de NBT foram homogeneizados a um mL de sangue heparinizado em tubo de ensaio para técnica não estimulada (NBT-NE), enquanto 50 µL de solução de 1,5% de NBT foram homogenizados com um mL de sangue heparinizado e 10 µL de estimulante zymosan² em outro tubo de ensaio para técnica estimulada (NBT-E).

Ambos os tubos foram incubados a 37 °C por 10 minutos e em seguida os esfregaços sanguíneos foram confeccionados em triplicata, e corados com corante Panótico® rápido. Foram contados 100 neutrófilos em cada um dos esfregaços sanguíneos corados em microscópio óptico com objetiva de imersão (100 X), sendo considerados reativos os neutrófilos que apresentarem grânulos citoplasmáticos de cor violácea ou enegrecida (cristais de formazan), independente do número e tamanho das granulações.

4.3.4 Perfil metabólico, concentração sérica de cálcio e fósforo, e função hepática e renal

As amostras de sangue foram centrifugadas a 250 g para a obtenção do soro. Em seguida, as amostras de soro foram submetidas à mensuração da ALT³, AST⁴, GGT⁵, uréia⁶, creatinina⁷, cálcio⁸, fósforo⁹, colesterol¹⁰, triglicerídeos¹¹, LDL¹², HDL¹³, BHB¹⁴, AGNE¹⁵, e

¹ NBT, n. cat. 0329, AMRESCO, Cleveland, EUA

² n. cat. Z4250, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA

³ Ref. 108, Labtest, Lagoa Santa, Brasil

⁴ Ref. 109, Labtest, Lagoa Santa, Brasil

⁵ Ref. 105, Labtest, Lagoa Santa, Brasil

⁶ Ref. 27, Labtest, Lagoa Santa, Brasil

⁷ Ref. 35, Labtest, Lagoa Santa, Brasil

albumina¹⁶. Todas estas análises foram realizadas em analisador bioquímico semiautomático Drake Quick Lab II (São José do Rio Preto, Brasil). A concentração sérica de proteína total foi determinada segundo Kaneko (2008).

4.3.5 Fibrinogênio

Amostra de sangue coletada em tubo contendo o anticoagulante EDTA foi aspirada em dois tubos capilares, que foram fechados em uma das extremidades. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 5 minutos. Um dos tubos foi aquecido em banho-maria a 56° C, durante 3 minutos, e, então, novamente centrifugado (10.000 rpm, durante 5 minutos) para a separação do fibrinogênio das demais proteínas. Do plasma resultante, foi retirada uma alíquota composta por uma gota de cada tubo, que foi colocada sobre o prisma do refratômetro, para a leitura direta da concentração das proteínas conforme descrito por Kaneko (2008). Os valores da concentração do fibrinogênio foram obtidos pela diferença entre os resultados das proteínas plasmáticas totais, obtidas a partir dos dois tubos, com e sem aquecimento. Esses valores foram expressos em mg/dL. leitura

4.3.6 Insulina

A concentração sérica de insulina foi determinada por *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) utilizando kit comercial¹⁷.

4.3.7 Quantificação de imunoglobulinas

⁸ Ref. 90, Labtest, Lagoa Santa, Brasil

⁹ Ref. 42, Labtest, Lagoa Santa, Brasil

¹⁰ Ref. 76, Labtest, Lagoa Santa, Brasil

¹¹ Ref. 87, Labtest, Lagoa Santa, Brasil

¹² Ref. 111, Labtest, Lagoa Santa, Brasil

¹³ Ref. 13, Labtest, Lagoa Santa, Brasil

¹⁴ cat. n. FA1007, Randox, Crumlin, Irlanda

¹⁵ cat. n. FA115, Randox, Crumlin, Irlanda

¹⁶ Ref. 19, Labtest, Lagoa Santa, Brasil

¹⁷ n. cat. EIA4748, DRG Instruments GmbH, Marburg, Alemanha

A quantificação de imunoglobulinas IgG1¹⁸, IgG2¹⁹, IgM²⁰ e IgA²¹ no soro sanguíneo foram quantificadas por ELISA utilizando kits comerciais.

4.4 COLETA DAS AMOSTRAS DE LEITE

Inicialmente, o teste da caneca de fundo escuro foi utilizado para identificar a presença de grumos, ou qualquer outra anormalidade no leite. Posteriormente, foi realizado o *pre-dipping*, seguido de assepsia da extremidade do teto com algodão embebido em álcool 70%. Logo após, amostras de aproximadamente quatro mL de leite foram coletadas dos quatro quartos mamários em frascos estéreis por ordenha manual com utilização de luvas de procedimento. Finalmente, amostras de leite foram colhidas para a contagens automática e microscópica de células somáticas, contagem diferencial de leucócitos e CMT. As amostras de leite para o exame bacteriológico foram congeladas a -20 °C para posterior análise.

4.5 ANÁLISES DAS AMOSTRAS DE LEITE

Nas amostras de leite foram realizadas as análises de exame bacteriológico; CMT; contagem diferencial de leucócitos; CCS microscópica; CCS automática; e quantificação de imunoglobulinas.

4.5.1 Exame bacteriológico

Para o exame bacteriológico das amostras de leite foi realizada a cultura de 10 µL de leite em ágar sangue de carneiro 5% desfibrinado a 37 °C por 48-72 horas, seguido da

¹⁸ cat. n.E10-116, Bethyl laboratories, Montgomery, EUA

¹⁹ cat. n.E10-117, Bethyl laboratories, Montgomery, EUA

²⁰ cat. n.E10- 101, Bethyl laboratories, Montgomery, EUA

²¹ cat. n.E10-121, Bethyl laboratories, Montgomery, EUA

avaliação da morfologia das colônias, coloração de Gram, e testes bioquímicos (OLIVER et al., 2004).

4.5.2 CMT

Para o CMT, foram adicionados 2 mL de leite de cada quarto mamário em cada poço de uma raquete com quatro poços. Em seguida, foram adicionados 2 mL do reagente de CMT e realizados movimentos circulares para misturar o leite ao reagente e, dessa forma, observar se houve formação de gel indicativo de alteração na amostra analisada. Os resultados foram classificados subjetivamente em escores negativo (escore 0), traços (escore 1), fracamente positivo (escore 2), positivo (escore 3) e fortemente positivo (escore 4).

4.5.3 Contagem diferencial de leucócitos

A contagem diferencial de leucócitos mamários foi feita a partir da coleta de sete mL e meio de leite adicionado a sete mL e meio de *phosphate buffered saline* (PBS). Estas foram centrifugadas a 1.500 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi desprezado. O botão celular decantado no fundo do frasco foi desprendido por aspensão com cinco mL de solução fisiológica e o procedimento de centrifugação foi repetido. Novamente o sobrenadante foi desprezado e o botão celular suspenso com um mL de PBS. Alíquotas de 200 µL da suspensão celular do leite foram submetidas a citocentrifugação a uma força centrífuga real (FCR) de 28 g por seis minutos. A partir do sedimento foram confeccionadas lâminas em triplicatas, e coradas pelo método de coloração Panótico® rápido e a contagem diferencial de leucócitos se deu pela contagem de 400 células em microscopia de campo claro, com aumento de 100x.

4.5.4 CCS microscópica

As amostras de leite destinadas à CCS microscópica foram avaliadas segundo o método de Prescott e Breed (1910) e como realizado por Della Libera et al. (2004). Foram confeccionados esfregaços em duplicata e após secas e fixadas em metanol, as lâminas foram coradas com corante de Rosenfeld® e examinadas em microscopia de campo claro, com magnitude de 100x. A contagem total e diferencial de células mononucleares e polimorfonucleares foi determinada, e o resultado multiplicado pelo fator microscópico.

4.5.5 CCS automática

Foram colhidos 40 mL de leite de cada quarto mamário para a CCS automática em frascos contendo pastilhas de bronopol (2-bromo-2-nitropane-1,3-diol). Em seguida, as amostras de leite foram transportadas ao Laboratório de Análise de Qualidade de Leite da Rede de Laboratórios de Controle de Qualidade de Leite (RBQL) credenciado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para a determinação da CCS automática por citometria de fluxo²².

4.5.6 Quantificação de imunoglobulinas

A quantificação de imunoglobulinas IgG1, IgG2 e IgM no leite foram realizadas nos momentos M1, M2, M3, M4 e M7 por ELISA por meio de kits comerciais.

²² Somacount 300, Bentley Instruments®, Chaska, EUA

4.6 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada com o software estatístico STATA versão 12 (Stata Corp., College Station, Texas, EUA). Inicialmente, para todas as variáveis aplicou-se o teste de Shapiro-Wilk para verificação da homocedasticidade e teste de Lilliford para avaliação da normalidade dos dados. Posteriormente, para as variáveis com distribuição normal, aplicou-se *ANOVA* seguido pelo teste de *Student-Newman-Keuls*. Para as variáveis com distribuição não paramétrica utilizou-se o teste de *Kruskall-Wallis*.

Além disto, um modelo de regressão logística foi aplicado para cada variável relacionada à alta CCS (≤ 200.000 células mL^{-1}) ou ao exame bacteriológico positivo nas amostras de leite. As variáveis examinadas foram inicialmente analisadas individualmente para verificar a significância, e então em combinação para avaliar o efeito das variáveis individuais em todas as outras variáveis. No primeiro estágio de análise, um modelo de regressão logística incondicional foi aplicado para cada variável relacionada à alta CCS ou ao exame bacteriológico positivo no leite. Na próxima etapa, as variáveis que apresentaram valores de $P \leq 0,20$ - excetuando-se momento e tratamento que foram incluídas na próxima etapa da análise estatística independentemente do valor de P , foram incluídas no modelo final. As variáveis elegíveis ($P \leq 0,20$), e as variáveis tratamento e momento, por serem o objetivo do presente estudo, foram utilizadas para desenvolver o modelo final de regressão logística, em que as variáveis com valor de $P \leq 0,05$, foram mantidas no modelo final.

5 RESULTADOS

Foram avaliadas 34 vacas em período de transição, alocadas em três grupos, o grupo controle (GC) com idade média de 6,7 ($\pm 0,61$) e produção média de leite de 18,64 ($\pm 1,58$) litros por dia, o grupo antimicrobiano (GA), com idade média de 6,2 ($\pm 1,87$) e produção média de leite de 19,41 ($\pm 1,87$) litros por dia, e o grupo selante (GS) com idade média de 5,63 ($\pm 0,34$) e produção média de leite de 21,18 ($\pm 1,47$) litros por dia. Não se observou diferença entre a idade ($P = 0,25$) e a produção de leite ($P = 0,54$) entre os animais dos diferentes grupos experimentais no presente estudo, o que garantiu a homogeneidade dos grupos experimentais no presente estudo. Os resultados obtidos são apresentados por médias e erro-padrão, e expostos sob a forma de tabelas e figuras.

5.1 PARÂMETROS SANGUÍNEOS

5.1.1 Hemograma

Os resultados dos hemogramas das vacas no período de transição estão expressos em valores médios e erro-padrão e demonstrados na tabela 1.

Tabela 1- Média e erro padrão para parâmetros hematológicos sanguíneos das vacas utilizadas no presente estudo no período de transição - São Paulo - 2016

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	P
Hemácia	6,24 ^{ab}	6,55 ^a	6,15 ^{abc}	5,81 ^{bc}	5,76 ^{bc}	5,55 ^c	5,53 ^c	$\leq 0,0001$
10 ⁶ /uL	$\pm 0,14$	$\pm 0,21$	$\pm 0,17$	$\pm 0,18$	$\pm 0,15$	$\pm 0,15$	$\pm 0,15$	
Hemoglobina	9,72 ^{bc}	11,30 ^a	10,60 ^{abc}	10,04 ^{abc}	11,02 ^{ab}	9,65 ^{bc}	9,40 ^c	0,002
g/dL	$\pm 0,19$	$\pm 0,54$	$\pm 0,25$	$\pm 0,21$	$\pm 0,67$	$\pm 0,22$	$\pm 0,30$	
Hematócrito	31,23 ^{ab}	32,12 ^a	30,66 ^{ab}	31,12 ^{ab}	30,10 ^{ab}	27,61 ^{bc}	26,61 ^c	0,0009
%	$\pm 0,63$	$\pm 0,88$	$\pm 0,73$	$\pm 0,79$	$\pm 2,0$	$\pm 0,78$	$\pm 0,78$	
Plaquetas	419,8 ^a	422,3 ^a	384,2 ^{ab}	367,8 ^{ab}	385,1 ^{ab}	358,3 ^b	368,9 ^{ab}	0,007
10 ³ /uL	$\pm 13,62$	$\pm 19,02$	$\pm 14,09$	$\pm 15,29$	$\pm 11,68$	$\pm 14,86$	$\pm 12,58$	

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas ($P \leq 0,05$) entre momentos.

M1: Momento 1 (no momento da secagem); M2: Momento 2 (no dia do parto); M3: Momento 3 (no terceiro dia após o parto); M4: Momento 4 (sétimo dia após o parto); M5: Momento 5 (décimo quinto dia após o parto); M6: Momento 6 (vigésimo primeiro dia após o parto); M7: Momento 7 (trigésimo dia após o parto).

Ao analisar o eritrograma, observou-se que os animais no M1 e M2 apresentaram maior número de hemácias do que os animais nos M6 e M7 ($P < 0,0001$). Não se observou efeito de tratamento no número de hemácia ($P = 0,11$). Diferenças semelhantes foram observadas na taxa de hemoglobina. Os animais no M2 apresentaram maior taxa de hemoglobina que os animais nos M1, M6 e M7, e os animais no M5 apresentaram maior taxa de hemoglobina do que os animais no M7 ($P = 0,002$). Não se observou efeito de tratamento na quantidade de hemoglobina ($P = 0,42$). No hematócrito, os animais no M6 apresentaram menores índices do que os animais no M2, e os animais no M7 apresentaram menores índices do que os animais nos M1, M2, M3, M4 e M5 ($P = 0,0009$). Os animais nos M1 e M2 apresentaram maior quantidade de plaquetas do que os animais no M6 ($P = 0,007$).

Tabela 2 - Média e erro padrão para hematócrito sanguíneos das vacas utilizadas no presente estudo no período de transição - São Paulo - 2016

Hematócrito %	GC	GA	GS	P
(n=34)	31,59 ^B	29,00 ^A	29,18 ^A	0,008
	± 0,83	± 0,61	± 0,52	

Letras maiúsculas diferentes indicam $P \leq 0,05$ entre tratamentos.

GC: Grupo controle; GA: Grupo que recebeu tratamento com antimicrobiano; GS: Grupo que recebeu tratamento com selante interno de teto

Os resultados dos CHCM das vacas no período de transição estão expressos em valores médios e erro-padrão e demonstrados na tabela 3.

Tabela 3 - Média e erro padrão para CHCM sanguíneos das vacas utilizadas no presente estudo no período de transição - São Paulo - 2016

CHCM	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	P
g/dL								
								$\leq 0,0001$
GC	31,12 ^{Aa}	34,95 ^{Aa}	34,49 ^{Aa}	32,60 ^{Aa}	36,43 ^{Aa}	32,88 ^{Ba}	32,10 ^{Ba}	
(n = 13)	± 0,97	± 1,57	± 0,69	± 1,14	± 2,05	± 1,19	± 1,42	
GA	30,64 ^{Ab}	42,82 ^{Aab}	35,14 ^{Aab}	33,69 ^{Aab}	34,66 ^{Aab}	35,75 ^{ABab}	38,15 ^{Aa}	
(n = 10)	± 1,29	± 8,32	± 0,96	± 0,91	± 0,76	± 0,76	± 2,06	
GS	32,17 ^{Ab}	31,52 ^{Aab}	34,20 ^{Aab}	34,62 ^{Aab}	35,53 ^{Aab}	37,84 ^{Aa}	37,24 ^{Aa}	
(n = 11)	± 1,37	± 2,95	± 1,15	± 0,84	± 0,95	± 1,83	± 1,00	

Letras maiúsculas diferentes indicam $P \leq 0,05$ entre os tratamentos e letras minúsculas diferentes indicam $P \leq 0,05$ entre momentos.

M1: Momento 1 (no momento da secagem); M2: Momento 2 (no dia do parto); M3: Momento 3 (no terceiro dia após o parto); M4: Momento 4 (sétimo dia após o parto); M5: Momento 5 (décimo quinto dia após o parto); M6: Momento 6 (vigésimo primeiro dia após o parto); M7: Momento 7 (trigésimo dia após o parto); GC: Grupo controle; GA: Grupo que recebeu tratamento com antimicrobiano; GS: Grupo que recebeu tratamento com selante interno de teto.

Observou-se diferença entre os momentos no GA, onde M7 apresentou maior concentração de hemoglobina corpuscular média quando comparado com M1. Para os animais do GS observou-se que M6 e M7 apresentaram maiores concentrações de hemoglobina corpuscular média quando comparado ao M1. Também foi observada diferença no M6, onde GC apresentou menores concentrações de hemoglobina corpuscular média que o GS, e no M7 os animais dos GA e GS apresentaram maiores concentrações de hemoglobina corpuscular média que aqueles do GC. Em relação aos demais índices hematimétricos não foram observadas diferenças estatísticas entre momentos ($P = 0,06$) e os tratamentos ($P = 0,85$) de HCM, nem para VCM ($P = 0,46$).

5.1.2 LEUCOGRAMA

Os resultados do leucograma das vacas no período de transição estão expressos em valores médios e desvio padrão e demonstrados na tabela 4.

Tabela 4 - Média e desvio padrão da porcentagem de leucócitos sanguíneos das vacas utilizadas no presente estudo no período de transição - São Paulo - 2016

								(continua)
Segmentados %	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	P
								0,03
GC	21,31 ^{Aa}	29,23 ^{Ba}	19,31 ^{Aa}	27,46 ^{Aa}	23,00 ^{Aa}	25,23 ^{Aa}	21,08 ^{Aa}	
(n = 13)	± 3,01	± 5,19	± 5,12	± 3,57	± 2,89	± 3,63	± 3,17	
GA	26,50 ^{Ab}	47,50 ^{Aa}	29,00 ^{Aab}	27,20 ^{Ab}	30,70 ^{Aab}	31,40 ^{Aab}	28,80 ^{Aab}	
(n = 10)	± 4,16	± 6,16	± 5,40	± 4,17	± 5,05	± 4,09	± 3,42	
GS	22,55 ^{Aa}	31,73 ^{ABa}	17,73 ^{Aa}	17,36 ^{Aa}	20,73 ^{Aa}	21,00 ^{Aa}	23,55 ^{Aa}	
(n = 11)	± 2,79	± 6,38	± 3,22	± 1,96	± 3,23	± 3,24	± 4,11	
Monócitos %								0,04
GC	2,77 ^{Aa}	5,85 ^{Aa}	4,38 ^{Aa}	3,85 ^{Aa}	3,08 ^{Aa}	2,62 ^{Aa}	2,54 ^{Aa}	
(n = 13)	± 2,39	± 8,18	± 4,21	± 3,89	± 2,22	± 2,18	± 2,67	
GA	2,40 ^{Aa}	3,00 ^{Aa}	4,10 ^{Aa}	4,40 ^{Aa}	3,70 ^{Aa}	2,50 ^{Aa}	1,50 ^{Aa}	
(n = 10)	± 2,37	± 1,89	± 3,67	± 4,17	± 3,40	± 2,72	± 1,58	

								(conclusão)
Segmentados %	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	P
GS	1,73 ^{Aab}	1,73 ^{Aab}	3,00 ^{Aa}	1,18 ^{Bb}	1,36 ^{Aab}	1,09 ^{Aab}	1,18 ^{Aab}	
(n = 11)	± 2,24	± 1,56	± 2,41	± 1,83	± 1,75	± 1,38	± 0,98	
Eosinófilos %								0,0002
GC	7,85 ^{Aa}	3,54 ^{Ac}	5,69 ^{Aabc}	3,54 ^{Abc}	5,62 ^{Aabc}	7,15 ^{Aab}	9,00 ^{Aa}	
(n = 13)	± 6,62	± 7,80	± 6,42	± 3,82	± 5,45	± 6,14	± 8,95	
GA	9,00 ^{Aa}	2,50 ^{Ab}	5,60 ^{Aab}	6,00 ^{Aab}	5,90 ^{Aab}	4,70 ^{Aab}	7,30 ^{Aa}	
(n = 10)	± 5,93	± 2,55	± 3,72	± 4,06	± 4,28	± 4,08	± 4,72	
GS	11,64 ^{Aa}	1,91 ^{Ad}	6,18 ^{Aabc}	5,73 ^{Aabc}	5,45 ^{Abcd}	9,09 ^{Aab}	8,27 ^{Aab}	
(n = 11)	± 9,63	± 2,30	± 3,89	± 5,12	± 6,76	± 8,37	± 5,48	

Letras maiúsculas diferentes indicam $P \leq 0,05$ entre os tratamentos e letras minúsculas diferentes indicam $P \leq 0,05$ entre momentos.

M1: Momento 1 (no momento da secagem); M2: Momento 2 (no dia do parto); M3: Momento 3 (no terceiro dia após o parto); M4: Momento 4 (sétimo dia após o parto); M5: Momento 5 (décimo quinto dia após o parto); M6: Momento 6 (vigésimo primeiro dia após o parto); M7: Momento 7 (trigésimo dia após o parto); GC: Grupo controle; GA: Grupo que recebeu tratamento com antimicrobiano; GS: Grupo que recebeu tratamento com selante interno de teto.

Foram observadas diferenças entre os tratamentos e os momentos na porcentagem de leucócitos sanguíneos. Em relação aos neutrófilos, no GA observou-se que os animais no M2 apresentaram maior porcentagem do que os animais nos M1 e M4. Animais do GA apresentaram maior porcentagem de neutrófilos do que os animais do GC no M2.

Em relação aos monócitos, os animais do GS apresentaram maior porcentagem de monócitos no M3 do que no M4, e no M4 os animais do GS apresentaram menor quantidade de monócitos do que os animais do GC e GA.

Quanto aos eosinófilos, os animais do GC apresentaram menor porcentagem de eosinófilos no M2 do que os animais nos M1 e M7. Similarmente, os animais do GS apresentaram menor porcentagem de eosinófilos no M2 do que nos M1, M3, M6 e M7.

Na tabela 5 estão expressos os valores médios e erro padrão das porcentagens de linfócitos de vacas no período de transição.

Tabela 5 - Média e erro padrão da porcentagem de linfócitos totais das vacas utilizadas no presente estudo no período de transição - São Paulo - 2016

Linfócitos %	GC	GA	GS	P
(n = 34)	66,54 ^A	59,47 ^B	69,40 ^A	0,001
	± 1,75	± 1,99	± 1,90	

Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas ($P \leq 0,05$) entre tratamentos.

GC: Grupo controle; GA: Grupo que recebeu tratamento com antimicrobiano; GS: Grupo que recebeu tratamento com selante interno de teto.

Observou-se diferença entre os tratamentos para porcentagem de linfócitos ($P = 0,001$), onde o GS apresentou maior porcentagem quando comparado ao GA. Não se observou diferença na porcentagem de linfócitos entre os momentos ($P = 0,19$).

Na tabela 6 estão expressos os valores médios e desvio padrão dos valores absolutos de eosinófilos de vacas no período de transição.

Tabela 6 - Médias e desvio padrão dos valores absolutos de eosinófilos sanguíneos das vacas utilizadas no presente estudo no período de transição - São Paulo - 2016

Eosinófilo $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	<i>P</i>
								0,001
GC	1,14 ^{Aa}	0,44 ^{Ab}	0,68 ^{Aab}	0,37 ^{Ab}	0,75 ^{Aab}	1,14 ^{Aa}	1,40 ^{Aa}	
(n = 13)	$\pm 1,22$	$\pm 0,67$	$\pm 0,59$	$\pm 0,32$	$\pm 0,60$	$\pm 0,80$	$\pm 1,45$	
GA	1,22 ^{Aa}	0,45 ^{Ab}	0,67 ^{Aab}	0,66 ^{Aab}	0,70 ^{Aab}	0,68 ^{Aab}	0,88 ^{Aab}	
(n = 10)	$\pm 1,19$	$\pm 0,47$	$\pm 0,43$	$\pm 0,56$	$\pm 0,61$	$\pm 0,71$	$\pm 0,62$	
GS	1,90 ^{Aa}	0,28 ^{Ad}	0,80 ^{Aabc}	0,71 ^{Abcd}	0,81 ^{Abcd}	1,30 ^{Aab}	1,23 ^{Aab}	
(n = 11)	$\pm 1,65$	$\pm 0,33$	$\pm 0,46$	$\pm 0,56$	$\pm 0,78$	$\pm 1,23$	$\pm 0,91$	

Letras maiúsculas diferentes indicam $P \leq 0,05$ entre os tratamentos e letras minúsculas diferentes indicam $P \leq 0,05$ entre momentos.

M1: Momento 1 (no momento da secagem); M2: Momento 2 (no dia do parto); M3: Momento 3 (no terceiro dia após o parto); M4: Momento 4 (sétimo dia após o parto); M5: Momento 5 (décimo quinto dia após o parto); M6: Momento 6 (vigésimo primeiro dia após o parto); M7: Momento 7 (trigésimo dia após o parto); GC: Grupo controle; GA: Grupo que recebeu tratamento com antimicrobiano; GS: Grupo que recebeu tratamento com selante interno de teto.

Os animais do GC apresentaram maior quantidade de eosinófilos em M1, M6 e M7 do que M2 e M4, Os animais do GA apresentaram maior quantidade de eosinófilos em M1 quando comparados com M2, Os animais do GS apresentou maior quantidade de eosinófilos no M1 do que M2, M4 e M5, e M2 apresentou uma menor quantidade de eosinófilos quando comparado com M3, M6 e M7, Não foi observada diferença entre os tratamentos.

Ademais, não se encontrou diferença estatística nos valores absolutos ($10^3 \mu\text{L}^{-1}$) de leucócitos totais ($P = 0,75$), linfócitos ($P = 0,69$), monócitos ($P = 0,07$) e neutrófilos segmentados ($P = 0,11$) entre os momentos e tratamentos no presente estudo.

5.1.2 Proteinograma

Os valores médios e erro padrão da proteína total de vacas no período de transição estão demonstrados nas tabelas 7 e 8.

Tabela 7 - Média e erro padrão da proteína total das vacas utilizadas no presente estudo no período de transição - São Paulo – 2016

Proteína	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	P
g/dL								
(n = 34)	8,24 ^a	7,52 ^b	7,40 ^b	7,48 ^b	7,97 ^a	7,90 ^a	8,05 ^a	$\leq 0,0001$
	$\pm 0,08$	$\pm 0,13$	$\pm 0,12$	$\pm 0,13$	$\pm 0,12$	$\pm 0,11$	$\pm 0,11$	

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas ($P \leq 0,05$) entre momentos.

M1: Momento 1 (no momento da secagem); M2: Momento 2 (no dia do parto); M3: Momento 3 (no terceiro dia após o parto); M4: Momento 4 (sétimo dia após o parto); M5: Momento 5 (décimo quinto dia após o parto); M6: Momento 6 (vigésimo primeiro dia após o parto); M7: Momento 7 (trigésimo dia após o parto).

Tabela 8 - Média e erro padrão da proteína total das vacas utilizadas no presente estudo no período de transição - São Paulo – 2016

Proteína	GC	GA	GS	P
g/dL				
(n = 34)	8,01 ^a	7,54 ^c	7,77 ^b	$\leq 0,0001$
	$\pm 0,07$	$\pm 0,07$	$\pm 0,08$	

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas ($P \leq 0,05$) entre tratamentos.

GC: Grupo controle; GA: Grupo que recebeu tratamento com antimicrobiano; GS: Grupo que recebeu tratamento com selante interno de teto.

Os animais nos M2, M3, e M4 apresentaram menores concentrações séricas de proteína total do que os animais nos M1, M5, M6 e M7 ($P \leq 0,0001$). Ao analisar os tratamentos vemos que os três tratamentos diferem ($P \leq 0,0001$), onde GC apresenta maior concentração sérica de proteína total.

Os valores médios e erro padrão da albumina e fibrinogênio de vacas no período de transição estão demonstrados na tabela 9.

Tabela 9 - Médias e erro padrão das proteínas sanguíneas das vacas utilizadas no presente estudo no período de transição - São Paulo – 2016

Albumina g/dL	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	P
								0,03
GC	4,81 ^{Aab}	5,24 ^{Aa}	4,89 ^{Aab}	4,28 ^{Aab}	3,93 ^{Bb}	4,02 ^{Ab}	4,12 ^{Aab}	
(n = 13)	± 0,48	± 0,65	± 0,65	± 0,37	± 0,25	± 0,28	± 0,28	
GA	4,60 ^{Aa}	4,87 ^{Aa}	5,11 ^{Aa}	7,22 ^{Aa}	5,87 ^{Aa}	4,90 ^{Aa}	5,08 ^{Aa}	
(n = 10)	± 0,44	± 0,31	± 0,39	± 2,44	± 0,78	± 0,39	± 0,65	
GS	5,07 ^{Aa}	5,85 ^{Aa}	5,44 ^{Aa}	4,99 ^{Aa}	4,78 ^{Aa}	5,48 ^{Aa}	4,79 ^{Aa}	
(n = 11)	± 0,61	± 0,78	± 0,48	± 0,31	± 0,27	± 0,58	± 0,51	
Fibrinogênio mg/dL								0,05
GC	646 ^{Aab}	800 ^{Aa}	754 ^{Aab}	608 ^{Aab}	592 ^{Aab}	569 ^{Aab}	592 ^{Ab}	
(n = 13)	± 91,0	± 90,6	± 82,1	± 52,5	± 47,3	± 71,1	± 108,9	
GA	460 ^{Aab}	600 ^{ABab}	660 ^{ABa}	500 ^{Aab}	450 ^{Ab}	500 ^{Aab}	460 ^{Aab}	
(n = 10)	± 52,1	± 89,4	± 67,0	± 33,3	± 47,7	± 68,3	± 60,0	
GS	545 ^{Aab}	509 ^{Bab}	491 ^{Bab}	727 ^{Aa}	497 ^{Aab}	545 ^{Aab}	464 ^{Ab}	
(n = 11)	± 76,7	± 56,3	± 78,0	± 90,5	± 74,6	± 107,3	± 74,2	

Letras maiúsculas diferentes indicam $P \leq 0,05$ entre os tratamentos e letras minúsculas diferentes indicam $P \leq 0,05$ entre momentos.

M1: Momento 1 (no momento da secagem); M2: Momento 2 (no dia do parto); M3: Momento 3 (no terceiro dia após o parto); M4: Momento 4 (sétimo dia após o parto); M5: Momento 5 (décimo quinto dia após o parto); M6: Momento 6 (vigésimo primeiro dia após o parto); M7: Momento 7 (trigésimo dia após o parto); GC: Grupo controle; GA: Grupo que recebeu tratamento com antimicrobiano; GS: Grupo que recebeu tratamento com selante interno de teto.

No GC pode-se observar que os animais no M2 apresentaram maior concentração sérica de albumina do que os animais nos M5 e M6. Quando avaliados os momentos, no M5, observou-se que os animais do GC apresentaram menor concentração sérica de albumina do que os animais do GA e do GS. No M6 os animais do GC apresentaram menor concentração sérica de albumina do que os animais do GA e do GS.

No GC, os animais no M2 apresentaram maior concentração plasmática de fibrinogênio do que os animais no M7. No GA, os animais no M3 apresentaram maior concentração plasmática de fibrinogênio do que os animais no M5, e no GS os animais no M4 apresentaram maior concentração plasmática de fibrinogênio do que os animais no M7. Quando avaliados os tratamentos, pode-se observar nos M2 e M3, que os animais do GC apresentaram maior concentração plasmática de fibrinogênio do que os animais do GS.

5.1.3 Perfil Hepático

Os valores médios e erro padrão das enzimas hepáticas de vacas no período de transição estão demonstrados na tabela 10.

Tabela 10 - Média e erro padrão da atividade das enzimas hepáticas sanguíneas das vacas utilizadas no presente estudo no período de transição - São Paulo – 2016

ALT UI/L	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	P
								0,02
GC	44,67 ^{Aa}	35,53 ^{Aab}	33,17 ^{Aab}	25,08 ^{Ab}	32,40 ^{Aab}	23,24 ^{Bb}	36,52 ^{Aa}	
(n = 13)	± 5,60	± 5,75	± 4,15	± 2,05	± 3,41	± 2,98	± 4,66	
GA	43,66 ^{Aa}	30,82 ^{Aab}	27,03 ^{Ab}	29,41 ^{Aab}	33,90 ^{Aab}	44,76 ^{Aab}	36,65 ^{Aab}	
(n = 10)	± 5,77	± 4,73	± 3,58	± 4,33	± 3,62	± 7,90	± 6,49	
GS	32,73 ^{Aab}	22,90 ^{Ab}	33,05 ^{Aab}	24,80 ^{Aab}	36,65 ^{Aab}	35,77 ^{Aa}	31,78 ^{Aab}	
(n = 11)	± 5,61	± 2,47	± 3,04	± 3,54	± 7,82	± 4,46	± 2,86	
AST UI/L								P
								0,002
GC	89,08 ^{Ab}	136,2 ^{Aa}	113,4 ^{Aab}	117,6 ^{Aa}	108,4 ^{Aab}	109,2 ^{Aab}	105,0 ^{Aab}	
(n = 13)	± 5,80	± 12,35	± 12,55	± 7,32	± 5,31	± 6,56	± 11,18	
GA	92,91 ^{Ab}	103,0 ^{Aab}	127,1 ^{Aa}	121,8 ^{Aa}	121,5 ^{Aa}	137,8 ^{Aab}	110,9 ^{Aab}	
(n = 10)	± 20,47	± 8,84	± 13,94	± 9,18	± 13,49	± 33,09	± 8,84	
GS	83,98 ^{Ab}	136,7 ^{Aa}	169,2 ^{Aa}	128,8 ^{Aa}	115,9 ^{Aa}	133,9 ^{Aa}	109,8 ^{Aab}	
(n = 11)	± 11,19	± 14,40	± 24,71	± 6,98	± 16,40	± 17,62	± 6,23	
GGT UI/L								P
								0,0004
GC	29,67 ^{Aab}	43,22 ^{Aab}	29,16 ^{Ab}	36,87 ^{Aab}	37,85 ^{Aa}	36,22 ^{Aab}	45,79 ^{Aab}	
(n = 13)	± 2,88	± 7,40	± 3,11	± 7,07	± 3,89	± 3,00	± 10,09	
GA	42,19 ^{Aa}	33,99 ^{ABabc}	27,25 ^{Aabc}	23,23 ^{Ac}	28,33 ^{ABabc}	26,51 ^{Bbc}	32,00 ^{Aab}	
(n = 10)	± 6,10	± 6,81	± 1,80	± 1,98	± 3,15	± 1,52	± 1,97	
GS	30,50 ^{Aa}	24,81 ^{Bab}	22,98 ^{Ab}	32,89 ^{Aab}	34,54 ^{Bab}	23,87 ^{Bab}	23,85 ^{Bab}	
(n = 11)	± 2,70	± 4,40	± 1,90	± 7,93	± 11,50	± 2,54	± 3,10	

Letras maiúsculas diferentes indicam $P \leq 0,05$ entre os tratamentos, e letras minúsculas diferentes indicam $P \leq 0,05$ entre os momentos.

M1: Momento 1 (no momento da secagem); M2: Momento 2 (no dia do parto); M3: Momento 3 (no terceiro dia após o parto); M4: Momento 4 (sétimo dia após o parto); M5: Momento 5 (décimo quinto dia após o parto); M6: Momento 6 (vigésimo primeiro dia após o parto); M7: Momento 7 (trigésimo dia após o parto); GC: Grupo controle; GA: Grupo que recebeu tratamento com antimicrobiano; GS: Grupo que recebeu tratamento com selante interno de teto; ALT: Alanina amino transferase; AST: Aspartato amino transferase; GGT: Gama glutamil transferase.

Os animais do GC apresentaram no M1 e M6 maior atividade de ALT do que os animais nos M4 e M6. Os animais do GA apresentaram no M1 maior atividade de ALT do

que os animais no M3, e no GS, os animais no M6 apresentaram maior atividade de ALT do que os animais no M2. Quando comparado os momentos entre os tratamentos, no M6, pode-se observar que os animais do GC apresentaram menor atividade de ALT do que os animais do GA e GS.

Quanto a quantidade de AST, observou-se que os animais do GC apresentaram menor atividade de AST no M1 do que nos M2 e M4. No GA, os animais apresentaram menor atividade de AST no M1 do que nos M3, M4 e M5. Porém, no GS os animais no M1 apresentaram menor atividade de AST do que nos M2, M3, M4, M5 e M6, Não foram observadas diferenças entre os tratamentos.

Os animais do GC apresentaram no M5 maior atividade de GGT do que os animais no M3, No GA, os animais no M1 apresentaram maior atividade de GGT do que os animais no M4 e M6, e os animais no M7 apresentaram maior atividade do que os animais no M4. No GS, apenas os animais no M1 apresentaram maior atividade de GGT do que os animais no M3. Na comparação entre os tratamentos, observou-se que nos M2 e M5 os animais do GC apresentaram maior atividade de GGT do que os animais do GS, e no M6 os animais do GC apresentaram maior atividade de GGT do que os animais do GA e GS. Já no M7, os animais do GC e do GA apresentaram maior quantidade de GGT do que os animais do GS.

5.1.4 Perfil Metabólico

Os valores médios e desvio padrão da glicose sérica de vacas submetidas à tratamento de secagem no período de transição estão demonstrados na tabela 11.

Tabela 11 - Média e erro padrão para glicose sanguíneo das vacas utilizadas no presente estudo no período de transição - São Paulo - 2016

Glicose	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	P
mg/dL								
(n = 34)	31,38 ^c	81,03 ^a	60,94 ^b	54,94 ^b	54,53 ^b	54,03 ^b	56,21 ^b	≤ 0,0001
	± 0,64	± 3,62	± 1,88	± 1,82	± 1,67	± 1,86	± 1,43	

Letras minúsculas diferentes indicam $P \leq 0,05$ entre momentos.

M1: Momento 1 (no momento da secagem); M2: Momento 2 (no dia do parto); M3: Momento 3 (no terceiro dia após o parto); M4: Momento 4 (sétimo dia após o parto); M5: Momento 5 (décimo quinto dia após o parto); M6: Momento 6 (vigésimo primeiro dia após o parto); M7: Momento 7 (trigésimo dia após o parto).

Os animais no M2 apresentaram maior glicemia do que demais momentos, e os animais no M1 apresentaram menor glicemia do que os demais momentos ($P \leq 0,0001$). Não foram observadas diferenças na glicemia entre os tratamentos ($P = 0,49$). Também não foram

observadas diferenças entre os momentos e tratamentos das concentrações séricas de insulina ($P = 0,14$).

Na tabela 12 estão dispostos os valores médios e erro padrão do BHB e AGNE de vacas submetidas ao tratamento de secagem no período de transição.

Tabela 12 - Média e erro padrão para BHB e ácidos graxos não esterificados sanguíneos das vacas utilizadas no presente estudo no período de transição - São Paulo - 2016

BHB	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	P
Mmol/L								$\leq 0,0001$
GC	0,49 ^{Aab}	0,77 ^{Ba}	0,66 ^{Aa}	0,74 ^{Aab}	0,69 ^{Bab}	0,42 ^{Bb}	0,35 ^{Bb}	
(n = 13)	$\pm 0,07$	$\pm 0,17$	$\pm 0,13$	$\pm 0,32$	$\pm 0,27$	$\pm 0,07$	$\pm 0,03$	
GA	0,43 ^{Ab}	1,32 ^{ABa}	1,02 ^{Aa}	0,99 ^{Aab}	0,93 ^{Aa}	0,60 ^{Aab}	0,61 ^{Aab}	
(n = 10)	$\pm 0,05$	$\pm 0,44$	$\pm 0,25$	$\pm 0,31$	$\pm 0,25$	$\pm 0,07$	$\pm 0,14$	
GS	0,58 ^{Ab}	0,98 ^{Aa}	0,60 ^{Ab}	0,56 ^{Ab}	0,67 ^{ABab}	0,48 ^{ABb}	0,41 ^{ABb}	
(n = 11)	$\pm 0,06$	$\pm 0,10$	$\pm 0,06$	$\pm 0,07$	$\pm 0,10$	$\pm 0,06$	$\pm 0,03$	
AGNE								$\leq 0,0001$
Mmol/L								
GC	0,22 ^{Ad}	0,74 ^{Aa}	0,49 ^{Aabc}	0,40 ^{AcD}	0,40 ^{Abcd}	0,37 ^{Ad}	0,31 ^{Ad}	
(n = 13)	$\pm 0,03$	$\pm 0,12$	$\pm 0,05$	$\pm 0,06$	$\pm 0,08$	$\pm 0,04$	$\pm 0,04$	
GA	0,31 ^{Ac}	0,70 ^{Aa}	0,59 ^{Aa}	0,53 ^{Aab}	0,51 ^{Aabc}	0,36 ^{Aabc}	0,29 ^{Abc}	
(n = 10)	$\pm 0,09$	$\pm 0,16$	$\pm 0,09$	$\pm 0,13$	$\pm 0,12$	$\pm 0,05$	$\pm 0,05$	
GS	0,26 ^{Ac}	0,85 ^{Aa}	0,49 ^{Aab}	0,35 ^{Abc}	0,37 ^{Abc}	0,30 ^{Ac}	0,26 ^{Ac}	
(n = 11)	$\pm 0,05$	$\pm 0,13$	$\pm 0,04$	$\pm 0,04$	$\pm 0,05$	$\pm 0,02$	$\pm 0,03$	

Letras maiúsculas diferentes indicam $P \leq 0,05$ entre os tratamentos e letras minúsculas diferentes indicam $P \leq 0,05$ entre os momentos.

M1: Momento 1 (no momento da secagem); M2: Momento 2 (no dia do parto); M3: Momento 3 (no terceiro dia após o parto); M4: Momento 4 (sétimo dia após o parto); M5: Momento 5 (décimo quinto dia após o parto); M6: Momento 6 (vigésimo primeiro dia após o parto); M7: Momento 7 (trigésimo dia após o parto); GC: Grupo controle; GA: Grupo que recebeu tratamento com antimicrobiano; GS: Grupo que recebeu tratamento com selante interno de teto; BHB: β -hidroxibutirato ; AGNE: ácidos graxos não esterificados.

Os animais do GC apresentaram menor concentração sérica de BHB nos M6 e M7 do que nos M2 e M3. Os animais do GA apresentaram menor concentração sérica de BHB no M1 do que nos M2, M3 e M5, e os animais do GS apresentaram maior concentração sérica de BHB no M2 do que nos M1, M3, M4, M6 e M7. Ao comparar os tratamentos, observou-se que no M2, os animais do GS apresentaram maior concentração sérica de BHB do que os animais do GC, Nos M5, M6 e M7 os animais do GA apresentaram maior concentração sérica de BHB do que os animais do GC. Os animais do GC apresentaram menor concentração sérica de AGNE no M1 do que os animais nos M3, M4, M5 e M6 e M7. Além disso, os animais no M7 apresentaram menor concentração sérica de AGNE do que os animais nos M2,

M3, M4 e M5, enquanto M6 apresentou menor concentração sérica de AGNE do que M2. Os animais do GA apresentaram menor concentração sérica de AGNE no M1 do que nos M2, M3 e M4, Resultados semelhantes foram encontrados nos animais do GS, onde se observou que M1, M6 e M7 apresentaram menor concentração sérica de AGNE que M3, e os animais no M2 apresentaram maior concentração sérica de AGNE do que os animais nos M1, M4, M5, M6 e M7.

Na tabela 13 estão dispostos os valores médios e erro padrão do colesterol e suas frações (HDL e LDL), de vacas no período de transição.

Tabela 13 - Média e erro padrão para lipidograma sanguíneo das vacas utilizadas no presente estudo no período de transição - São Paulo - 2016

								(continua)
Colesterol	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	<i>P</i>
mg/dL								
								$\leq 0,0001$
GC	169,15 ^{Aa}	136,00 ^{Aab}	130,15 ^{Aab}	143,85 ^{Ab}	144,00 ^{Aab}	109,77 ^{Aab}	148,15 ^{Aa}	
(n = 13)	± 31,34	± 25,08	± 23,35	± 41,84	± 32,98	± 12,79	± 27,64	
GA	135,70 ^{Aa}	88,50 ^{Ab}	76,20 ^{Bb}	88,50 ^{Ab}	96,80 ^{Aab}	108,70 ^{Aab}	140,50 ^{Aa}	
(n = 10)	± 15,47	± 8,25	± 9,03	± 14,88	± 11,48	± 14,10	± 21,05	
GS	177,27 ^{Aa}	126,18 ^{Aabc}	123,27 ^{ABbc}	94,09 ^{Ac}	116,91 ^{Aabc}	139,91 ^{Aab}	153,91 ^{Aab}	
(n = 11)	± 19,36	± 14,09	± 21,70	± 7,99	± 7,22	± 11,92	± 17,17	
LDL								$\leq 0,0001$
mg/dL								
GC	7,24 ^{Aa}	3,26 ^{Ab}	3,17 ^{Ab}	3,56 ^{Ab}	4,47 ^{Aab}	5,11 ^{Aab}	4,73 ^{Aab}	
(n = 13)	± 1,31	± 0,59	± 0,58	± 0,77	± 1,05	± 1,25	± 1,21	
GA	6,43 ^{Aa}	1,96 ^{Ab}	2,29 ^{Ab}	2,26 ^{Ab}	3,12 ^{Ab}	2,39 ^{Bb}	4,43 ^{Aab}	
(n = 10)	± 0,97	± 0,45	± 0,65	± 10,47	± 0,96	± 0,85	± 1,41	
GS	10,42 ^{Aa}	3,36 ^{Abcd}	3,11 ^{Ad}	3,29 ^{Ac}	4,75 ^{Abcd}	5,72 ^{Aabcd}	6,25 ^{Aabc}	
(n = 11)	± 2,28	± 0,66	± 0,67	± 0,72	± 1,22	± 1,15	± 1,15	
HDL								0,02
mg/dL								
GC	47,00 ^{Ba}	42,69 ^{Aa}	42,38 ^{Aa}	36,77 ^{Aa}	43,77 ^{Aa}	38,76 ^{Aa}	42,62 ^{Aa}	
(n = 13)	± 7,50	± 5,62	± 4,59	± 5,97	± 9,93	± 6,06	± 7,77	
GA	55,00 ^{ABa}	34,70 ^{Aabc}	25,70 ^{Bc}	29,20 ^{Abc}	39,70 ^{Aabc}	39,20 ^{Aabc}	31,21 ^{Aab}	
(n = 10)	± 11,70	± 6,37	± 5,40	± 4,96	± 8,75	± 7,51	± 9,87	
HDL	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	<i>P</i>
mg/dL								
GS	62,18 ^{Aa}	38,09 ^{Abc}	33,27 ^{ABbc}	29,09 ^{Ac}	38,82 ^{Abc}	43,18 ^{Abc}	48,09 ^{ab}	
(n = 11)	± 2,28	± 5,62	± 5,51	± 3,63	± 2,85	± 5,47	± 3,92	

Letras maiúsculas diferentes indicam $P \leq 0,05$ entre os tratamentos e letras minúsculas diferentes indicam $P \leq 0,05$ na interação entre momentos e tratamentos.

M1: Momento 1 (no momento da secagem); M2: Momento 2 (no dia do parto); M3: Momento 3 (no terceiro dia após o parto)

M4: Momento 4 (sétimo dia após o parto); M5: Momento 5 (décimo quinto dia após o parto); M6: Momento 6 (vigésimo primeiro dia após o parto); M7: Momento 7 (trigésimo dia após o parto); GC: Grupo controle; GA: Grupo que recebeu tratamento com antimicrobiano; GS: Grupo que recebeu tratamento com selante interno de teto; HDL: Lipoproteína de alta densidade; LDL: Lipoproteína de baixa densidade.

Os animais do GC apresentaram maior concentração sérica de colesterol no M1 do que nos M4 e M6. Os animais do GA apresentaram maior concentração sérica de colesterol nos

M1 e M7 do que nos M2, M3 e M4. Os animais do GS apresentaram maior concentração sérica de colesterol no M1 do que nos M3 e M4. Ao comparar os tratamentos, observou-se que no M3 os animais do GC apresentaram maior concentração sérica de colesterol do que os animais do GA.

Os animais do GC apresentaram maior concentração sérica de LDL no M1 do que nos M2, M3 e M4, Já os animais do GA apresentaram maior concentração sérica de LDL no M1 em comparação aos demais momentos. Os animais do GS apresentaram maior concentração sérica de LDL no M1 do que nos M2, M3, M4 e M5. Com exceção dos M6 e M7, os animais do GS também apresentaram maior concentração sérica de LDL no M1. Quando comparados os tratamentos, no M6 os animais do GA apresentaram menor concentração sérica de LDL do que os animais do GC e do GS.

Não foram encontradas diferenças na concentração sérica de HDL entre os momentos nos animais do GC. Porém estas diferenças foram encontradas nos animais do GA e do GS. Os animais do GA apresentaram maior concentração sérica de HDL no M1 do que nos M3 e M4. Os animais do GS apresentaram maior concentração sérica de HDL no M1 do que nos M2, M4, M5 e M6, e os animais no M7 apresentaram maior concentração sérica de HDL do que no M4. Quando comparados os tratamentos, no M1 observou-se que os animais do GS apresentaram maior concentração sérica de HDL do que os animais do GC. No M3 os animais do GA apresentaram menor concentração sérica de HDL do que os animais do GC, Não se observou diferença concentração sérica de triglicerídeos entre os momentos e os tratamentos ($P = 0,06$).

5.1.5 Cálcio e fósforo

Os valores médios e erro padrão de cálcio sérico de vacas no período de transição estão demonstrados na tabela 14.

Tabela 14 - Média e erro padrão para cálcio sanguíneo das vacas utilizadas no presente estudo no período de transição - São Paulo – 2016

Cálcio mg/dL	GC	GA	GS	P
(n = 34)	8,75 ^{AB}	8,50 ^B	9,43 ^A	0,03
	± 0,22	± 0,25	± 0,28	

Letras maiúsculas diferentes indicam $P \leq 0,05$ entre tratamentos.

GC: Grupo Controle; GA: Grupo que recebeu tratamento com antimicrobiano; GS: Grupo que recebeu tratamento com selante interno de teto.

Os animais do GS apresentaram maior concentração sérica de cálcio do que os animais do GA ($P = 0,03$). Não foram observadas diferenças na concentração sérica de cálcio entre os momentos ($P = 0,10$). Quanto a concentração sérica de fósforo, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os momentos e os tratamentos ($P = 0,78$).

5.1.6 Parâmetros imunológicos

Os valores médios e erro padrão das imunoglobulinas séricas submetidas à tratamento de secagem no período de transição estão demonstrados na tabela 15.

Tabela 15 - Média e erro padrão para IgM sérica das vacas utilizadas no presente estudo no período de transição - São Paulo - 2016

IgM mg/dL	GC	GA	GS	P
(n = 34)	1022 ^A	963 ^{AB}	864 ^B	0,04
	± 48,6	± 46,6	± 34,2	

Letras minúsculas diferentes indicam ($P \leq 0,05$) entre tratamentos.

GC: Grupo Controle; GA: Grupo que recebeu tratamento com antimicrobiano; GS: Grupo que recebeu tratamento com selante interno de teto.

Os animais do GC apresentaram maior concentração sérica de IgM do que os animais do GS ($P = 0,04$). Entre os momentos não houve diferença ($P = 0,68$) na concentração de IgM sérica. Além disso, não se encontrou diferença estatística na concentração sérica entre os momentos e tratamentos de IgG1 ($P = 0,64$) e IgG2 ($P = 0,93$).

Do mesmo modo não se observou diferença estatística entre os momentos e tratamentos na porcentagem de neutrófilos que fagocitaram partículas de zymozan ($P = 0,15$) porcentagem de neutrófilos reativos ao teste de NBT ($P = 0,68$) e na porcentagem de neutrófilos reativos ao teste de NBT estimulados por partículas de zymozan ($P = 0,70$).

5.1.7 Perfil Renal

Os valores médios e desvio padrão de ureia e creatinina de vacas submetidas à tratamento de secagem no período de transição estão demonstrados na tabela 16.

Tabela 16- Média e desvio padrão para perfil renal das vacas utilizadas no presente estudo no período de transição - São Paulo - 2016

Ureia mg/dL	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	P
								$\leq 0,0001$
GC	23,69 ^{Ab}	49,00 ^{Aa}	38,08 ^{Aa}	28,31 ^{Ab}	30,62 ^{Ab}	24,31 ^{Bb}	19,23 ^{Bb}	23,69 ^{Ab}
(n = 13)	± 2,68	± 2,76	± 3,19	± 2,70	± 2,86	± 2,75	± 3,15	± 2,68
GA	24,10 ^{Ab}	55,60 ^{Aa}	38,00 ^{Aab}	36,40 ^{Aab}	38,90 ^{Aab}	40,40 ^{Aa}	48,10 ^{Aa}	24,10 ^{Ab}
(n = 10)	± 5,11	± 9,01	± 5,99	± 6,07	± 6,72	± 6,74	± 4,17	± 5,11
GS	28,09 ^{Ac}	52,55 ^{Aa}	45,36 ^{Aab}	37,91 ^{Aabc}	41,00 ^{Aabc}	34,73 ^{ABbc}	32,09 ^{ABc}	28,09 ^{Ac}
(n = 11)	± 3,58	± 5,43	± 6,61	± 5,21	± 4,98	± 5,22	± 5,29	± 3,58
Creatinina mg/dL								$\leq 0,0001$
GC	1,20 ^{Aa}	1,19 ^{Aab}	1,38 ^{Aabc}	0,92 ^{Bcd}	0,88 ^{Ad}	0,88 ^{Ad}	0,82 ^{Bd}	
(n = 13)	± 0,11	± 0,10	± 0,30	± 0,10	± 0,08	± 0,07	± 0,07	
GA	1,18 ^{Aab}	1,41 ^{Aa}	1,34 ^{Aab}	1,21 ^{Aab}	1,11 ^{Ab}	1,08 ^{Ab}	1,12 ^{Aab}	
(n = 10)	± 0,04	± 0,09	± 0,09	± 0,07	± 0,06	± 0,06	± 0,05	
GS	1,33 ^{Aab}	1,39 ^{Aa}	1,19 ^{Aabc}	1,03 ^{ABcd}	0,99 ^{Ad}	0,95 ^{Ad}	0,94 ^{ABd}	
(n = 11)	± 0,08	± 0,06	± 0,08	± 0,05	± 0,04	± 0,04	± 0,06	

Letras maiúsculas diferentes indicam $P \leq 0,05$ entre os tratamentos e letras minúsculas diferentes indicam $P \leq 0,05$ entre os momentos.

M1: Momento 1 (no momento da secagem); M2: Momento 2 (no dia do parto); M3: Momento 3 (no terceiro dia após o parto); M4: Momento 4 (sétimo dia após o parto); M5: Momento 5 (décimo quinto dia após o parto); M6: Momento 6 (vigésimo primeiro dia após o parto); M7: Momento 7 (trigésimo dia após o parto); GC: Grupo controle; GA: Grupo que recebeu tratamento com antimicrobiano; GS: Grupo que recebeu tratamento com selante interno de teto.

Os animais do GC apresentaram no M2 maior concentração sérica de ureia do que nos M1, M4, M5, M6 e M7, e no M3 apresentaram maior concentração sérica de ureia do que nos M1, M6 e M7. Nos animais do GA observou-se que no M1 estes animais apresentaram menor concentração sérica de ureia do que nos M2, M6 e M7. Nos animais do GS, no M2 apresentaram maior concentração sérica de ureia do que nos M4, M5, M6 e M7 e os animais no M3 apresentaram maior concentração sérica de ureia do que os animais nos M1 e M7. Quando comparados os tratamentos, observou-se que nos M6 e M7 os animais do GA apresentaram maior concentração sérica de ureia do que os animais do GC.

Os animais do GC apresentaram maior concentração sérica de creatinina no M2 do que nos M4, M5, M6 e M7. Já nos animais do GA a maior quantidade de creatinina foi observada no M2 do que nos M5 e M6. A maior diferença foi observada nos animais do GS. Estes animais apresentaram maior concentração sérica de creatinina nos M1 e M2 do que nos M4, M5, M6 e M7. Quando comparados os tratamentos, observou-se que nos M4 e M7, os

animais do GA apresentaram maior concentração sérica de creatinina do que os animais do GC.

5.2 PARÂMETROS DO LEITE

5.2.1 Exame microbiológico

Na tabela 17 estão expressas as porcentagens de isolamentos dos principais patógenos causadores de mastite em amostras de leite assepticamente coletada de todos os quartos mamários das vacas utilizadas no presente estudo durante o período de transição.

Tabela 17 - Isolamento de patógenos causadores de mastite do leite de todos os quartos mamários das vacas utilizadas no presente estudo no período de transição - São Paulo - 2016

(continua)								
	Agentes % (n)	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
GC	Negativo	71,15 (37)	76,92 (40)	85,42 (41)	80,77 (42)	84,09 (37)	78,43 (40)	73,08 (38)
	<i>Corynebacterium</i>	9,62 (5)	0	2,08 (1)	0	0	0	0
	<i>bovis</i>							
	<i>Escherichia coli</i>	0	3,85 (2)	0	0	0	0	1,92 (1)
	<i>Klebsiella spp</i>	0	0	2,08 (1)	1,92 (1)	0	1,96 (1)	1,92 (1)
	<i>Klebsiella spp</i> +	0	0	0	0	0	0	1,92 (1)
	<i>S. haemolyticus</i>							
	<i>Micrococcus spp</i>	0	0	0	0	4,55 (2)	0	0
	<i>Pseudomonas</i>	0	0	0	0	4,55 (2)	1,96 (1)	0
	<i>spp</i>							
	<i>Staphylococcus</i>	0	3,85 (2)	4,17 (2)	0	0	0	1,92 (1)
	<i>aureus</i>							
	<i>S. aureus</i> +	1,92 (1)	0	0	0	0	0	0
	<i>Enterococcus</i>							
	<i>spp</i>							
	<i>Staphylococcus</i>	1,92 (1)	1,92 (1)	0	1,92 (1)	2,27 (1)	5,88 (3)	0
	<i>chromogenes</i>							
	<i>S. chromogenes</i>	1,92 (1)	0	0	0	0	0	0
	+							
	<i>Corynebacterium</i>							
	<i>bovis</i>							
	<i>Staphylococcus</i>	3,85 (2)	3,85 (2)	6,25 (3)	3,85 (2)	2,27 (1)	1,96 (1)	3,85 (2)
	<i>epidermidis</i>							
	<i>S. epidermidis</i> +	0	0	0	1,92 (1)	0	0	0
	<i>S. chromogenes</i>							

							(continuação)	
<i>S. epidermidis</i> + <i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	1,92 (1)	
<i>S. epidermidis</i> + <i>S. haemolyticus</i>	0	0	0	0	0	0	1,92 (1)	
<i>Staphylococcus</i> <i>haemolyticus</i>	0	1,92 (1)	0	5,77 (3)	0	1,96 (1)	7,69 (4)	
<i>Staphylococcus</i> <i>hyicus</i>	0	0	0	1,92 (1)	0	0	0	
<i>Streptococcus</i> <i>agalactiae</i>	5,77 (3)	3,84 (2)	0	0	2,27 (1)	3,92 (2)	1,92 (1)	
<i>S. agalactiae</i> + <i>Pseudomonas</i> <i>spp</i>	0	0	0	0	0	1,96 (1)	0	
<i>Streptococcus</i> <i>uberis</i>	1,92 (1)	3,84 (2)	0	1,92 (1)	0	1,96 (1)	1,92 (1)	
GA	Negativo	86,84 (34)	95 (38)	97,5 (39)	95 (38)	92,5 (37)	92,5 (37)	92,5 (37)
<i>Contaminação</i>	0	0	0	0	0	2,50 (1)	0	
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	0	0	2,50 (1)	
<i>Pseudomonas</i> <i>spp</i>	0	0	0	0	0	5 (2)	0	
<i>Pseudomonas</i> <i>spp</i> + <i>S.</i> <i>epidermidis</i>	0	0	0	0	0	0	2,50 (1)	
<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	2,63 (1)	0	0	0	2,50 (1)	2,63 (1)	0	
<i>Staphylococcus</i> <i>epidermidis</i>	2,63 (1)	0	0	5 (2)	2,50 (1)	0	0	
<i>S. epidermidis</i> + <i>S. haemolyticus</i>	0	0	0	0	0	0	2,50 (1)	
<i>Staphylococcus</i> <i>haemolyticus</i>	5,26 (2)	2,50 (1)	0	0	0	0	0	
<i>Staphylococcus</i> <i>hyicus</i>	0	2,50 (1)	0	0	0	0	0	
<i>Streptococcus</i> <i>uberis</i>	2,63 (1)	0	2,50 (1)	0	2,50 (1)	0	0	
GS	Negativo	66,66 (32)	68,18 (30)	75 (33)	86,36 (38)	88,64 (39)	75 (33)	93,18 (41)
<i>Contaminação</i>	0	2,27 (1)	0	0	0	2,27 (1)	0	
<i>Corynebacterium</i> <i>bovis</i>	6,25 (3)	0	0	0	0	0	0	
<i>Corynebacterium</i> <i>bovis</i> + <i>S.</i> <i>haemolyticus</i>	2,08 (1)	0	0	0	0	0	0	
<i>Enterococcus</i> <i>spp</i>	2,08 (1)	0	0	0	0	0	0	

							(conclusão)
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	4,55 (2)	0	2,27 (1)
<i>Klebsiella spp</i>	0	0	0	0	0	2,27 (1)	0
<i>Micrococcus spp</i>	0	0	0	0	2,27 (1)	0	0
<i>Pseudomonas spp</i>	0	2,27 (1)	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas spp+ Klebsiella spp</i>	0	0	2,27 (1)	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,08 (1)	2,27 (1)	2,27 (1)	4,55 (2)	2,27 (1)	2,27 (1)	0
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	2,08 (1)	0	0	2,27 (1)	0	2,27 (1)	2,27 (1)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,08 (1)	4,55 (2)	6,82 (3)	4,55 (2)	2,27 (1)	6,82 (3)	
<i>S. epidermidis + S. haemolyticus</i>	0	0	0	0	0	2,27 (1)	0
<i>S. epidermidis + Klebsiella spp</i>	0	0	0	2,27 (1)	0	0	0
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	8,33 (4)	2,27 (1)	4,55 (2)	0	0	6,82 (3)	2,27 (1)
<i>S. haemolyticus + S. chromogenes</i>	4,17 (2)	2,27 (1)	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus hyicus</i>	0	2,27 (1)	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus warneri</i>	0	2,27 (1)	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus agalactiae</i>	2,08 (1)	0	0	0	0	0	0
<i>S. agalactiae + S. haemolyticus</i>	2,08 (1)	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus uberis</i>	0	11,36 (5)	9,09 (4)	0	0	0	0

M1: Momento 1 (no momento da secagem); M2: Momento 2 (no dia do parto); M3: Momento 3 (no terceiro dia após o parto); M4: Momento 4 (sétimo dia após o parto); M5: Momento 5 (décimo quinto dia após o parto); M6: Momento 6 (vigésimo primeiro dia após o parto); M7: Momento 7 (trigésimo dia após o parto); GC: Grupo controle; GA: Grupo que recebeu tratamento com antimicrobiano; GS: Grupo que recebeu tratamento com selante interno de teto.

5.2.2 CMT

Na tabela 18 estão dispostos os valores médios e erro padrão dos escores obtidos através do *California Mastitis* (CMT) do leite de no período de transição utilizadas no presente estudo.

Tabela 18 - Média e erro padrão dos escores obtidos pelo exame de CMT realizado em todos os quartos mamários das vacas no período de transição - São Paulo - 2016

CMT	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	P
								0,001
GC	2,82 ^{Aa}	1,62 ^{Aab}	1,37 ^{Ab}	0,85 ^{Ab}	1,10 ^{Ab}	1,11 ^{Ab}	0,71 ^{Ab}	
(n = 13)	± 0,23	± 1,39	± 0,19	± 0,17	± 0,18	± 0,21	± 0,17	
GA	2,55 ^{Aa}	0,33 ^{Bb}	0,30 ^{Ab}	0,38 ^{Ab}	0,15 ^{Ab}	0,33 ^{Ab}	0,25 ^{Ab}	
(n = 10)	± 0,20	± 0,12	± 0,11	± 0,13	± 0,08	± 0,10	± 0,10	
GS	2,34 ^{Aa}	1,95 ^{Aab}	1,21 ^{Abc}	0,85 ^{Abc}	0,65 ^{Ac}	0,59 ^{Ac}	0,66 ^{Ac}	
(n = 11)	± 0,20	± 0,22	± 0,21	± 0,15	± 0,16	± 0,15	± 0,16	

Letras maiúsculas diferentes indicam $P \leq 0,05$ entre os tratamentos e letras minúsculas diferentes indicam $P \leq 0,05$ entre os momentos.

M1: Momento 1 (no momento da secagem); M2: Momento 2 (no dia do parto); M3: Momento 3 (no terceiro dia após o parto); M4: Momento 4 (sétimo dia após o parto); M5: Momento 5 (décimo quinto dia após o parto); M6: Momento 6 (vigésimo primeiro dia após o parto); M7: Momento 7 (trigésimo dia após o parto); GC: Grupo controle; GA: Grupo que recebeu tratamento com antimicrobiano; GS: Grupo que recebeu tratamento com selante interno de teto.

Os animais do GC apresentaram maior escore de CMT no M1 quando comparado aos M3, M4, M5, M6 e M7. Os animais do GA também apresentaram maior escore de CMT no M1 quando comparado aos demais momentos do experimento. E os animais do GS apresentaram maior escore de CMT no M1 quando comparado ao M3, M4, M5, M6 e M7, assim como M2 também apresentou maior escore do que M5, M6 e M7. Foi observada diferença entre os tratamentos onde o GA apresentou menor escore de CMT no M2 quando comparado ao GC e ao GS.

5.2.3 Contagem de células somáticas

Nas tabelas 19 e 20 estão dispostos os valores médios e erro padrão apresentados em escala logarítmica da contagem de células somáticas automática por momento e tratamento do leite de vacas no período de transição.

Tabela 19 - Média e erro padrão dos escores obtidos pelo exame de contagem automática de células somáticas em todos os quartos mamários das realizado em vacas submetidas a tratamento de secagem no período de transição - São Paulo - 2016

CCS	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	P
Automática								
								$\leq$ 0,001
(n = 34)	5,66 ^a	5,46 ^{ab}	5,38 ^b	5,04 ^c	4,79 ^{cd}	4,85 ^{cd}	4,63 ^d	
	$\pm 0,09$	$\pm 0,10$	$\pm 0,08$	$\pm 0,09$	$\pm 0,08$	$\pm 0,08$	$\pm 0,09$	

Letras minúsculas diferentes indicam $P \leq 0,05$ entre os momentos.

M1: Momento 1 (no momento da secagem); M2: Momento 2 (no dia do parto); M3: Momento 3 (no terceiro dia após o parto); M4: Momento 4 (sétimo dia após o parto); M5: Momento 5 (décimo quinto dia após o parto); M6: Momento 6 (vigésimo primeiro dia após o parto); M7: Momento 7 (trigésimo dia após o parto); GC: Grupo controle; GA: Grupo que recebeu tratamento com antimicrobiano; GS: Grupo que recebeu tratamento com selante interno de teto.

Os animais apresentaram maior escore de CCS no M1 quando comparado com M4, M5, M6 e M7. Observou-se também que os animais apresentaram maior CCS automática no M3 quando comparado com M4, M5, M6 e M7, e que os animais em M4 apresentaram maior escore de CCS do que os animais em M7.

Tabela 20 - Média e erro padrão dos escores obtidos pelo exame de contagem automática de células somáticas em todos os quartos mamários das realizado em vacas submetidas a tratamento de secagem no período de transição - São Paulo - 2016

CCS	GC	GA	GS	P
Automática				
				$P \leq 0,0001$
(n = 34)	5,46 ^A	4,73 ^C	5,15 ^B	
	$\pm 0,05$	$\pm 0,06$	$\pm 0,06$	

Letras minúsculas diferentes indicam ($P \leq 0,05$) entre tratamentos.

GC: Grupo Controle; GA: Grupo que recebeu tratamento com antimicrobiano; GS: Grupo que recebeu tratamento com selante interno de teto

Os animais do GA apresentaram menor escore de CCS automática quando comparado com o GC e GS, O GC foi o grupo que apresentou maior escore de CCS automática quando comparado aos demais.

Nas tabelas 21 e 22 estão dispostos os valores médios e erro padrão apresentados em escala logarítmica da CCS microscópica dos momentos e tratamentos de vacas no período de transição utilizadas no presente estudo.

Tabela 21 - Média e erro padrão dos escores obtidos pela determinação de CCS microscópica do leite em todos os quartos mamários das vacas no período de transição - São Paulo - 2016

CCS	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	P
Microscópica								0,001
(n = 34)	5,71 ^a	5,59 ^a	5,12 ^b	4,43 ^c	4,39 ^c	4,34 ^c	4,37 ^c	
	± 0,08	± 0,08	± 0,08	± 0,08	± 0,08	± 0,08	± 0,08	

Letras minúsculas diferentes indicam $P \leq 0,05$ entre os momentos.

M1: Momento 1 (no momento da secagem); M2: Momento 2 (no dia do parto); M3: Momento 3 (no terceiro dia após o parto); M4: Momento 4 (sétimo dia após o parto); M5: Momento 5 (décimo quinto dia após o parto); M6: Momento 6 (vigésimo primeiro dia após o parto); M7: Momento 7 (trigésimo dia após o parto); GC: Grupo controle; GA: Grupo que recebeu tratamento com antimicrobiano; GS: Grupo que recebeu tratamento com selante interno de teto.

Os animais apresentaram maior escore de CCS microscópica no M1 e M2 quando comparado com M3, M4, M5, M6 e M7, E os animais no M3 apresentaram maior escore de CCS microscópica quando comparado aos M4, M5, M6 e M7.

Tabela 22- Média e erro padrão dos escores obtidos pelo exame de contagem automática de células somáticas em todos os quartos mamários das realizado em vacas no período de transição - São Paulo - 2016

CCS	GC	GA	GS	P
Microscópica				$P \leq 0,0001$
(n = 34)	5,20 ^A	4,34 ^C	5,01 ^B	
	± 0,05	± 0,06	± 0,05	

Letras minúsculas diferentes indicam ($P \leq 0,05$) entre tratamentos.

GC: Grupo Controle; GA: Grupo que recebeu tratamento com antimicrobiano; GS: Grupo que recebeu tratamento com selante interno de teto.

Foi observada diferença entre os tratamentos, onde GA apresentou menor escore de CCS microscópica quando comparado aos demais tratamentos, E GC apresentou maiores escores de CCS quando comparado ao GA e GS.

Na tabela 23 estão dispostos os valores médios e erro padrão obtidos através da contagem diferencial de leucócitos do leite de vacas no período de transição.

Tabela 23 - Média e erro padrão da contagem diferencial de leucócitos do leite em todos os quartos mamários das vacas no período de transição - São Paulo - 2016

Mononuclear	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	<i>P</i>
								≤ 0,0001
GC	5,96 ^{Aa}	5,90 ^{Aa}	5,19 ^{Aab}	4,48 ^{ABc}	4,57 ^{ABc}	4,48 ^{ABc}	4,25 ^{Ac}	
(n = 13)	± 0,13	± 5,90	± 0,12	± 0,15	± 0,17	± 0,12	± 0,15	
GA	5,15 ^{Aa}	4,40 ^{Bab}	4,12 ^{Bab}	3,78 ^{Bb}	3,80 ^{Bb}	3,81 ^{Ab}	3,96 ^{Ab}	
(n = 10)	± 0,13	± 0,15	± 0,17	± 0,12	± 0,14	± 0,14	± 0,09	
GS	5,43 ^{Aab}	5,73 ^{Aa}	5,22 ^{Aab}	4,62 ^{ABc}	4,22 ^{ABc}	4,28 ^{Ac}	4,33 ^{Ac}	
(n = 11)	± 0,12	± 0,13	± 0,15	± 0,13	± 0,11	± 0,12	± 0,11	
Polimorfonucleae								≤ 0,0001
GC	4,58 ^{Aab}	5,20 ^{Aa}	4,10 ^{Aabc}	2,74 ^{Ab}	3,16 ^{Ab}	3,02 ^{Ab}	2,82 ^{Ac}	
(n = 13)	± 0,27	± 0,26	± 0,35	± 0,36	± 0,35	± 0,36	± 0,32	
GA	3,76 ^{Aa}	2,55 ^{Bab}	1,77 ^{Bab}	1,00 ^{Ab}	1,13 ^{Ab}	1,18 ^{Ab}	1,30 ^{Ab}	
(n = 10)	± 0,41	± 0,35	± 0,37	± 0,27	± 0,33	± 0,34	± 0,34	
GS	4,68 ^{Aa}	4,80 ^{Aa}	3,91 ^{Ab}	3,17 ^{Aabc}	1,76 ^{Ac}	1,79 ^{Ac}	2,59 ^{ABc}	
(n = 11)	± 0,29	± 0,37	± 0,42	± 0,36	± 0,36	± 0,37	± 0,37	

Letras maiúsculas diferentes indicam $P \leq 0,05$ entre os tratamentos e letras minúsculas diferentes indicam $P \leq 0,05$ entre os momentos.

M1: Momento 1 (no momento da secagem); M2: Momento 2 (no dia do parto); M3: Momento 3 (no terceiro dia após o parto); M4: Momento 4 (sétimo dia após o parto); M5: Momento 5 (décimo quinto dia após o parto); M6: Momento 6 (vigésimo primeiro dia após o parto); M7: Momento 7 (trigésimo dia após o parto); GC: Grupo controle; GA: Grupo que recebeu tratamento com antimicrobiano; GS: Grupo que recebeu tratamento com selante interno de teto.

Os animais do GC apresentaram maior contagem de leucócitos mononucleares no M1 e M2 do que nos M4, M5, M6 e M7, também se observou maior contagem de leucócitos mononucleares em M3 do que em M4 e M7. Os animais do GA apresentaram maior contagem de leucócitos mononucleares em M1 do que em M4, M5, M6 e M7. Os animais do GS apresentaram maior contagem de leucócitos mononucleares do leite no M2 quando comparado com M4, M5, M6 e M7, também observou-se maior contagem em M1 e M3 quando comparado à M5, M6 e M7. Entre os tratamentos foi verificado que o GA difere dos demais, apresentando menor contagem de leucócitos mononucleares do leite em M2 e M3, e este mesmo grupo apresentou menor contagem de leucócitos mononucleares do leite no M4 que GC, e em M5 apresentou menor contagem de leucócitos mononucleares do leite quando comparado ao GC.

Ao analisar a contagem de leucócitos polimorfonucleares do leite dos animais do GC, verificamos que M2 apresentou maior contagem quando comparado aos M4, M5, M6 e M7, e que M7 apresentou menor contagem de leucócitos polimorfonucleares do leite que M1, M4, M5 e M6. Os animais do GA apresentaram maior contagem de células polimorfonucleares do leite em M1 que M4, M5, M6 e M7. Os animais do GS apresentam maior contagem em M1 e M2 do que M3, M5, M6 e M7. Foi verificada diferença entre os tratamentos no M2 e M3, onde GA apresentou menor contagem de leucócitos polimorfonucleares no leite do que GC e GS.

Na tabela 24 estão dispostos os valores médios e erro padrão dos escores do exame microbiológico do leite de vacas submetidas a tratamento de secagem no período de transição.

Tabela 24 - Média e erro padrão dos escores obtidos pelo exame microbiológico do leite em todos os quartos mamários das vacas no período de transição - São Paulo – 2016

Microbiológico	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	P
								0,001
GC	0,88 ^{Aa}	0,85 ^{Aab}	0,50 ^{Abc}	0,33 ^{Ac}	0,40 ^{Ac}	0,35 ^{Ac}	0,30 ^{Ac}	
(n = 13)	± 0,05	± 0,05	± 0,07	± 0,07	± 0,07	± 0,07	± 0,06	
GA	0,69 ^{Aa}	0,15 ^{Bb}	0,07 ^{Bb}	0,07 ^{Ab}	0,08 ^{Ab}	0,10 ^{Ab}	0,15 ^{Ab}	
(n = 10)	± 0,08	± 0,06	± 0,04	± 0,04	± 0,04	± 0,05	± 0,06	
GS	0,81 ^{Aa}	0,79 ^{Aa}	0,52 ^{Aab}	0,43 ^{Aab}	0,23 ^{Ab}	0,23 ^{Ab}	0,30 ^{Ab}	
(n = 11)	± 0,07	± 0,06	± 0,08	± 0,08	± 0,06	± 0,07	± 0,07	

Letras maiúsculas diferentes indicam $P \leq 0,05$ entre os tratamentos e letras minúsculas diferentes indicam $P \leq 0,05$ entre os momentos.

M1: Momento 1 (no momento da secagem); M2: Momento 2 (no dia do parto); M3: Momento 3 (no terceiro dia após o parto); M4: Momento 4 (sétimo dia após o parto); M5: Momento 5 (décimo quinto dia após o parto); M6: Momento 6 (vigésimo primeiro dia após o parto); M7: Momento 7 (trigésimo dia após o parto); GC: Grupo controle; GA: Grupo que recebeu tratamento com antimicrobiano; GS: Grupo que recebeu tratamento com selante interno de teto.

Nas análises do exame de microbiológico dos animais do GC foi observado que em M1 foi encontrado maior porcentagem de quartos mamários onde foi isolado patógeno(s) causadores de mastite do que em M3, M4, M5, M6 e M7, assim como em M2 também foi observada maior porcentagem de quartos mamários onde foi isolado patógeno(s) causadores de mastite quando comparado com M4, M5, M6 e M7. No GA foi observado maior porcentagem de quartos mamários onde foi isolado patógenos causadores de mastite no M1 ao compará-lo com os demais momentos do experimento. No GS foi observada maior porcentagem de quartos mamários onde foi isolado patógenos causadores de mastite em M1 e M2 quando comparado com M5, M6 e M7. Quanto aos tratamentos observa-se que o GA

apresentou menor porcentagem de quartos mamários onde foi isolado patógenos causadores de mastite em M2 e M3 quando comparado com os GC e GS.

Na tabela 25 são apresentados os valores médios e erro padrão da quantificação de imunoglobulinas do leite de vacas no período de transição,

Tabela 25 - Media e erro padrão da dosagem das imunoglobulinas do leite em todos os quartos mamários das vacas no período de transição - São Paulo – 2016

IgM	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	<i>P</i>
								<0,0001
GC	27,26 ^{Aa}	29,28 ^{Ba}	23,04 ^{Ba}	16,13 ^{Bb}	14,61 ^{Bb}	14,57 ^{Ab}	12,60 ^{ABb}	
(n = 13)	± 16,89	± 18,43	± 17,06	± 16,32	± 18,26	± 12,56	± 16,83	
GA	18,27 ^{Ba}	19,09 ^{Ca}	15,26 ^{Cab}	9,79 ^{Bbc}	9,65 ^{Bbc}	7,49 ^{Bc}	6,48 ^{Bc}	
(n = 10)	± 15,55	± 16,79	± 12,38	± 6,81	± 7,69	± 5,88	± 6,00	
GS	41,32 ^{Aab}	45,67 ^{Aa}	36,99 ^{Aabc}	25,93 ^{Ac}	28,58 ^{Abcd}	22,40 ^{Ade}	17,84 ^{Ae}	
(n = 11)	± 24,02	± 18,82	± 22,26	± 18,71	± 20,94	± 20,79	± 19,73	
IgG1								<i>P</i>
								<0,0001
GC	8,79 ^{Ab}	24,4 ^{Aa}	10,64 ^{Ab}	9,67 ^{Abc}	7,54 ^{Abc}	6,28 ^{Ac}	6,24 ^{Ac}	
(n = 13)	±7,29	±25,33	±9,77	±12,52	±6,20	±6,04	±6,30	
GA	12,46 ^{Aa}	10,66 ^{Ba}	7,12 ^{Aa}	5,76 ^{Aa}	5,64 ^{Aa}	8,44 ^{Aa}	5,09 ^{Aa}	
(n = 10)	±18,95	±10,96	±4,70	±3,51	±2,26	±16,65	±1,55	
GS	12,91 ^{Aa}	6,76 ^{Bb}	5,62 ^{Bbc}	3,38 ^{Bd}	3,42 ^{Bcd}	5,75 ^{Ac}	5,19 ^{Abcd}	
(n = 11)	±11,20	±6,31	±5,21	±3,04	±2,88	±8,22	±4,45	
IgG2								<i>P</i>
								<0,0001
GC	4,67 ^{Aa}	4,80 ^{Aa}	2,54 ^{Aa}	2,01 ^{Aa}	1,77 ^{Aa}	1,87 ^{Aa}	1,88 ^{Aa}	
(n = 13)	±7,73	±5,19	±2,79	±2,31	±2,27	±2,21	±1,63	
GA	4,16 ^{Aa}	5,35 ^{Aa}	2,62 ^{Aa}	2,10 ^{Aa}	1,64 ^{Aa}	1,57 ^{Aa}	1,52 ^{Aa}	
(n = 10)	±6,85	±5,45	±3,76	±1,98	±1,58	±1,38	±1,45	
GS	3,13 ^{Aa}	4,87 ^{Aa}	1,93 ^{Aa}	0,87 ^{Ab}	1,04 ^{Aab}	1,54 ^{Aab}	1,19 ^{Aab}	
(n = 11)	±2,20	±9,18	±1,60	±0,52	±0,88	±2,60	±0,98	

Letras maiúsculas diferentes indicam $P \leq 0,05$ entre os tratamentos e letras minúsculas diferentes indicam $P \leq 0,05$ entre os momentos.

M1: Momento 1 (no momento da secagem); M2: Momento 2 (no dia do parto); M3: Momento 3 (no terceiro dia após o parto); M4: Momento 4 (sétimo dia após o parto); M5: Momento 5 (décimo quinto dia após o parto); M6: Momento 6 (vigésimo primeiro dia após o parto); M7: Momento 7 (trigésimo dia após o parto); GC: Grupo controle; GA: Grupo que recebeu tratamento com antimicrobiano; GS: Grupo que recebeu tratamento com selante interno de teto.

Os animais do GC apresentaram maior concentração de IgM no leite nos M1, M2 e M3 do que nos M4, M5, M6 e M7. Já no GA, nos M1 e M2 apresentaram maior concentração de IgM no leite do que nos M4, M5, M6 e M7, No M3 apresentaram maior concentração de IgM do que nos M6 e M7, No GS, no M1 apresentaram maior concentração de IgM no leite que nos M4, M6 e M7, No M2 a concentração foi maior do que no M4, M5, M6 e M7, No M3 foi maior do que nos M6 e M7 e nos M4 e M5 foram maiores do que no M7. Ao comparar os tratamentos, observou-se que no M1, os GC e GS apresentaram maior concentração de IgM no leite do que o GA. No M2, o GS apresentou maior concentração de IgM no leite do que o GA e GC. Já o GC apresentou maior concentração de IgM no leite do que os GS e o GA, No M3, O GC apresentou maior concentração de IgM no leite do que o GA e GS. E o GS apresentou maior concentração de IgM no leite do que o GC e o GA. Nos M4, M5, o GS apresentou maior concentração de IgM no leite do que os GC e GA. No M6 o GA apresentou menor quantidade de IgM do que os GC e GS. E no M7 o GS apresentou maior concentração de IgM no leite quando comparado ao GA.

Nas amostras de leite do GC, no M1 observou-se maior concentração de IgG1 no leite do que nos M6 e M7, No M2 observou-se maior concentração de IgG1 no leite do que nos M1, M3, M4, M5, M6 e M7, No M3 apresentou maior concentração de IgG1 no leite do que nos M6 e M7, No GS, observou-se que no M1 apresentou maior concentração de IgG1 no leite do que nos M2, M3, M4, M5, M6 e M7. No M2 houve maior concentração de IgG1 no leite do que nos M4, M5 e M6 e no M3 apresentou maior concentração de IgG1 no leite do que no M4. Na comparação entre os tratamentos, observou-se no M2 que o GC apresentou maior concentração de IgG1 no leite do que os GA e GS. No M3, o GC apresentou maior quantidade de IgG1 do que o GS, No M4 e M5 o GC e o GA apresentaram maior concentração de IgG1 no leite do que o GS.

No GS observou-se que nos M1, M2 e M3 apresentaram maior concentração de IgG2 no leite do que no M4. Ao comparar os tratamentos, observou-se que no M4 o GS apresentou menor concentração de IgG2 no leite do que os GC e GA.

5.3 MODELOS DE REGRESSÃO LOGÍSTICA

Em modelo de regressão logística para alta CCS nos quartos mamários de bovinos durante o período de transição, foi ajustado considerando as seguintes variáveis ($P = 0,20$; Tabela 26).

Tabela 26 - Variáveis elegíveis para entrar no modelo final de regressão logística ($P \leq 0,20$) baseadas no modelo de escore de contagem de células somáticas - São Paulo – 2016

Variáveis	Odds Ratio	Valor de P	95% Intervalo de confiança
Controle	Referência valor P	$\leq 0,0001$	
Antimicrobiano	0,239		(0,122-0,466)
Selante	0,745		(0,382-1,452)
M1	Referência valor P	$\leq 0,0001$	
M2	0,141		(0,016-1,246)
M3	0,043		(0,005-0,354)
M4	0,021		(0,026-0,174)
M5	0,03		(0,003-0,247)
M6	0,03		(0,004-0,247)
M7	0,03		(0,004- 0,278)
Hematócrito	1,043	0,08	(0,991-1,099)
CHCM	0,957	0,05	(0,909-1,007)
Proteína	2,121	0,0001	(1,436-3,133)
Fibrinogênio	1,0016	0,002	(1,0005- 1,0027)
Ureia	0,988	0,09	(0,974-1,002)
Creatinina	1,800	0,12	(0,815-3,973)
LDL	1,104	0,008	(1,020-1,195)
Albumina	0,888	0,065	(0,772-1,021)

Neste modelo foi encontrado que apenas seis variáveis foram estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$) para estimar a probabilidade de um animal apresentar alta CCS (Tabela 27).

Tabela 27 - Modelo final de regressão logística ($P \leq 0,05$) das variáveis associadas à alta contagem de célula somática no período de transição - São Paulo – 2016

Variável	Odds Ratio (95% I.C)	Valor de P
Antimicrobiano	0,258 (0,112-0,599)	0,002
M3	0,041 (0,004 - 0,390)	0,005
M4	0,015 (0,0016 - 0,1477)	$\leq 0,0001$
M5	0,020 (0,002 - 0,187)	0,001
M6	0,022 (0,002-0,202)	0,001
M7	0,022 (0,002 - 0,202)	0,001
Proteína	5,084 (1,177 - 14,609)	0,003
Fibrinogênio	1,001 (1,00008 - 1,0027)	0,04
Albumina	4,307 (1,136 - 16,329)	0,03
Interação Proteína/Albumina	0,804 (0,669 - 0,966)	0,02

Além disso, na tabela 28 está demonstrado um modelo de regressão logística para isolamento de patógenos causadores de mastite nos quartos mamários de bovinos durante o período de transição, foi ajustado considerando as seguintes variáveis ($P = 0,20$).

Tabela 28 - Variáveis elegíveis para entrar no modelo final de regressão logística ($P \leq 0,20$) baseadas no isolamento de patógenos causadores de mastite bovina - São Paulo – 2016

Variáveis	Odds Ratio	Valor de P	95% Intervalo de confiança
Controle	Referência valor $P =$	0,0006	
Antimicrobiano	0,292		0,150-0,571
Selante	0,805		0,438-1,480
M1	Referência valor P	$= 0,38$	
M2	0,619		0,236-1,624
M3	0,433		0,164-1,145
M4	0,383		0,144-1,019
M5	0,337		0,126-0,906
M6	0,550		0,210-1,445
M7	0,550		0,210-1,445
Hematócrito	1,032	0,15	0,986-1,081
CHCM	0,936	0,01	0,883-0,993
Proteína	1,967	0,0003	1,347-2,872
Ureia	0,981	0,01	0,967-0,996
BHB	0,673	0,08	0,414-1,09
Fosforo	0,886	0,19	0,739-1,063
Colesterol	1,002	0,20	0,999-1,006
Triglicerídeos	1,029	0,0004	1,012-1,046
LDL	1,059	0,09	0,990-1,132
HDL	1,014	0,01	1,003-1,026
Albumina	0,847	0,02	0,719-0,998

Neste modelo, observou-se que apenas quatro variáveis foram estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$) para estimar a probabilidade de um animal apresentar exame bacteriológico positivo, ou seja, mastite infecciosa (Tabela 29).

Tabela 29 - Modelo final de regressão logística ($P \leq 0,05$) das variáveis associadas ao isolamento de patógenos causadores de mastite bovina - São Paulo – 2016

Variáveis	Odds Ratio (95% I.C)	Valor de P
Tratamento 2	0,371 (0,175 - 0,787)	0,01
Proteína	1,632 (1,019 - 2,615)	0,04
Triglicerídeos	1,021 (1,003-1,039)	0,02

6 DISCUSSÃO

São inúmeras as motivações para compreensões das alterações que ocorrem durante o período de transição e sua inter-relação com a saúde da glândula mamária. Neste contexto foi possível avaliar uma gama de variáveis, dentre parâmetros hematológicos, bioquímicos e imunológicos e estabelecer sua associação com ocorrência de mastite neste período.

6.1 ERITROGRAMA E LEUCOGRAMA

Os parâmetros hematológicos contribuíram para avaliação clínica dos animais durante os sete momentos experimentais, apesar de todos os parâmetros se apresentaram dentro dos valores de referência (KANEKO, 2008; SMITH 2014).

Houve variação do eritograma quando pode-se observar maiores valores de hemácias, hemoglobina e hematócrito nos animais ao parto (M2) em relação a três semanas pós parto (M6) e um mês após o parto (M7), assim como demonstrado por Saut e Birgel Júnior (2012), os valores de hemácias, hemoglobina e hematócrito diminuem nos dias subsequentes ao parto.

No presente estudo houve aumento na porcentagem de neutrófilos no momento do parto no GA, o que corrobora com os achados de Todorović e Davidović (2012), devido ao aumento nas concentrações séricas de glicocorticoides no momento do parto, o que induz a liberação de neutrófilos pela medula óssea. O aumento menos evidente (não estatisticamente diferente) também foi observado nos animais do GC e GS, o que deve-se provavelmente à migração de neutrófilos da corrente sanguínea para a glândula mamária infectada nestes animais, já que os animais destes grupos apresentaram maior porcentagem de quartos mamários infectados ao parto que GA. Neste contexto, sabe-se que, logo após a entrada do patógeno invasor, as células epiteliais juntamente com os leucócitos residentes iniciam a resposta inflamatória necessária para eliminar a infecção, ou seja, a produção e liberação de quimiotáticos para o rápido recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório. Paape et al. (2003) e Ingvarsen e Moyes (2012) descreveram que a primeira linha de defesa celular do organismo é realizada pelos neutrófilos, que tem por função fagocitar e produzir ERO para matar os patógenos invasores. Congruente a isto, Gomes et al. (2011) encontraram maior

porcentagem de neutrófilos no colostro proveniente de glândulas mamárias infectadas, ao contrário da maior porcentagem de macrófagos no colostro em vacas com glândula mamária sadia, mesmo considerando a alta celularidade do colostro nas glândulas mamárias sadias e infectadas.

Os animais dos três grupos experimentais apresentaram redução da porcentagem e dos valores absolutos de eosinófilos no dia do parto (M2). O momento do parto é caracterizado por ser um momento muito estressante para o animal, neste momento há grande liberação de glicocorticoides na circulação, o que tem impacto no perfil hematológico, gerando um quadro que é chamado de leucograma de estresse. Resultados semelhantes foram encontrados (FAGLIARI et al., 1998; MEGLIA et al., 2005; SAUT; BIRGEL JÚNIOR, 2006), onde estudos diferentes mostram que obtiveram queda nos valores absolutos de neutrófilos e eosinófilos nos momentos pós-parto imediato, e uma elevação nos valores absolutos de monócitos nos momentos seguintes ao parto.

6.2 PROTEINOGRAMA

Quanto as proteínas totais, observa-se que nos momentos próximo ao parto (M2, M3 e M4) os valores caem. Ademais, observou-se maior concentração sérica de proteína total nos animais do GC do que no GS e GA, e maior concentração sérica de proteína total no GS do que no GA, o que deve estar relacionado às infecções intramamárias. Durante a inflamação, a infecção e a injúria do tecido leva à produção e liberação de citocinas pelas células de defesa, levando a produção de proteínas de fase aguda positivas pelos hepatócitos, com concomitante decréscimo na síntese de proteínas de fase aguda negativas, como a albumina (Murata et al., 2004). No presente estudo, as diferenças nas concentrações séricas de albumina entre os momentos não foram tão evidentes quanto a da proteína total, sugerindo mudanças nas concentrações séricas de globulinas, incluindo as proteínas de fase aguda positivas e/ou das imunoglobulinas.

Em um estudo comparando duas dietas, Seifi et al. (2010) não encontraram diferenças quando compararam 21 dias pré-parto, três e 21 dias pós-parto, o que difere do presente estudo, onde foi verificado diferença nas concentrações de proteína sérica entre o terceiro (M3) e 21 dias pós-parto (M6). Piccione et al. (2012) em experimento realizado com vacas holandesas encontraram aumento na concentração de proteína total quando compararam o

período pós-parto com a 5^a e 15^a semanas de lactação, final de lactação e período de secagem, corroborando com os achados do presente estudo. Além disto, congruente ao presente estudo, Piccione et al. (2012) não encontraram alterações significativas na concentração sérica de albumina. A diminuição nos níveis de proteína total nos momentos do parto da primeira semana pós parto ocorrem justamente porque neste período ocorre a colostrogênese, então grande parte das proteínas são mobilizadas para a glândula mamária para a formação de imunoglobulinas que compõem o colostro (BELL; BURHANS; OVERTON, 2000).

6.3 PERFIL METABÓLICO

No presente estudo observou-se um pico de glicose no momento do parto. O momento que antecede ao parto geralmente é marcado por maior concentração de glicose como demonstrado por Bell (1995); Drackley, Overton e Douglas (2001) e Mann et al. (2015) e tende a cair nos momentos posteriores ao parto devido à alta demanda para a produção de leite. Em contraste, Castillo et al. (2005) em estudo realizado com vacas holandesas na Espanha, demonstraram que não houve diferença nas concentrações séricas de glicose durante o período de dez semanas que antecederam ao parto até duas semanas pós-parto. Atribuímos as menores concentrações séricas de glicose dos animais no momento da secagem à possível restrição alimentar no momento da secagem considerando a produção média de leite dos animais no final da lactação. O fenômeno observado nas concentrações séricas de glicose é explicado por Drackley, Overton e Douglas (2001), que elucida que a demanda pela glicose aumenta bruscamente no momento do parto, acionando mecanismos compensatórios, como por exemplo, elevando as concentrações de somatotropina e estimulando a lipólise.

A utilização dos AGNE e dos corpos cetônicos como o BHB, tem sido amplamente empregada como marcadores de BEN (CONTRERAS; SORDILLO, 2011; OSPINA et al., 2013; MANN et al., 2016), que foi evidenciado ao parto em todos os grupos experimentais.

Segundo Leblanc (2010), os valores de AGNE da circulação estão associados ao quanto a vaca mobilizou de gordura, enquanto o BHB é reflexo da oxidação completa, ou não dos lipídios pelo fígado. Quando avaliamos os AGNE, os animais no M2 apresentaram maior concentração sérica de AGNE do que os demais momentos para todos os grupos, isso significa que mesmo estando dentro dos valores de referência, que segundo Contreras e Sordillo (2011), no período do parto é de cerca de 0,75 mmol/L, houve maior mobilização de

gordura no momento do parto, justamente onde há maior demanda por energia para o momento do parto e para a produção de leite, o que corrobora com os resultados encontrados para BHB, indicando que o fígado não foi capaz de metabolizar todos os ácidos graxos, liberando dessa forma corpos cetônicos na circulação, mais especificamente o BHB.

Por outro lado, em um estudo realizado por Duffield et al. (2009) ao associar os efeitos da hipercetonemia na produção de leite em vacas no início de lactação, verificaram que níveis elevados de BHB (até 1,4 mmol/L) na segunda semana pós parto tem impacto positivo na produção de leite, gerando ganho de 240 kg de leite por vaca, no mesmo experimento ao avaliarem a primeira semana pós parto verificaram que os animais que apresentavam níveis acima de 1,8 mmol/L apresentaram queda de 300 kg na produção de leite por vaca.

Resultados semelhantes à este estudo foram encontrados por Weber et al. (2015), ao compararem diferentes dietas para o período de transição em vacas holandesas de alta produção, eles verificaram que há diferença nas concentrações séricas de BHB entre os momentos pré-parto (56, 28 e sete dias pré-parto) e pós-parto (um, sete, 14 e 28 dias pós-parto) com aumento significativo no momento do parto, enquanto para AGNE não foram observadas diferenças entre os momentos, em contraste no presente estudo houve maior concentração séricas de AGNE no momento do parto e sétimo dia pós-parto. Alvarenga et al. (2015) em um estudo realizado em com vacas no período de transição, exatas três semanas pré-parto até três semanas pós-parto, encontrou diferença entre as três semanas que antecederam ao parto, com menores concentrações de AGNE e BHB quando comparada com as três semanas pós-parto, semelhando ao que foi encontrado pelo presente estudo.

Dietas bem balanceadas na quantidade de energia adequada para os animais durante este período pode atenuar os efeitos da lipomobilização (HOFFMAN et al., 2001; SILVESTRE et al., 2011; CHAPINAL et al., 2012) apresentando níveis aceitáveis de AGNE e BHB na circulação, e assim diminuindo a susceptibilidade à infecções que são comuns neste período.

Os animais apresentaram maior concentração de colesterol, LDL e HDL no momento da secagem (M1), seguido por uma queda no momento do parto, como previamente descrito (KURPIŃSKA et al., 2015; NEWMAN et al., 2016), reflexo da mobilização de gordura realizada no final da gestação para manutenção do feto e produção de leite/colostró. Os níveis de colesterol, LDL e HDL logo após o parto voltaram a subir gradativamente, o que está ligado ao fato de após o parto a vaca aumenta o consumo de MS, assim há maior disposição de acetato pelo rúmen, que é o principal precursor do colesterol (DRACKLEY et al., 2014).

Em estudo similar por Moreira et al. (2015) encontraram diferença nas concentrações séricas de colesterol entre as semanas que antecedem ao parto, mais especificamente, entre a quatro semanas anterior ao parto e o parto. No mesmo estudo (MOREIRA et al., 2015), observaram diferença entre as concentrações médias de TG entre os momentos que antecedem ao parto e o parto, o que não foi encontrado pelo presente estudo.

Pogliani e Birgel Júnior (2007), em estudo visando estabelecer valores de referência para bovinos da raça holandesa não encontraram diferença estatística nas concentrações de colesterol entre animais com seis e nove meses de gestação, e animais com até 30 dias de parição. A maior transportadora do colesterol pela circulação é a HDL, encontrada em menor concentração sérica, a LDL também é responsável pelo transporte de colesterol na circulação, e queda nas concentrações séricas dessas duas lipoproteínas é um indicativo de esteatose hepática (NEWMAN et al., 2016).

6.4 CÁLCIO

A demanda por cálcio durante todo o período de transição é muito importante, pois além de regular uma série de hormônios, como a insulina, ele está diretamente ligado a motilidade ruminal, diminuindo o consumo de MS, aumentando a mobilização de gordura no início da lactação (GOFF, 2008). Observou-se que não houve diferença entre os momentos na concentração sérica de cálcio e fósforo, mesmo considerando a influência da glândula mamária, ou seja, a demanda para a produção de leite. Neste ínterim, (GOFF; KIMURA; HORST, 2002) demonstraram que vacas mastectomizadas não desenvolveram hipocalcemia, além de outras doenças no pós-partos, enquanto todas as vacas intactas desenvolveram a doença, evidenciando o quão forte é o influxo deste mineral para a glândula mamária. Ainda Goff (2008), elucida que, vacas que apresentam concentrações de cálcio entre 5,5 e 8 mg/dL apresentam quadro de hipocalcemia subclínica. Deve-se salientar que existe um influxo fisiológico de cálcio natural para a glândula mamária durante o final da gestação da gestação para a produção de leite, mas ao mesmo tempo mecanismos compensatórios como o aumento da absorção de cálcio pelo intestino e a mobilização de cálcio dos ossos, são ativados na tentativa de equilibrar as quantidades desse mineral na circulação (GOFF, 2008).

No presente estudo os animais do GA apresentaram menores concentrações séricas de cálcio, quando comparados com os demais grupos experimentais, especialmente o GS, isso

provavelmente deve-se ao fato de os animais apresentaram maior proporção de glândula hígida comparada aos demais grupos, o que pode ser comprovado pela proporção de quartos mamários infectados (Tabela 17), dessa forma, com uma glândula saudável, a produção de leite é otimizada, levando a maior demanda de cálcio do que os animais com que apresentaram maior número de quartos mamários infectados, o que compromete o tecido da glândula mamária levando a menor produção de leite e menor demanda de nutrientes como o cálcio.

6.5 FUNÇÃO HEPÁTICA

O proteinograma pode ser analisado juntamente com as provas de função hepática como método auxiliar ao diagnóstico de insuficiências hepáticas (BIRGEL JÚNIOR et al., 2003). A AST apresentou valores dentro dos previamente estabelecidos para a espécie, onde o esperado para a espécie varia entre 78 a 138 UI/L, e é considerada uma enzima hepática específica para bovinos, que indica dano hepático mesmo em condições subclínicas (MEYER; HARVEY, 1998), em contraste com a ALT. Deste modo, não há muitos trabalhos descrevendo a atuação da ALT em bovinos. Em um trabalho similar a este Todorović e Davidović (2012), não encontraram diferença nos valores de ALT durante o período de transição, diferentemente do presente estudo. Os animais de todos os grupos do presente experimento apresentam menor atividade enzimática de AST no momento da secagem (M1), quando comparado ao momento do parto até o 21º dia pós-parto. Em estudo realizado por Birgel Júnior et al. (2003) com vacas holandesas, os autores não encontraram diferença entre o terço final da gestação, onde foi considerado de sete a nove meses de gestação e o puerpério recente com até 15 dias de parida. Porém, neste mesmo estudo verificou-se aumento na atividade enzimática da AST no momento do parto até o sétimo dia pós-parto quando comparado com o momento da secagem, o que discorda com o presente estudo. Já Moreira et al. (2015), em estudo utilizando vacas mestiças, verificaram diferença na atividade enzimática da AST quando compararam três semanas anterior ao parto com o momento do parto, e verificaram maior atividade no momento do parto quando comparado aos demais momentos, o que corroboram com os achados do presente estudo. A elevação da AST no período pós-parto no presente estudo é esperado devido ao intenso esforço muscular exercido pelo animal no momento do parto, o que faz com que haja uma liberação desta enzima na

circulação (BIRGEL JÚNIOR et al., 2003). Segundo Todorović e Davidović (2012) a enzima hepática AST é a mais presente no fígado e eleva suas atividades quando há aumento na permeabilidade da membrana dos hepatócitos, que ocorre devido ao desequilíbrio metabólico gerado pela condição do animal, somado à lactação. A GGT é um marcador para doenças hepatobiliares como a colestase, mas também é um bom marcador para disfunção hepáticas (KANEKO, 2008). Já para os achados da enzima GGT, o estudo de Birgel Júnior et al. (2003) corroboram os achados do presente estudo, onde não foram encontradas alterações significativas. No mesmo estudo citado para perfil metabólico, Moreira et al. (2015), não encontraram os mesmos resultados que o presente estudo, ou seja, diminuição na atividade da enzimas hepática AST, ao comparar os momentos pré-parto com os momentos pós-parto.

6.6 FUNÇÃO RENAL

A síntese de ureia é realizada pelos hepatócitos no fígado e deriva da amônia que é resultado da degradação do catabolismo de aminoácidos, parte de sua excreção é feita pelos rins, porém em condições de hipovolemia, quase 60% da ureia é reabsorvida e volta para circulação, elevando sua concentração (SMITH, 2014). A ureia pode ainda ser influenciada por fatores dietéticos, como composição de aminoácidos e quantidade de proteína da dieta, a degradação sofrida por estes no rúmen, além da própria função hepática e renal (CAVESTANY et al., 2005).

Observou-se maior concentração sérica de ureia em todos os grupos experimentais no dia do parto, com valores acima do que é considerado fisiológico (SMITH, 2014), que varia entre 20 e 30 mg/dL. Piccione et al. (2012), encontraram concentrações séricas de uréia menor no momento do parto, quando comparado com as 5^a e 15^a semanas de lactação e final de gestação, o que discorda dos resultados do presente estudo. Já em estudo realizado por Gonçalves e Kozicki (1997), foi observada uma elevação nas concentrações plasmáticas de ureia em vacas holandesas que apresentaram ou não retenção de placenta no período pós-parto, corroborando com os achados do presente estudo.

Quanto às concentrações de creatinina foi observado maiores concentrações séricas de creatinina na primeira semana pós-parto, sendo bem evidenciado no momento do parto (M2), quando comparado após 15 dias pós-parto. As concentrações séricas de creatinina no sangue são relacionadas ao metabolismo muscular, o que justifica sua elevação no momento do parto,

uma vez que o esforço realizado pelos animais no momento do parto é intenso há maior liberação de creatinina na circulação (SMITH, 2014).

Em contraste com o presente estudo, em estudo realizado por Castillo et al. (2005), com 39 vacas holandesas múltiparas, não foi observada alteração nas concentrações séricas de creatinina ao comparar 75 dias pré-parto com uma semana pós-parto. Piccione et al. (2012) observaram menores concentrações séricas de creatinina no final de gestação e início de lactação, 5^a e 15^a semanas de lactação em relação ao parto, o que corrobora com os encontrados no presente estudo.

6.7 Parâmetros Locais (Glândula Mamária)

Existem diferentes maneiras de avaliação para detecção de mastite, uma delas é através da avaliação do indivíduo, onde pode-se avaliar o CMT, a CCS e o isolamento de patógenos causadores de mastite do leite destes indivíduos, também pode-se fazer a avaliação do rebanho, pela CCS do tanque de expansão (PYÖRÄLÄ, 2003). No presente estudo avaliou os animais individualmente, como ferramenta de gestão e monitoramento por meio de análise de CMT, CCS e análise microbiológica. Usualmente valores aceitáveis de CCS no leite variam entre 100.000 a 200.000 células por mL, contagens acima destes valores já são consideradas como mastite subclínica (PYÖRÄLÄ, 2003; SCHUKKEN et al., 2003; BANSAL et al., 2005).

Foi encontrado no presente estudo, maior escore de CMT no momento da secagem (M1), um indicativo de IMI. Além disto, quando avaliamos o GA no momento do parto, observou-se uma queda nos valores de escore de CMT, justamente pelo fato do uso do antimicrobiano no período de secagem, que além de tratar as IMI existentes, previne novas IMI durante um período de alta susceptibilidade, ou seja, após à secagem. Por outro lado, o uso de selantes internos de teto à base de subnitrito de bismuto age apenas como uma barreira física impedindo que novos patógenos adentrem no canal do teto, sem que as IMIs já existentes sejam eliminados por sua ação (GODDEN et al., 2003), o que pode explicar os resultados encontrados, uma vez que a resposta do GA foi melhor quando comparada ao GS, pois houve queda nos indicadores de mastite, como o CMT, a CCS e menor isolamento de patógenos causadores de mastite no exame microbiológico, indicando a efetividade do tratamento. Congruentes aos resultados do CMT, que indiretamente também avalia a

celularidade do leite, observou-se diferença entre os tratamentos, onde o GA apresentou menor CCS no leite quando comparado aos demais grupos para as duas variáveis, e o GS apresentou menores quantidades de CCS quando comparado ao GC, o que confirma a efetividade do tratamento antimicrobiano na secagem, e ainda com resultados menos expressivos, o uso do selante interno de tetos na secagem.

Neste contexto, sabe-se que a fase com maior chance de ocorrência de novas IMI é a involução ativa, devido ao aumento no número de patógenos presentes na pele do teto associada à maior pressão interna do teto, o que dilata seu canal, permitindo a entrada destes patógenos (SMITH; HOGAN, 1982; NICKERSON, 1989), especialmente em condições de alto desafio (≥ 250.000 células/mL no tanque; BARKEMA et al., 1998).

Quando associamos os resultados encontrados às análises de CCS, também observou-se tanto para CCS automática, quanto para CCS microscópica, que o momento da secagem e do parto foram os que apresentaram maiores CCS em comparação aos demais momentos. No que se refere-se ao momento da secagem, isso ocorre, pelo menos em parte, devido às IMIs que persistem durante a lactação. Além disto, sabe-se que a celularidade no leite de animais na fase final de lactação (LAEVENS et al., 1997) e no colostro (GOMES et al., 2011) é maior mesmo em amostras provenientes de glândulas mamárias sadias. No entanto, salienta-se que apesar do fenômeno fisiológico de maior celularidade no colostro e no leite de animais no final da lactação, sabe-se que as IMIs são as principais responsáveis pelo expressivo aumento da celularidade do leite (PYÖRÄLÄ, 2003; DELLA LIBERA et al., 2011; MIRA et al., 2013).

Em um estudo avaliando a aplicação de terapia de vaca seca, com antimicrobiano e terapia combinada (uso de antimicrobiano e selante), Berry e Hillerton (2007) em rebanho com baixa CCS verificaram que a terapia combinada diminuiu a incidências de novas IMI quando comparado com a ação do antimicrobiano isoladamente, e verificaram também que os animais que permaneciam mais de dez semanas secas apresentaram maior IMI quando comparada aos grupo que de até dez semanas de período seco.

Os animais do presente estudo apresentaram alta CCS, onde os animais no M1 apresentaram 5,66 CCS, porém ao converter este numero que está representado em função logarítmica temos aproximadamente 457,000 CSS por mL na contagem de CCS, o que para Pyörälä, (2003); Schukken et al. (2003) e Della Libera et al. (2011) é acima do limite aceitável para um quarto mamário sadio (sem infecção intramamária). O grupo tratado com antimicrobiano apresentou menor CCS, aproximadamente 54,000 CCS por mL, e como esperado menor isolamento de patógenos quando comparado aos demais tratamento,

considerando o efeito das IMIs sobre a celularidade do leite, o que enfatiza o efeito do tratamento a base de antimicrobiano no período seco, o ajuda a erraditar infecções que já existentes e a prevenir novas possíveis infecções intramamárias durante o período seco (GODDEN et al., 2003; BERRY; HILLERTON, 2007a).

Ao avaliar a eficácia da utilização de antimicrobiano, selante interno de teto e terapia combinada em vacas com alta e baixa CCS, Bradley et al. (2010) encontraram que os animais que apresentaram alta CCS, tratados com terapia combinada no momento pós-parto, apresentaram menor isolamento de patógenos no exame microbiológico quando comparado aos animais tratados somente com antimicrobiano. Já para os animais com baixa CCS tratados com selante interno, e terapia combinada não apresentaram o mesmo resultado.

Em um estudo avaliando duas terapias de vacas seca (HUXLEY et al., 2002), aplicaram selante interno de teto a base de subnitrato de bismuto em um grupo, e antimicrobiano a base de cefalônio anidro em outro grupo, e verificaram que a aplicação do selante interno a base de subnitrato de bismuto reduzia a incidência de novas IMI, comparado com o antimicrobiano, o que não foi encontrado pelo presente estudo, porém os animais utilizados pelo estudo de Huxley et al. (2002), apresentavam CCS abaixo de 200.000 células por mL, indicando rebanhos com baixo desafio e com baixa prevalência de patógenos maiores causadores de mastite, diferentemente do presente estudo, o que justifica uma resposta positiva para utilização do selante interno de teto.

Os resultados de CMT, CCS, e microbiológico encontrados pelo presente estudo podem ser justificados pela utilização da terapia de vaca seca com antimicrobiano de amplo espectro no GA, e parcialmente no GS, justificado pelo uso de selante interno que preveniu novas IMI, uma vez que ambos apresentaram menor escore de CMT e CCS além de menor isolamentos de patógenos no leite em relação ao GC. A utilização de antimicrobianos de amplo espectro tem se mostrado eficaz na eliminação de patógenos já existentes no momento da secagem, e na prevenção de novas IMI durante o período seco até a primeira semana de lactação (HUXLEY et al., 2002). No presente estudo observou-se um predomínio das bactérias do grupo de *Staphylococcus* coagulase-negativa nos isolamentos realizado no período do parto e pós-parto, assim como o encontrado por Dingwell, Kelton e Leslie (2003). Essas bactérias são classificadas como oportunistas, aproveitam o desequilíbrio imunológico e fisiológico gerado pelo período de transição e associados ao ambiente desfavorável penetram no canal do teto gerando o quadro de mastite (SORDILLO, 2005).

6.8 LEUCÓCITOS MONONUCLEARES E POLIMORFONUCLEARES

Ao avaliar a CCS diferencial do leite pode-se estabelecer uma relação com as outras variáveis, associa-la à presença da mastite, e ao tamanho da resposta frente ao patógeno. As células somáticas do leite de glândulas mamárias sadias representam um conjunto composto predominante por de macrófagos (66 a 88%), neutrófilos, e células epiteliais da glândula mamária (PYÖRÄLÄ, 2003). Pelos resultados encontrados, pode-se concluir que a utilização do antimicrobiano no momento da secagem contribuiu tanto para erradicar infecções já existentes, quanto para evitar novas IMI no período seco, o que refletiu nos resultados da CCS e sua contagem diferencial, e pode ser confrontado juntamente com as análises de microbiológico. Porém, a utilização de selantes interno contribuiu na prevenção de novas IMI no período de transição, porém não trata infecções intramamárias existentes, dessa forma as concentrações, tanto de células mononucleares, quanto de polimorfonucleres foram superiores quando confrontadas com os resultados do GA.

Quando comparamos com os resultados de agentes etiológicos da mastite bovina isolados dos quartos mamários vemos que os momentos onde os patógenos causadores de mastite foram mais frequentemente isolados foram no momento da secagem, e momento do parto, o que justifica, pelo menos em parte, as maiores CCS nestes momentos, pois há um maior influxo de leucócitos polimorfonucleares, especialmente os neutrófilos, para a glândula mamária na tentativa de combater o patógeno invasor da glândula. E depois que os neutrófilos cumprem sua função de eliminar os patógenos, os macrófagos migram para o sítio inflamatório, para eliminar os debris dos neutrófilos uma vez que estes entram em apoptose após a fagocitose e produção ERO para matar os patógenos, expressando fosfatilserina que é reconhecida pelos macrófagos, que os fagocita, evitando assim a liberação de grânulos citotóxicos e ERO dos neutrófilos para o ambiente mamário, minimizando assim danos teciduais e amplificação do processo inflamatório (PAAPE et al., 2003; PESSOA et al., 2012).

A presença das imunoglobulinas no colostro contribui para transferência de imunidade passiva ao bezerro, somado a isto, a presença destas no colostro contribui na prevenção de novas IMI, e logo após o momento do parto há um declínio nas concentrações de imunoglobulinas totais no leite. A maior parte das imunoglobulinas presente no colostro e no leite deriva do sangue, os demais são produzidas na mama (STELWAGEN et al., 2009).

Durante o experimento não foram observadas diferenças entre os momentos experimentais em todos os grupos experimentais, mas foi observado que os animais do GC apresentaram maior concentração sérica de IgM do que os animais do GS. Em um estudo comparando as concentrações de imunoglobulinas do soro e do colostro em vacas holandesas, Ježek, Malovrh e Klinkon (2012), também não encontraram diferença significativa nas concentrações séricas de imunoglobulinas, tanto para IgG, quanto para IgM quando comparou 30 dias pré-parto e oito semanas pós-parto. Herr, Bostedt e Failing (2011) mensuraram as concentrações séricas de IgG e IgM no sangue de vacas holandesas no período de transição e também não observaram diferenças nas concentrações de IgM, mas constaram que animais múltíparas, que haviam parido mais de três vezes apresentavam concentrações superiores aos animais que haviam parido somente duas.

Quanto a quantificação das imunoglobulinas do leite os animais do presente estudo apresentaram maiores concentrações de IgM, IgG1 e IgG2 no leite no momento da secagem (M1) e na primeira semana pós-parto, tendo destaque o momento do parto, onde só há colostro. Quando avaliamos as diferenças entre os tratamentos, vemos que no momento do parto (M2) houve aumento na concentração de IgG2 no colostro do GA em comparação com os demais grupos, o que indica que o grupo tratado com antimicrobiano, por ter sofrido menor desafio, alcançou maiores níveis de imunoglobulinas no momento do parto. O que não foi encontrado para IgM e para IgG1, onde o GC apresentou maior concentração de IgM, e o GS apresentou maior concentração de IgG1. Segundo Detilleux et al. (1995), as imunoglobulinas G (IgG1 e IgG2), constituem 90% do colostro, enquanto IgM e IgA são a menor parte desta composição, além disso, a grande presença de IgG2 no colostro contribui para a função de opsonização dos neutrófilos. Em um estudo comparando duas diferentes técnicas de mensuração de IgG de colostro e plasma sanguíneo, através de ELISA, e de Imunodifusão Radial, Gelsinger et al. (2015), verificaram que há diferença entre as duas técnicas, sendo que, ao utilizarem ELISA, verificaram que as concentrações de IgG no plasma e no colostro eram significativamente menores em comparação às mensuradas por imunodifusão radial, o que pode justificar os valores baixos para ambas as IgGs (IgG1 e IgG2) no presente estudo. Ademais Gelsinger et al. (2015), ao compararem a mensuração de imunoglobulinas IgG por Imunodifusão radial e ELISA concluíram que a comparação direta dos resultados de ELISA e Imunodifusão radial não é recomendada, portanto a eficácia destes ensaios não pode ser definida, e justificariam a inexpressividade dos resultados encontrados no presente estudo.

Além disto, o presente estudo não encontrou diferenças na porcentagem de neutrófilos reativos ao teste do NBT sem estímulo e estimulados com partículas de zymosan.

Similarmente, Rinaldi et al. (2008) também não encontraram diferença na mensuração das ERO por ensaios de quimioluminescência dependente do luminol e redução do citocromo C em leucócitos PMN estimulados ou não com partículas de zymosan em vacas no período pós-parto (1 a 8 dias pós-parto) quando comparado com vacas no terço médio da lactação (100 a 200 dias de lactação). Deve-se salientar que as técnicas descritas acima não diferenciam a produção intracelular e a liberação de ERO pelos leucócitos PMN. No entanto, estes autores ao empregarem técnicas mais específicas para a mensuração da produção intracelular de ERO, observaram maior produção intracelular de ERO pelos PMN isolados de vacas no período pós-parto imediato.

6.9 ABORDAGEM DO MODELO DE RISCO

A abordagem mais ampla e a melhor compreensão das condições subjacentes das mastites podem auxiliar na prevenção da doença e em estratégias de controle e diagnóstico desta enfermidade, possibilitando maximizar o potencial genético de vacas leiteiras para a produção de leite, resultando no aumento da lucratividade para os produtores de leite. Neste contexto, sabe-se que as alterações metabólicas durante o período periparturiente podem predispor as vacas leiteiras à várias enfermidades, e dentre elas destaca-se a mastite. Desta forma, a identificação de marcadores sanguíneos relacionados aos distúrbios metabólicos como fatores de risco à mastite durante este período pode ser uma ferramenta importante no controle e diagnóstico da mastite. No presente estudo, por modelo multivariado de regressão logística foi possível determinar dentre vários marcadores sanguíneos quais estariam relacionados ao isolamento de patógenos causadores de mastite (mastite infecciosa) e à alta CCS durante o período periparturiente em vacas leiteiras sobre diferentes condições profiláticas, ou seja, o uso de antimicrobianoterapia de vaca seca ou selante interno de tetos.

No presente estudo, a concentração sérica de proteína total (*odds ratio* = 5,083; *P* = 0,003), albumina (*odds ratio* = 4,307; *P* = 0,02), interação proteína e albumina (*odds ratio* = 0,804; *P* = 0,046) e fibrinogênio (*odds ratio* = 1,001; *P* = 0,003) como variáveis associadas à alta CCS (≥ 200.000 células mL⁻¹). Similarmente, a concentração sérica de proteína total (*odds ratio* = 1,632; *P* = 0,04) e triglicerídeos (*odds ratio* = 1,021; *P* = 0,02) foram associadas ao isolamento de patógenos causadores de mastite em amostras de leite assepticamente coletadas durante o período periparturiente. Embora os resultados do presente estudo, a priori,

apareçam ininteligível, já que as variáveis amplamente estudadas e relacionadas aos distúrbios metabólicos durante o período periparturiente, como por exemplo BHB, AGNE e glicose (REZAMAND et al., 2007; MOYES et al., 2009; SORDILLO et al., 2009; OPSOMER et al., 2014; SORDILLO, 2016), não foram sequer elegíveis para entrar no modelo de regressão logística para identificar quais marcadores sanguíneos são relacionados à alta CCS e ao isoladamente de patógenos mastite em vacas leiteiras, outras variáveis simples e de fácil determinação à campo com o uso de um simples refratômetro, como a mensuração da proteína total, foi associado à alta CCS e ao isolamento de patógenos em amostras de leite no período estudado.

Neste contexto, Rezamand et al. (2007) descreveram que apesar das concentrações de AGNE e BHB aumentarem no parto, como encontrado no presente estudo, estas variáveis não foram associadas às novas infecções intramamárias durante o período pós-parto. Por outro lado, Le Blanc et al. (2004) e Rezemand et al. (2007) sugeriram que os novos casos de infecções intramamárias foram associados à redução da concentração plasmática de colesterol, provavelmente associado à menor habilidade do fígado de transportar lipoproteínas, pelo qual o colesterol é transportado. No presente estudo, apesar do colesterol ser uma variável elegível para entrar no modelo de regressão logística para o modelo final de regressão logística, ela não foi estatisticamente diferente ($P = 0,20$). Por outro lado, no presente estudo, a concentração sérica de triglicérides foi considerada como fator de risco para o isolamento de patógenos causadores de mastite no período pós-parto, no caso a chance de isolamento de patógenos causadores de mastite aumenta 2,1% a cada aumento de uma unidade (mg/dL) de triglicérides sérico. Kushibiki et al. (2000, 2002) ao avaliarem o efeito da infusão do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) sobre o metabolismo lipídico em novilhas, observaram que a infusão de TNF- α recombinante elevou rapidamente a concentração de triglicérides em novilhas (0,5 h após a infusão). Neste contexto, sabe-se que o TNF- α apresenta um papel chave no preâmbulo e na regulação da resposta inflamatória e imune, e tem a habilidade de mediar a hipertrigliceridemia que acontece em associação com a infecção (GRUNFELD; PALLADINO, 1990; KUSHIBIKI et al., 2000). Neste ínterim, sabe-se que vacas com mastite subclínica no período pós-parto apresentaram maiores concentrações de TNF- α quatro semanas anterior ao parto do que vacas sadias (DERVISHI et al., 2015), o que pode justificar os resultados encontrados no presente estudo.

Além disto, Souza et al. (2011) reportaram que animais infectados pelo vírus da leucemia bovina (VLB) apresentaram maior concentração de triglicérides que animais sadios. Congruente a isto, posteriormente, Della Libera et al. (2015) relacionou à infecção pelo VLB,

especialmente em animais com linfocitose persistente, às disfunções das células do sistema imune isoladas do leite, especialmente os neutrófilos, o que pode em parte favorecer os animais infectados pelo VLB à novas infecções intramamárias considerando a importância desta população leucocitária na defesa da glândula mamária, o que deve ser ainda mais evidente no período periparturiente.

A concentração sérica de proteínas foi considerada em ambos os modelos de regressão logística como um fator de risco para a mastite, ou seja, modelos de regressão logística para alta CCS e isolamento de patógenos causadores de mastite em amostras de leite coletadas assepticamente. Neste contexto, a concentração de proteínas séricas tem sido amplamente utilizada para avaliar infecções que ocorrem durante o período pós-parto, e influenciam o intervalo de concepção (ROWLANDS et al., 1977; PICCIONE et al., 2011). Por outro lado, foi observado a interação proteína e albumina, indicando que o efeito da concentração sérica da proteína total na resposta avaliada depende da albumina, e analogamente o efeito da concentração sérica de albumina depende da proteína total. Desta forma, a interação entre a concentração sérica de proteínas totais e albumina foi classificado como fator de proteção (*odds ratio* < 1,0). Os níveis plasmáticos das proteínas totais sofrem variações de acordo com as alterações das suas frações, representadas pelas globulinas e albumina. Assim, inicialmente no modelo de regressão logística para alta CCS, a albumina – a proteína plasmática mais abundante em bovinos representando cerca de 35 a 50% da proteína total em bovinos (MURATA et al., 2004; KANEKO et al., 2008), apresentou como fator de proteção (*odds ratio* = 0,888, *P* = 0,065; Tabela 26), enquanto que a proteína total apresentou como fator de risco (*odds ratio* = 2,121, *P* = 0,0001; Tabela 26), e no modelo final a interação proteína e albumina apresentou como fator de proteção (*odds ratio* = 0,804, *P* = 0,046). Similarmente, inicialmente no modelo de regressão logística para isolamento de patógenos causadores de mastite, a albumina apresentou como fator de proteção (*odds ratio* = 0,846, *P* = 0,02; Tabela 28) e a proteína total como fator de risco (*odds ratio* = 1,966, *P* = 0,0003; Tabela 28) e também para proteína total no modelo de regressão logística final (*odds ratio* = 1,632, *P* = 0,04; Tabela 29). Desta forma, podemos concluir que a albumina atua como fator de proteção, e isto deve-se provavelmente ao fato de ser considerada como proteína de fase aguda negativa. Deve-se lembrar que, a inflamação, a infecção e a injúria do tecido leva à produção e liberação de citocinas pelas células de defesa, levando a produção de proteínas de fase aguda positivas pelos hepatócitos, com concomitante decréscimo na síntese de proteínas de fase aguda negativas, como a albumina (MURATA et al., 2004). Desta forma, a discrepância entre proteínas totais e albumina como fatores de risco/proteção no modelo de

regressão logística deve-se provavelmente à outra fração proteica, ou seja, às globulinas. Dentre as globulinas, destaca-se importantes proteínas de fase aguda positivas [ex: α_1 -antitrypsina, α_1 -ácido glicoproteína, ceruloplasmina, amiloide sérico A, haptoglobina, α_2 -macroglobulinas, fibrinogênio, sistema complemento (C3 e C4), proteína C reativa e ferritina, além das imunoglobulinas (KANEKO et al., 2008). Assim, as globulinas podem ser importantes marcadores de infecção intramamária em bovinos durante o período periparturiente, como já demonstrado para proteínas de fase aguda, sendo que algumas são consideradas como indicadores precoces da mastite bovina, da gravidade da infecção intramamária, e até eficácia ao tratamento (PYÖRÄLÄ, 2003; MURATA et al., 2004; SAFI et al., 2009; PYÖRÄLÄ et al., 2011; TOTHOVA et al., 2014). Não é por acaso que o fibrinogênio, por sua vez, uma proteína de fase aguda positiva em bovinos, também apresentou como fator de risco no modelo final para alta CCS (*odds ratio* = 1,001; P = 0,003), ou seja, a chance do animal apresentar alta CCS aumenta 0,1% a cada aumento de uma unidade (mg/dL) de fibrinogênio plasmático. No entanto, as proteínas de fase aguda são marcadores inespecíficas para doenças infecciosas, ou seja, qualquer infecção pode levar à alterações na concentrações séricas, e não especificamente é resultante apenas de casos de mastite infecciosa (MURATA et al., 2004; TOTHOVA et al., 2014). Apesar disto, deve-se lembrar que vários trabalhos apontam associações entre a saúde da glândula mamária e a redução no desempenho reprodutivo (SCHRICK et al., 2001; HUDSON et al., 2012), e ainda há estudos que demonstraram correlação genética entre a ocorrência de mastite e outras problemas sanitários em vacas leiteiras como distocia, retenção de placenta, metrite, hipocalcemia e ovários císticos (LIN et al., 1989). Assim, é esperado que vacas que apresentam a reposta imune comprometida, especialmente durante o período periparturiente, seriam mais susceptíveis à mastite, assim como para outras enfermidades (THOMPSON-CRISPI et al., 2012). No entanto, estudos futuros considerando associações entre as distintas proteínas de fase aguda, ou grupos de proteínas de fase aguda, e as enfermidades que acometem os bovinos, especialmente no período periparturiente, devem ser melhor investigadas.

Ademais, o presente estudo ainda apontou que a terapia de vaca seca com o antimicrobiano a base de cefalônio anidro foi associado à menor CCS (*odds ratio* = 0,258; P = 0,002) e menor isolamento de patógenos causadores de mastite (*odds ratio* = 0,371; P = 0,01). Corroborando com os resultados do presente estudo, Berry e Hillerton (2002), utilizando o mesmo antimicrobiano na secagem, observaram que maior número de novas infecções intramamárias ao parto nos animais não tratados que nos animais que receberam

antimicrobianoterapia na secagem. Por outro lado, embora a antimicrobianoterapia de vaca seca seja uma prática utilizada para eliminar infecções intramamárias existentes e prevenir novas infecções intramamárias durante o período seco, por outro lado recente enfoques com a preocupação com a saúde pública recomendam o uso prudente de antimicrobianos, já sua utilização discriminada pode levar a seleção de isolados bacterianos resistentes aos antimicrobianos e o risco de resíduos antimicrobianos no ambiente (BERRY; HILLERTON, 2002). Além disto, esta prática não protege contra infecções próximas ao parto, resíduos no leite podem ser encontrados dependendo da duração do período seco, e não é eficaz contra todos os tipos de agentes envolvidos nas infecções da glândula mamária (NICKERSON; OWENS, 1993).

7 CONCLUSÃO

Através dos modelos de regressão logístico foi possível identificar que alterações nos parâmetros como a proteína, albumina, fibrinogênio, servem de biomarcadores associadas à mastite bovina do período seco até o final do período de transição, sem que os determinasse como causa ou efeito.

Também concluí que as alterações metabólicas específicas e características do período de transição nos parâmetros sanguíneos sobrepõe o efeito dos protocolos de secagem com emprego de antimicrobiano ou selante.

Em vistas dos achados sugere-se que o perfil sistêmico da vaca no periparto está associado à mastite.

REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, E. A.; MOREIRA, G. H. F. A.; FACURY FILHO, E. J.; LEME, F. O. P.; COELHO, S. G.; MOLINA, L. R.; LIMA, J. A. M.; CARVALHO, A. U. Avaliação do perfil metabólico de vacas da raça Holandesa durante o período de transição. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 3, p. 281–290, 2015.
- BANSAL, B. K.; HAMANN, J.; GRABOWSKIT, N. T.; SINGH, K. B. Variation in the composition of selected milk fraction samples from healthy and mastitic quarters, and its significance for mastitis diagnosis. **The Journal of Dairy Research**, v. 72, n. 2, p. 144–152, 2005.
- BARKEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; LAM, T. J.; BEIBOER, M. L.; WILMINK, H.; BENEDICTUS, G.; BRAND, A. Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 2, p. 411–419, 1998.
- BAUMAN, D. E.; CURRIE, W. B. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n. 9, p. 1514–1529, 1980.
- BELL, A. W.; BURHANS, W. S.; OVERTON, T. R. Protein nutrition in late pregnancy, maternal protein reserves and lactation performance in dairy cows. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 59, p. 119–126, 2000.
- BELL, A. W. early lactation Regulation of Organic Nutrient Late Pregnancy Metabolism During Transition from to Early. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 9, p. 2804–2819, 1995.
- BERRY, E. A.; HILLERTON, J. E. Effect of an intramammary teat seal and dry cow antibiotic in relation to dry period length on postpartum mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 2, p. 760–765, 2007a.
- BERRY, E. A.; HILLERTON, J. E. The Effect of an Intramammary Teat Seal on New Intramammary Infections. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 10, p. 2512–2520, 2002.
- BERRY, E. A.; HILLERTON, J. E. The Effect of an Intramammary Teat Seal on New Intramammary Infections. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 10, p. 760–765, 2007b.
- BIRGEL JUNIOR, E. H.; NEVES, F. S.; SALVATORE, L. C. A.; MIRANDOLA, R. M. S.; TÁVORA, J. P. F.; BIRGEL, E. H. Avaliação Da Influência Da Gestação E Do Puerpério Sobre a Função Hepática De Bovinos Da Raça Holandesa. **Ars Veterinaria**, v. 19, n. 2, p. 172–178, 2003.
- BRADFORD, B. J.; YUAN, K.; FARNEY, J. K.; MAMEDOVA, L. K.; CARPENTER, a. J. Invited review: Inflammation during the transition to lactation: New adventures with an old flame. **Journal of Dairy Science**, p. 1–20, 2015.

- BRADLEY, A. J.; DE VliegHER, S.; GREEN, M. J.; LARROSA, P.; PAYNE, B.; VAN DE LEEMPUT, E. S.; SAMSON, O.; VALCKENIER, D.; VAN WERVEN, T.; WALDECK, H. W. F.; WHITE, V.; GOBY, L. An investigation of the dynamics of intramammary infections acquired during the dry period on European dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 9, p. 6029–6047, 2015.
- BRAMLEY, A. J.; DODD, F. H. Reviews of the progress of dairy science: mastitis control - progress and prospects. **Journal of Dairy Research**, v. 51, p. 481–512, 1984.
- BURTON, J. L.; ERSKINE, R. J. Immunity and mastitis. Some new ideas for an old disease. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 19, n. 1, p. 1–45, v. mar. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12682934>>. Acesso em: 30 mar. 2016.
- CAMERON, M.; MCKENNA, S. L.; MACDONALD, K. a; DOHOO, I. R.; ROY, J. P.; KEEFE, G. P. Evaluation of selective dry cow treatment following on-farm culture: risk of postcalving intramammary infection and clinical mastitis in the subsequent lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 1, p. 270–84, 2015.
- CASTILLO, C.; HERNANDEZ, J.; BRAVO, A.; LOPEZ-ALONSO, M.; PEREIRA, V.; BENEDITO, J. L. Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. **Veterinary Journal**, v. 169, n. 2, p. 286–292, 2005.
- CAVESTANY, D.; BLANC, J. E.; KULCSAR, M.; URIARTE, G.; CHILIBROSTE, P.; MEIKLE, A.; FEBEL, H. Studies of the Transition Cow Under a Pasture-based Milk Production System : Metabolic Profiles. v. 7, p. 1–7, 2005.
- CHAPINAL, N.; LEBLANC, S. J.; CARSON, M. E.; LESLIE, K. E.; GODDEN, S.; CAPEL, M.; SANTOS, J. E. P.; OVERTON, M. W.; DUFFIELD, T. F. Herd-level association of serum metabolites in the transition period with disease, milk production, and early lactation reproductive performance. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 10, p. 5676–82, 2012.
- CONTRERAS, G. A.; SORDILLO, L. M. Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 34, n. 3, p. 281–289, 2011.
- DARGENT-MOLINA, P.; SCARLETT, J.; POLLOCK, R. V. H.; ERB, H. N.; SEARS, P. Herd-level risk factors for *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* intramammary infections. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 6, n. 2, p. 127–142, 1988.
- DE KOSTER, J. D.; OPSOMER, G. Insulin resistance in dairy cows. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 29, n. 2, p. 299–322, 2013.
- DEGARIS, P. J.; LEAN, I. J. Milk fever in dairy cows: A review of pathophysiology and control principles. **Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 58–69, 2008.
- DELLA LIBERA, A. M. M. P.; DE SOUZA, F. N.; BATISTA, C. F.; SANTOS, B. P.; DE AZEVEDO, L. F. F.; RAMOS SANCHEZ, E. M.; DINIZ, S. A.; SILVA, M. X.; HADDAD, J. P.; BLAGITZ, M. G. Effects of bovine leukemia virus infection on milk neutrophil function and the milk lymphocyte profile. **Veterinary Research**, v. 46, n. 1, p. 1–8, 2015.

- DETILLEUX, J. C.; KEHRLI, M. E.; STABEL, J. R.; FREEMAN, A. E.; KELLEY, D. H. Study of immunological dysfunction in periparturient Holstein cattle selected for high and average milk production. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 44, n. 3-4, p. 251–267, 1995.
- DINGWELL, R. T.; KELTON, D. F.; LESLIE, K. E. Management of the dry cow in control of peripartum disease and mastitis. **The Veterinary Clinics of North America. Food animal practice**, v. 19, n. 1, p. 235–65, mar. 2003.
- DRACKLEY, J. K. ADSA Foundation Scholar Award. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 11, p. 2259–2273, 1999.
- DRACKLEY, J. K.; OVERTON, T. R.; DOUGLAS, G. N. Adaptations of Glucose and Long-Chain Fatty Acid Metabolism in Liver of Dairy Cows during the Periparturient Period. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. E100–E112, 2001.
- DRACKLEY, J. K.; WALLACE, R. L.; GRAUGNARD, D.; VASQUEZ, J.; RICHARDS, B. F.; LOOR, J. J. Visceral adipose tissue mass in nonlactating dairy cows fed diets differing in energy density(1.). **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 6, p. 3420–30, 2014.
- DUFFIELD, T. F.; LISSEMORE, K. D.; MCBRIDE, B. W.; LESLIE, K. E. Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 2, p. 571–580, 2009.
- EGER, M.; HUSSEN, J.; KOY, M.; DÄNICKE, S.; SCHUBERTH, H.-J.; BREVES, G. Glucose transporter expression differs between bovine monocyte and macrophage subsets and is influenced by milk production. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 3, p. 2276–2287, 2016.
- FAGLIARI, J. J.; SANTANA, A. E.; MARCHIÓ, W.; CAMPOS FILHO, E.; CURI, P. R. Constituintes sanguíneos de vacas das raças Nelore (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*) e de bubalinas (*Bubalus bubalis*) da raça Murrah durante a gestação, no dia do parto e no puerpério. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 50, n. 3, p. 273–282, 1998.
- FRANKLIN, S. T.; YOUNG, J. W.; NONNECKE, B. J. Effects of ketones, acetate, butyrate, and glucose on bovine lymphocyte proliferation. **Journal of dairy science**, v. 74, n. 8, p. 2507–14, 1991.
- GELSINGER, S. L.; SMITH, A. M.; JONES, C. M.; HEINRICHS, A. J. Technical note: Comparison of radial immunodiffusion and ELISA for quantification of bovine immunoglobulin G in colostrum and plasma. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 6, p. 4084–9, 2015.
- GODDEN, S.; RAPNICKI, P.; STEWART, S.; FETROW, J.; JOHNSON, A.; BEY, R.; FARNSWORTH, R. Effectiveness of an internal teat seal in the prevention of new intramammary infections during the dry and early-lactation periods in dairy cows when used

with a dry cow intramammary antibiotic. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 12, p. 3899–3911, 2003.

GOFF, J. P. The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. **Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 50–57, 2008.

GOFF, J. P.; HORST, R. L. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 7, p. 1260–1268, 1997.

GOFF, J. P.; KIMURA, K.; HORST, R. L. Effect of mastectomy on milk fever, energy, and vitamins A, E, and beta-carotene status at parturition. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 6, p. 1427–1436, 2002.

GOMES, V.; MADUREIRA, K. M.; SORIANO, S.; LIBERA, A. M. M. P. Della; BLAGITZ, M. G.; BENESI, F. J. Factors affecting immunoglobulin concentration in colostrum of healthy Holstein cows immediately after delivery. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 53–56, dez. 2011.

GONÇALVES, D.; KOZICKI, L. E. Perfis bioquímicos e imunológicos no período peripartal de vacas leiteiras com e sem retenção de placenta. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 34, n. 6, p. 364–370, 1997.

GRUNFELD, C.; PALLADINO, M. A. Tumor necrosis factor: immunologic, antitumor, metabolic, and cardiovascular activities. **Advances in internal medicine**, v. 35, p. 45–71, jan. 1990.

HERR, M.; BOSTEDT, H.; FAILING, K. IgG and IgM levels in dairy cows during the periparturient period. **Theriogenology**, v. 75, n. 2, p. 377–385, 2011.

HOEBEN, D.; HEYNEMAN, R.; BURVENICH, C. Elevated levels of Beta-hydroxybutyric acid in periparturient cows and in vitro effect on respiratory burst activity of bovine neutrophils. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 58, n. 2, p. 165–170, 1997.

HOFFMAN, P. C.; ESSER, N. M.; BAUMAN, L. M.; DENZINE, S. L.; ENGSTROM, M.; CHESTER-JONES, H. Short communication: Effect of dietary protein on growth and nitrogen balance of Holstein heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 4, p. 843–847, 2001.

HURLEY, W. L. Mammary gland function during involution. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 6, p. 1637–1646, 1989.

HUXLEY, J. N.; GREENT, M. J.; GREEN, L. E.; BRADLEY, A. J. Evaluation of the efficacy of an internal teat sealer during the dry period. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 3, p. 551–61, 2002.

INGVARTSEN, K. L.; ANDERSEN, J. B. Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 7, p. 1573–1597, 2000.

INGVARTSEN, K. L.; MOYES, K. Nutrition, immune function and health of dairy cattle. **Animal**, p. 1–11, 2012.

INGVARTSEN, K. L.; MOYES, K. M. Factors contributing to immunosuppression in the dairy cow during the periparturient period. **Japanese Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. supplement 1, p. S15–S24, 2015.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Guide to prudent use of antimicrobial agents in dairy production**. Brussels. 53 p.

JEŽEK, J.; MALOVRH, T.; KLINKON, M. Serum immunoglobulin (IgG, IgM, IgA) concentration in cows and their calves. **Acta Agriculturae Slovenica**, v. 100, p. 295–298, 2012. Supplement, 3.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6. Ed. USA: Academic Press, 2008. 216 p.

KURPIŃSKA, A. K.; JAROSZ, A.; OŹGO, M.; SKRZYPCZAK, W. F. Changes in lipid metabolism during last month of pregnancy and first two months of lactation in primiparous cows – analysis of apolipoprotein expression pattern and changes in concentration of total cholesterol, HDL, LDL, triglycerides. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 18, n. 2, p. 291–298, 2015.

KUSHIBIKI, S.; HODATE, K.; SHINGU, H.; HAYASHI, T.; TOUNO, E.; SHINODA, M.; YOKOMIZO, Y. Alterations in lipid metabolism induced by recombinant bovine tumor necrosis factor- α administration to dairy heifers. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 8, p. 2151–2157, 2002.

KUSHIBIKI, S.; HODATE, K.; UEDA, Y.; SHINGU, H.; MORI, Y.; ITOH, T.; YOKOMIZO, Y. Administration of recombinant bovine tumor necrosis factor- α affects intermediary metabolism and insulin and growth hormone secretion in dairy heifers 1 , 2. **Journal of Animal Science**, n. 78, p. 2164–2171, 2000.

LACETERA, N.; SCALIA, D.; FRANCI, O.; BERNABUCCI, U.; RONCHI, B.; NARDONE, A. Short communication: effects of nonesterified fatty acids on lymphocyte function in dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 4, p. 1012–4, 2004.

LEBLANC, S. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 56 Suppl, p. S29–S35, 2010.

LEE, J. Y.; SOHN, K. H.; RHEE, S. H.; HWANG, D. Saturated Fatty Acids, but Not Unsaturated Fatty Acids, Induce the Expression of Cyclooxygenase-2 Mediated through Toll-like Receptor 4. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 20, p. 16683–16689, 2001.

LESCOURRET, F.; COULON, J. B.; FAYE, B. Predictive model of mastitis occurrence in the dairy cow. **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 10, p. 2167–2177, 1995.

MALLARD, B. a; DEKKERS, J. C.; IRELAND, M. J.; LESLIE, K. E.; SHARIF, S.; VANKAMPEN, C. L.; WAGTER, L.; WILKIE, B. N. Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 2, p. 585–595, 1998.

- MANN, S.; YEPES, F. A. L.; DUPLESSIS, M.; WAKSHLAG, J. J.; OVERTON, T. R.; CUMMINGS, B. P.; NYDAM, D. V. Dry period plane of energy: Effects on glucose tolerance in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 1, p. 701–17, 2016.
- MANN, S.; YEPES, F. A. L.; OVERTON, T. R.; WAKSHLAG, J. J.; LOCK, a. L.; RYAN, C. M.; NYDAM, D. V. Dry period plane of energy: Effects on feed intake, energy balance, milk production, and composition in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, p. 1–17, 2015.
- MCART, J. A.; NYDAM, D. V.; OETZEL, G. R.; OVERTON, T. R.; OSPINA, P. A. Elevated non-esterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate and their association with transition dairy cow performance. **Veterinary Journal**, v. 198, n. 3, p. 560–70. doi: 10.1016/j.tvjl.2013.08.011. Epub 2013, 2013.
- MEGLIA, G. E.; JOHANNISSON, a; PETERSSON, L.; WALLER, K. P. Changes in some blood micronutrients, leukocytes and neutrophil expression of adhesion molecules in periparturient dairy cows. **Acta veterinaria Scandinavica**, v. 42, n. 1, p. 139–150, 2001.
- MEGLIA, G. E.; JOHANNISSON, A.; AGENÄS, S.; HOLTENIUS, K.; WALLER, K. P. Effects of feeding intensity during the dry period on leukocyte and lymphocyte subpopulations, neutrophil function and health in periparturient dairy cows. **Veterinary Journal**, v. 169, n. 3, p. 376–384, 2005.
- MENDONÇA, L. G. D.; LITHERLAND, N. B.; LUCY, M. C.; KEISLER, D. H.; BALLOU, M. a.; HANSEN, L. B.; CHEBEL, R. C. Comparison of innate immune responses and somatotrophic axis components of Holstein and Montbéliarde-sired crossbred dairy cows during the transition period. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 96, p. 1–11, 2013.
- MOREIRA, T. F.; FACURY FILHO, E. J.; MENESES, R. M.; MENDONÇA, F. L. M.; LIMA, J. A. M.; CARVALHO, A. U. Energetic status of crossbreed dairy cows during transition period in two different seasons. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 5, p. 1327–1334, 2015.
- MOYES, K. M.; LARSEN, T.; FRIGGENS, N. C.; DRACKLEY, J. K.; INGVARTSEN, K. L. Identification of potential markers in blood for the development of subclinical and clinical mastitis in dairy cattle at parturition and during early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 11, p. 5419–5428, 2009.
- NATZKE, R. P.; EVERETT, R. W.; BRAY, D. R. Effect of overmilking on udder health. **Journal of Dairy Science**, v. 65, n. 1, p. 117–25, jan. 1982. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7042783>>. Acesso em: 4 abr. 2016.
- NEWMAN, A.; MANN, S.; NYDAM, D. V.; OVERTON, T. R.; BEHLING-KELLY, E. Impact of dietary plane of energy during the dry period on lipoprotein parameters in the transition period in dairy cattle. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 100, n. 1, p. 118–126, 2016.
- NICKERSON, S. C. Immunological aspects of mammary involution. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 6, p. 1665–1678, 1989.

NIKOLIĆ, J. a; KULCSÁR, M.; KÁTAI, L.; NEDIĆ, O.; JÁNOSI, S.; HUSZENICZA, G. Periparturient endocrine and metabolic changes in healthy cows and in cows affected by mastitis. **Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical medicine**, v. 50, n. 1, p. 22–29, 2003.

OSPINA, P. A.; MCART, J. A.; OVERTON, T. R.; STOKOL, T.; NYDAM, D. V. Using nonesterified fatty acids and ??-hydroxybutyrate concentrations during the transition period for herd-level monitoring of increased risk of disease and decreased reproductive and milking performance. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 29, n. 2, p. 387–412, 2013.

PAAPE, M. .; 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, set. 2003.

PESSOA, R. B.; BLAGITZ, M. G.; BATISTA, C. F.; SANTOS, B. P.; PARRA, A. C.; SOUZA, F. N.; DELLA LIBERA, A. M. M. P. Avaliação da apoptose de leucócitos polimorfonucleares CH138+ em leite bovino de alta e baixa contagem de células somáticas? Dados preliminares. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 3, p. 533–539, 2012.

PICCIONE, G.; MESSINA, V.; MARAFIOTI, S.; CASELLA, S.; GIANNETTO, C.; FAZIO, F. Changes of some haematochemical parameters in dairy cows during late gestation, post partum, lactation and dry periods. **Veterinarija ir Zootechnika**, v. 58, n. 80, p. 59–64, 2012.

PICCIONE, G.; MESSINA, V.; SCHEMBARI, A.; CASELLA, S.; GIANNETTO, C.; ALBERGHINA, D. Pattern of serum protein fractions in dairy cows during different stages of gestation and lactation. **Journal of Dairy Research**, v. 78, p. 421–425, 2011.

POGLIANI, F. C.; BIRGEL JÚNIOR, E. H. Valores de referência do lipidograma de bovinos da raça holandesa, criados no Estado de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, n. 5, p. 373–383, 2007.

PYÖRÄLÄ, S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. **Veterinary Research**, v. 34, n. 1, p. 565–578, 2003.

RINALDI, M.; MORONI, P.; PAAPE, M. J.; BANNERMAN, D. D. Differential alterations in the ability of bovine neutrophils to generate extracellular and intracellular reactive oxygen species during the periparturient period. **Veterinary Journal**, v. 178, n. 2, p. 208–213, 2008.

ROBERT, A.; SEEGER, H.; BAREILLE, N. Incidence of intramammary infections during the dry period without or with antibiotic treatment in dairy cows--a quantitative analysis of published data. **Veterinary research**, v. 37, n. 1, p. 25–48, jan. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16336923>>. Acesso em: 31 mar. 2016.

ROWLANDS, G. J.; LITTLE, W.; KITCHENHAM, B. A. Relationships between blood composition and fertility in dairy cows--a field study. **The Journal of dairy research**, v. 44, n. 1, p. 1–7, mar. 1977.

RUEGG, P. L. Investigation of mastitis problems on farms. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 19, n. 1, p. 47–73, 2003.

RUEGG, P. L. New Perspectives in Udder Health Management. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p. 149–163, 2012.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 799–806, 2001.

SAUT, J. P. .; BIRGEL JUNIOR, E. . VARIAÇÃO DOS CONSTITUINTES DO ERITROGRAMA EM VACAS HOLANDESES NO PÓS-PARTO ERYTHROGRAM PROFILE DURING POSTPARTUM PERIOD IN HOLSTEIN COWS. **BIOSCIENCE JOURNAL**, v. 28, n. 5, p. 805–809, 2012.

SAUT, J. P. E.; BIRGEL JÚNIOR, E. H. Influência do período pós-parto sobre o leucograma de fêmeas bovinas da raça holandesa. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 5, p. 588–597, 2006.

SCALIA, D.; LACETERA, N.; BERNABUCCI, U.; DEMEYERE, K.; DUCHATEAU, L.; BURVENICH, C. In vitro effects of nonesterified fatty acids on bovine neutrophils oxidative burst and viability. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 1, p. 147–54, 2006.

SCHRICK, F. N.; HOCKETT, M. E.; SAXTON, a M.; LEWIS, M. J.; DOWLEN, H. H.; OLIVER, S. P. Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 6, p. 1407–1412, 2001.

SCHUKKEN, Y. H.; BAR, D.; HERTL, J.; GRÖHN, Y. T. Correlated time to event data: Modeling repeated clinical mastitis data from dairy cattle in New York State. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 97, n. 3-4, p. 150–156, 2010.

SCHUKKEN, Y. H.; WILSON, D. J.; WELCOME, F.; GARRISON-TIKOFSKY, L.; GONZALEZ, R. N. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. **Veterinary Research**, v. 34, n. 5, p. 579–596, set. 2003.

SEIFI, H. A.; MOHRI, M.; FARZANEH, N.; NEMATİ, H.; NEJHAD, S. V. Effects of anionic salts supplementation on blood pH and mineral status, energy metabolism, reproduction and production in transition dairy cows. **Research in Veterinary Science**, v. 89, n. 1, p. 72–77, 2010.

SILVESTRE, F. T.; CARVALHO, T. S. M.; CRAWFORD, P. C.; SANTOS, J. E. P.; STAPLES, C. R.; JENKINS, T.; THATCHER, W. W. Effects of differential supplementation of fatty acids during the peripartum and breeding periods of Holstein cows: II. Neutrophil fatty acids and function, and acute phase proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 5, p. 2285–2301, 2011.

SMITH, K. L.; HOGAN, J. S. The physiology of mammary glands during the dry period and the relationship to infection. **21st Annu. Mtg. Natl. Mastitis Counc., Inc.**, p. 87, 1982.

SORDILLO, L. M. Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. **Livestock Production Science**, v. 98, n. 1-2, p. 89–99, 2005.

- SORDILLO, L. M. Nutritional strategies to optimize dairy cattle immunity. **Journal of Dairy Science**, p. 1–16, 2016.
- SORDILLO, L. M.; AITKEN, S. L. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1-3, p. 104–109, 2009.
- SORDILLO, L. M.; CONTRERAS, G. a; AITKEN, S. L. Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows. **Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases**, v. 10, n. 1, p. 53–63, 2009.
- SORDILLO, L. M.; MAVANGIRA, V. The nexus between nutrient metabolism , oxidative stress and in fl ammation in transition cows. p. 1204–1214, 2014.
- SORDILLO, L. M.; RAPHAEL, W. Significance of metabolic stress, lipid mobilization, and inflammation on transition cow disorders. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 29, n. 2, p. 267–278, 2013.
- SOUZA, F. N.; MONTEIRO, A. M.; DOS SANTOS, P. R.; SANCHEZ, E. M. R.; BLAGITZ, M. G.; LATORRE, A. O.; NETO, A. M. F.; GIDLUND, M.; LIBERA, A. M. M. P. Della. Antioxidant status and biomarkers of oxidative stress in bovine leukemia virus-infected dairy cows. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 143, n. 1-2, p. 162–166, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.05.028>>.
- STELWAGEN, K.; CARPENTER, E.; HAIGH, B.; HODGKINSON, A.; WHEELER, T. T. Immune components of bovine colostrum and milk. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 13 Suppl, p. 3–9, 2009.
- TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.
- TODOROVIĆ, M. J.; DAVIDOVIĆ, V. Changes in white blood pictures and some biochemical parameters of dairy cows in peripartum period and early lactation. **Mljekarstvo**, v. 62, n. 2, p. 151–158, 2012.
- VERWEIJ, J. J.; KOETS, a. P.; EISENBERG, S. W. F. Effect of continuous milking on immunoglobulin concentrations in bovine colostrum. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 160, n. 3-4, p. 225–229, 2014.
- WEBER, C.; LOSAND, B.; TUCHSCHERER, A.; REHBOCK, F.; BLUM, E.; YANG, W.; BRUCKMAIER, R. M.; SANFTLEBEN, P.; HAMMON, H. M. Effects of dry period length on milk production, body condition, metabolites, and hepatic glucose metabolism in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 3, p. 1772–85, 2015.
- ZADOKS, R. N.; ALLORE, H. G.; BARKEMA, H. W.; SAMPIMON, O. C.; WELLENBERG, G. J.; GRÖHN, Y. T.; SCHUKKENT, Y. H. Cow- and quarter-level risk factors for *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* mastitis. **Journal of dairy science**, v. 84, n. 12, p. 2649–63, 2001.