



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

EFEITO DE UM IMUNOMODULADOR NA QUALIDADE DO  
COLOSTRO E NA INCIDÊNCIA DE DOENÇAS NO PÓS-  
PARTO DE VACAS LEITEIRAS

ANA CATARINA GASPAR DO NASCIMENTO

**Constituição do Júri:**

Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas

Doutor George Thomas Stilwell

Doutor José Ricardo Dias Bexiga

**Orientador:**

Doutor George Thomas Stilwell

**Co-Orientador:**

Dr. José Inácio Oliveira Alface

2017

LISBOA

---

Este estudo foi apoiado por:

Fonte de Leite Exploração Agrícola e Pecuária, S.A.



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

EFEITO DE UM IMUNOMODULADOR NA QUALIDADE DO  
COLOSTRO E NA INCIDÊNCIA DE DOENÇAS NO PÓS-  
PARTO DE VACAS LEITEIRAS

ANA CATARINA GASPAR DO NASCIMENTO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**Constituição do Júri:**

Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas

Doutor George Thomas Stilwell

Doutor José Ricardo Dias Bexiga

**Orientador:**

Doutor George Thomas Stilwell

**Co-Orientador:**

Dr. José Inácio Oliveira Alface

2017

LISBOA

---

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, por serem o meu porto de abrigo, por estarem sempre presentes e nunca deixarem que nada falte, pela força e amor incondicional.

Ao meu irmão, João, pela preciosa ajuda nos cálculos de Biomatemática e Melhoramento Animal, pela boa disposição e sentido de humor contagiantes.

Ao Professor Doutor George Stilwell, por ter aceite orientar o meu estágio curricular. Obrigada pelos conselhos e apoio durante a realização do estágio e dissertação, por estar sempre disponível, pela transmissão de conhecimentos, simpatia, empenho e dedicação.

Ao Dr. José Alface, por ter aceite ser meu Co-Orientador, pela confiança transmitida, por todos os conhecimentos partilhados, pela disponibilidade, pela simpatia e paciência, pelo contributo indispensável no meu desenho experimental. Um grande obrigado!

Ao Eng.<sup>o</sup> João Diogo, à Eng.<sup>a</sup> Susana e ao Eng.<sup>o</sup> Jorge, pela colaboração no meu desenho experimental e conhecimentos partilhados. A eles e a todos os outros trabalhadores da Fonte de Leite um agradecimento muito especial pela amizade, carinho e simpatia.

À Dr.<sup>a</sup> Cristina Andreu e Dr. Tiago Salvado, pelo acompanhamento do meu desenho experimental, pela ajuda e total disponibilidade para esclarecerem as minhas dúvidas, pela análise estatística dos meus dados.

Ao Dr. Hugo Pissarra e às técnicas do Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária pela simpatia, disponibilidade e ajuda que prestaram na observação das lâminas de esfregaços de colostro.

À Fonte de Leite Exploração Agrícola e Pecuária, S.A. por ter financiado este estudo e ter disponibilizado vários materiais necessários durante a realização do mesmo.

Aos meus colegas de estágio, Carlota, Zé e João, pelos conhecimentos partilhados, pelos momentos de alegria e diversão durante o estágio. A eles e a todos os amigos que fiz na faculdade.

A todos, Muito Obrigada!

## Resumo

### EFEITO DE UM IMUNOMODULADOR NA QUALIDADE DO COLOSTRO E NA INCIDÊNCIA DE DOENÇAS NO PÓS-PARTO DE VACAS LEITEIRAS

Este estudo analisou a eficácia do pegbovigrastim (Imrestor™) na incidência de doenças no pós-parto de vacas leiteiras e o seu efeito na qualidade do colostro.

Às vacas do grupo experimental foi administrado pegbovigrastim e às vacas do grupo controlo soro fisiológico.

Não se observaram diferenças significativas no número de neutrófilos e macrófagos nos esfregaços de colostro. Contudo, os seus valores máximos foram superiores no colostro de vacas do grupo Imrestor™. Verificou-se que no colostro não centrifugado das vacas tratadas com Imrestor™ o número de linfócitos foi tendencialmente superior ( $p=0,08$ ). O colostro de vacas que receberam as duas doses de Imrestor™ teve uma média de 300 mil células/ml superior ao colostro do grupo controlo.

A incidência de mastites, metrites e RP foi inferior no grupo experimental, comparativamente ao grupo controlo, contudo esta redução não foi estatisticamente significativa.

O valor Brix foi semelhante entre os dois grupos em estudo.

Não se observaram diferenças significativas entre os dois grupos na produção leiteira acumulada no primeiro mês após o parto.

A percentagem de vacas com hipercetonémia foi 5,3% no grupo experimental e 8,2% no grupo controlo.

É de todo o interesse que futuramente se desenvolvam mais estudos de modo a obter conclusões mais consolidadas.

**Palavras-chave:** pegbovigrastim, colostro, mastite, metrite, retenção placentária, periparto

## **Abstract**

### **EFFECT OF AN IMMUNOMODULATOR IN THE QUALITY OF COLOSTRUM AND THE INCIDENCE OF DISEASES IN THE POSTPARTUM OF DAIRY COWS**

This study examined the efficacy of pegbovigrastim (Imrestor™) on the incidence of postpartum diseases in dairy cows and its effect on the quality of colostrum.

Cows in the experimental group received pegbovigrastim and cows in the control group saline solution.

No significant differences were observed in the number of neutrophils and macrophages in the colostrum. However, its maximum values were higher in colostrum of the Imrestor™ group. It was found that in the non-centrifuged colostrum of cows treated with Imrestor™ the number of lymphocytes was tendentially higher ( $p=0,08$ ). The colostrum of cows that received the two doses of Imrestor™ was an average of 300,000 cells/ml higher than colostrum in the control group.

The incidence of mastitis, metritis and RP was lower in the experimental group, compared to the control group, but this reduction was not statistically significant.

The Brix value was similar between the two groups under study.

There were no significant differences between the two groups in milk production accumulated in the first month after calving.

The percentage of cows with hyperketonemia was 5.3% in the experimental group and 8.2% in the control group.

It is of great interest that more studies are carried out in the future in order to obtain more consolidated conclusions.

**Keywords:** pegbovigrastim, colostrum, mastitis, metritis, placental retention, peripartum

## Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo .....	ii
Abstract .....	iii
Lista de Figuras .....	vi
Lista de Tabelas .....	vi
Lista de Gráficos.....	vi
Lista de abreviaturas e siglas.....	vii
Relatório de Estágio .....	ix
I PARTE – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
1. Introdução.....	1
2. Imunidade em vacas de produção .....	1
2.1. Imunidade Inata .....	3
2.2. Imunidade Adquirida .....	5
3. Colostro .....	6
3.1. Anticorpos no colostro.....	8
3.2. Leucócitos no colostro .....	9
3.3. Citoquinas no colostro.....	12
3.4. Fatores que influenciam a absorção de Ig.....	13
3.5. Qualidade do colostro .....	14
3.6. Avaliação da qualidade do colostro .....	15
3.6.1 Medição Direta .....	15
3.6.2 Medição Indireta.....	15
4. Mastites .....	17
5. Retenção Placentária.....	19
6. Metrites.....	21
7. Cetose .....	22
8. Fator estimulador de colónias de granulócitos .....	23
8.1 Fatores estimuladores de colónias de granulócitos recombinantes humanos .....	23
8.2 Fator estimulador de colónias de granulócitos em bovinos .....	24
II PARTE - CASO DE ESTUDO .....	29
9. Objetivos.....	29
10. Material e Métodos .....	29
10.1. Descrição da Exploração .....	29
10.2. Amostra .....	29
10.3. Desenho Experimental .....	30
10.4. Recolha de dados .....	32
10.4.1. Mastites Clínicas .....	32
10.4.2. Metrites .....	32
10.4.3. Retenção Placentária .....	32
10.5. Colheita das amostras.....	33
10.6. Protocolo experimental.....	33
10.7 Análise estatística .....	34
11. Resultados.....	34
11.1 Animais excluídos do estudo.....	34
11.2 Interpretação de Box-Plot.....	35
11.3 Intervalo de dias entre as doses de Imrestor™ .....	35

11.4 Número de lactações .....	36
11.5 Duração do período de secagem .....	36
11.6 Efeito na qualidade do colostro .....	37
11.7 Incidência de mastites, metrites e retenção placentária .....	38
11.8 Valor Brix .....	39
11.9 Produção leiteira no primeiro mês após o parto .....	39
11.10 Células somáticas no leite.....	41
11.11 Vacas com cetose subclínica .....	41
12. Discussão .....	41
13. Conclusão.....	46
14. Bibliografia .....	48
Anexo 1 – Resumo das Características do Medicamento (Imrestor™).....	52



## Lista de Figuras

Figura 1 – Atividade dos neutrófilos durante o parto	2
Figura 2 – As consequências da imunossupressão e BEN (adaptado de Ruiz et al., 2017)	3
Figura 3 – Efeito do Imrestor™ na contagem de neutrófilos durante o parto	25
Figura 4 – Efeito do Imrestor™ na percentagem de MPO libertada pelos neutrófilos	26

## Lista de Tabelas

Tabela 1 – Animais do grupo experimental	30
Tabela 2 – Relação entre o número de lactações e a média de CCS presentes no colostro	37
Tabela 3 – Resumo da análise estatística referente à incidência de Mastites (MAS), Metrites (MET) e Retenção Placentária (RP)	39
Tabela 4 – Número de animais com complicações no grupo controlo e grupo experimental	40

## Lista de Gráficos

Gráfico 1 – Intervalo de dias entre as doses de Imrestor™	35
Gráfico 2 – Distribuição do número de lactações do grupo controlo	36
Gráfico 3 – Distribuição do número de lactações do grupo experimental	36
Gráfico 4 – Duração do período de secagem nas vacas em estudo	36
Gráfico 5 – Relação entre o número de neutrófilos de colostro não centrifugado e o grupo controlo (0) e grupo experimental (1)	37
Gráfico 6 – Relação entre o número de neutrófilos de colostro centrifugado e o grupo controlo (0) e grupo experimental (1)	37
Gráfico 7 – Relação entre o número de macrófagos de colostro não centrifugado e o grupo controlo (0) e grupo experimental (1)	38
Gráfico 8 – Relação entre o número de macrófagos de colostro centrifugado e o grupo controlo (0) e grupo experimental (1)	38
Gráfico 9 – Relação entre o valor Brix e o grupo controlo (0) e o grupo experimental (1)	39
Gráfico 10 – Produção de leite acumulada no primeiro mês após o parto no grupo controlo (0) e grupo experimental (1)	40
Gráfico 11 – Produção acumulada de leite no primeiro mês de lactação em vacas que não desenvolveram, MAS ou MET ou RP (0) e em vacas que desenvolveram (1)	40
Gráfico 12 – Produção acumulada de leite em vacas sem complicações pós-parto (0) ou com complicações(1)	41

## Lista de abreviaturas e siglas

ACTH – Hormona Adrenocorticotrófica  
APC – Célula Apresentadora de Antígeno  
ADN – Ácido Desoxirribonucleico  
BEN – Balanço Energético Negativo  
bG-CSF - Fator estimulador de colónias de granulócitos bovinos  
BHBA - Betahidroxibutirato  
BRV – Vírus Sincicial Respiratório Bovino  
BVDV – Vírus da Diarreia Viral Bovina  
CCS – Contagem de Células Somáticas  
COL+ - Colostro com leucócitos  
COL- - Colostro sem leucócitos  
CRH - Hormona libertadora de Corticotrofina  
DA – Deslocamento do abomaso  
DAE – Deslocamento do abomaso à esquerda  
*E.coli* – Escherichia coli  
FMV – UL – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa  
FTP – Falha de Transferência Passiva  
G-CSF - Fator estimulador de colónias de granulócitos  
IFN- $\gamma$  – Interferão gama  
Ig - Imunoglobulina  
IL - Interleucina  
IMS – Ingestão Matéria Seca  
LPS - Lipopolissacáridos  
MAS – Mastite  
MET – Metrite  
MHC - Complexo Maior de Histocompatibilidade  
MPO - Mieloperoxidase  
NEFA - Ácidos gordos não esterificados  
NET - *Neutrophil Extracellular Traps*  
PAMPs - Padrões moleculares associados aos antígenos  
PEG - Polietilenoglicol  
PEG-bG-CSF – Fator estimulador de colónias de granulócitos bovinos peguados  
PMN – Polimorfonuclear neutrófilo  
rhG-CSF – Fator estimulador de colónias de granulócitos recombinante humano  
RID - Imunodifusão Radial  
RP – Retenção Placentária  
STP - Proteínas Séricas Totais

TLRs - *Toll-like receptors*

TNF-  $\alpha$  - Fator de necrose tumoral  $\alpha$

UFC – Unidade Formadora de Colônias

## Relatório de Estágio

No seguimento da conclusão do estágio curricular, do curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, é elaborado o presente relatório, com a finalidade de apresentar as atividades desenvolvidas durante o mesmo.

As atividades de estágio dividiram-se em dois períodos. O primeiro período de estágio, sob a orientação do Professor Dr. George Stilwell, teve a duração de três meses e consistiu no acompanhamento das aulas práticas da disciplina de Clínica de Espécies Pecuárias, onde se realizaram visitas a várias explorações de bovinos e caprinos. O segundo período de estágio, sob orientação do Dr. José Alface, decorreu na exploração leiteira Fonte de Leite S.A e consistiu no acompanhamento do trabalho do Médico Veterinário e dos engenheiros zotécnicos da exploração durante dois meses e meio.

O estágio teve como finalidade consolidar e ampliar conhecimentos na área de clínica e cirurgia de animais de produção, especialmente bovinos de leite, e contactar com a realidade profissional diária.

Durante as visitas com o Professor George Stilwell a autora teve a oportunidade de contactar com diversos casos clínicos, o que lhe permitiu desenvolver competências de diagnóstico. A autora fez vários exames de estado geral o que proporcionou criar uma rotina para um exame detalhado e sistemático. Além disso foi estimulado o raciocínio clínico, através da discussão dos casos e realização de diagnósticos diferenciais. Houve também foco na área da cirurgia, onde foi possível participar em algumas cirurgias, com especial destaque para a resolução cirúrgica de dois deslocamentos do abomaso à esquerda (DAE) por abomasopexia com acesso pelo flanco esquerdo em vacas leiteiras, a colaboração na realização de uma vulvoplastia de caslick e na resolução de uma *atresia coli* com anastomose topo-a-topo a uma vitela. Na maior parte das saídas foi possível recolher amostras de sangue, fezes, leite ou de outro tipo, para posterior realização de pesquisas de agentes patogénicos nos diferentes laboratórios da FMV-UL. Um exemplo da colheita de amostras, foi a recolha de fezes a dois vitelos, num parque com sete vitelos, com história de diarreia, tendo sido efetuado o envio para o laboratório de parasitologia para pesquisa de *Cryptosporidium*. A autora desenvolveu também competências na área da reprodução e obstetrícia, através da assistência a dois partos e na técnica de palpação retal e diagnósticos de gestação (104 animais), por vezes, com recurso à imagiologia. Foi possível proceder à deteção de claudicações e observar a realização de tratamentos podais e cortes funcionais. Foram também realizadas vacinações e desparasitações a 183 ovinos e a 108 suínos. Durante o estágio existiu igualmente a oportunidade de fazer necrópsias em alguns animais, desenvolvendo assim esta técnica de elevada importância. Foram realizadas 3 necrópsias, na primeira foram encontradas lesões compatíveis com endocardite severa complicada por pneumonia, na segunda necrópsia, a uma cabra, foram encontradas lesões de hepatização e abscessos no pulmão e na terceira necrópsia existiu história de morte

súbita após o parto, timpanismo, intestino delgado com gás e pequenos focos de equimoses, suspeitando-se de clostridiose.

No segundo período do estágio a autora teve a oportunidade de acompanhar o trabalho do Médico Veterinário, o Dr. José Alface, em regime permanente na exploração leiteira Fonte Leite S.A. e dos engenheiros zootécnicos da exploração. O trabalho realizado compreendeu diferentes áreas nomeadamente, a deteção de mastites clínicas e controlo da qualidade do leite na sala de ordenha. Para esse efeito era feita a visualização dos jatos de leite, uso do Teste Californiano de Mastites, recolha de amostras de leite por rotina para microbiologia e ainda era praticada regularmente uma monitorização do número de células somáticas no leite dos tanques. Também era feita semanalmente a secagem das vacas e vacinação com Rotavec® Corona e por vezes era necessário testar-se a presença de resíduos de antibiótico no leite com o kit Delvotest®. Foram realizados exames clínicos às vacas em fase de produção e na fase de recria e instituída a terapêutica adequada a cada situação. Na avaliação do estado geral das vacas, foi possível realizar o exame físico, nomeadamente, auscultação cardiopulmonar e ruminal, medição da temperatura, palpação retal, análise da urina através da interpretação de fitas urinárias, deteção sanguínea de corpos cetónicos e administração de medicamentos. Todas as semanas também se realizava o controlo reprodutivo, com diagnósticos de gestação ao 1º e 3º mês pós-inseminação e antes das vacas serem secas, por ecografia transretal e por palpação retal respetivamente. Além dos diagnósticos de gestação também eram feitos protocolos de sincronização de cios. Regularmente procedia-se à avaliação da condição uterina das vacas no período pós-parto e medição de temperatura retal.

Semanalmente eram realizadas vacinações e descorna de vitelos. Efetuaram-se lavagens transtraqueais a vitelos para pesquisa dos possíveis agentes causadores de pneumonia. Os resultados obtidos demonstraram a presença de *Mycoplasma* e *Pasteurella multocida*, sendo esta última resistente à colistina e oxitetraciclina, mas sensível a ampicilina, amoxicilina, cefalosporina de 1ª e 3ª geração, gentamicina, enrofloxacina, sulfamida e trimetopim e marbofloxacina. Também se procedeu à recolha de sangue na veia jugular nos vitelos para avaliar a qualidade do encolostramento.

Em relação à área cirúrgica foi possível participar em algumas cirurgias, nomeadamente na resolução cirúrgica de catorze DAE, por abomasopexia no lado esquerdo ou omentopexia no lado direito. Durante o período de estágio foi possível acompanhar três casos de acidose, seis casos de hipocalcémia, seis casos de indigestão ruminal, 65 casos de mamite clínica, 28 casos de metrite e oito casos de retenção placentária. Surgiu ainda um caso de jejunita hemorrágica.

Foram realizadas algumas necrópsias de animais que morreram na exploração. Nos exames post-mortem realizados, foram identificadas como causas de morte: pneumonias em vitelos; um caso de mamite tóxica; um caso de lipomatose, em que a análise

histopatológica revelou necrose focal da gordura; uma vaca que apresentou lesões de pneumonia, enfisema subcutâneo generalizado e pneumotórax, suspeitando-se de serem lesões causadas pelo vírus sincicial respiratório bovino (BRSV); uma vaca, possivelmente devido à vacina de clostridiose, que desenvolveu uma reação inflamatória exuberante no antebraço e apresentou ao exame post-mortem atrofia muscular com extensa fibrose intermuscular.

Com a concretização destas tarefas em diferentes áreas foi possível fortalecer o conhecimento sobre a prática no manejo dos animais, da execução de exames físicos, da administração de medicamentos e vacinações, na visualização e auxílio de cirurgias e modo de funcionamento de uma exploração leiteira.



# **I PARTE – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## **1. Introdução**

A saúde e bem-estar das vacas leiteiras é essencial para a produção de leite de forma sustentável. O estado de saúde do efetivo é um parâmetro crucial para garantir a produtividade, eficiência e rentabilidade das explorações leiteiras.

Durante o período de transição ou periparto ocorrem numerosas alterações metabólicas e fisiológicas, principalmente devido às necessidades de lactação, que têm um grande impacto no balanço energético e na função imunitária. A vaca ao passar de um estado gestante não-lactante para um de não gestante lactante aumenta as suas necessidades energéticas para conseguir manter um nível produtivo cada vez maior. Durante este período, a vaca leiteira normalmente passa por um período de redução da ingestão de matéria seca (IMS), o que vai provocar um balanço energético negativo (BEN), deixando o animal vulnerável para problemas como cetose e de outras doenças associadas, como deslocamento do abomaso e hipocalcemia (Almeida, 2015). Além disso, nas duas a três semanas que antecedem o parto da vaca, a função dos neutrófilos diminui até cerca de 25-40%, sendo só recuperada por volta das três a quatro semanas após o parto (Elanco Animal Health, 2016). Como tal, durante este período o sistema imunitário da vaca está enfraquecido, podendo levar a doenças como mastite, metrite e retenção placentária, que podem comprometer o seu bem-estar e produtividade a longo prazo. Uma boa preparação desta etapa da vida produtiva da vaca é fundamental para o bem-estar animal e para a viabilidade das explorações.

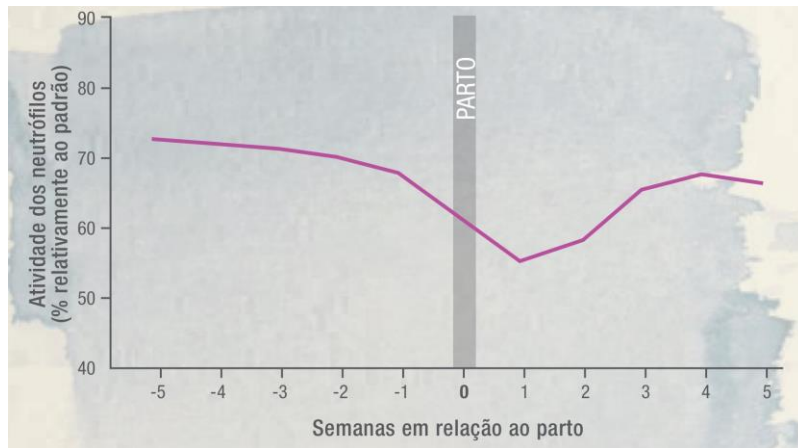
## **2. Imunidade em vacas de produção**

O sistema imunitário tem a capacidade de responder a  $10^9$ - $10^{11}$  tipos de agentes patogénicos. Isto é conseguido através de dois sistemas diferentes, mas interligados do sistema imunitário: a imunidade inata e a imunidade adquirida (Neal, 2013). Cada um tem funções e tempos de resposta específicos, mas trabalham em conjunto para proteger a vaca de agentes infecciosos (Chapman & O'Connor, 2010).

As vacas leiteiras apresentam uma diminuição da função das células imunitárias por volta da altura do parto (Kimura, Goff, Canning, Wang & Roth, 2014). Está bem documentado que o parto prejudica a resposta imunitária da vaca leiteira e que essa imunossupressão pode começar até 21 dias antes do parto (Ruiz, Tedeschi, & Sepúlveda, 2017). O número de polimorfonucleares neutrófilos (PMN) diminui gradualmente por volta de 2 a 3 semanas antes do parto, com o nadir a ocorrer por volta do momento do parto e depois gradualmente vai recuperando em 2 a 4 semanas (Kimura et al., 2014), como pode ser evidenciado na Figura 1.



Figura 1 – Atividade dos neutrófilos durante o periparto  
Imagem cedida por Elanco Animal Health Portugal



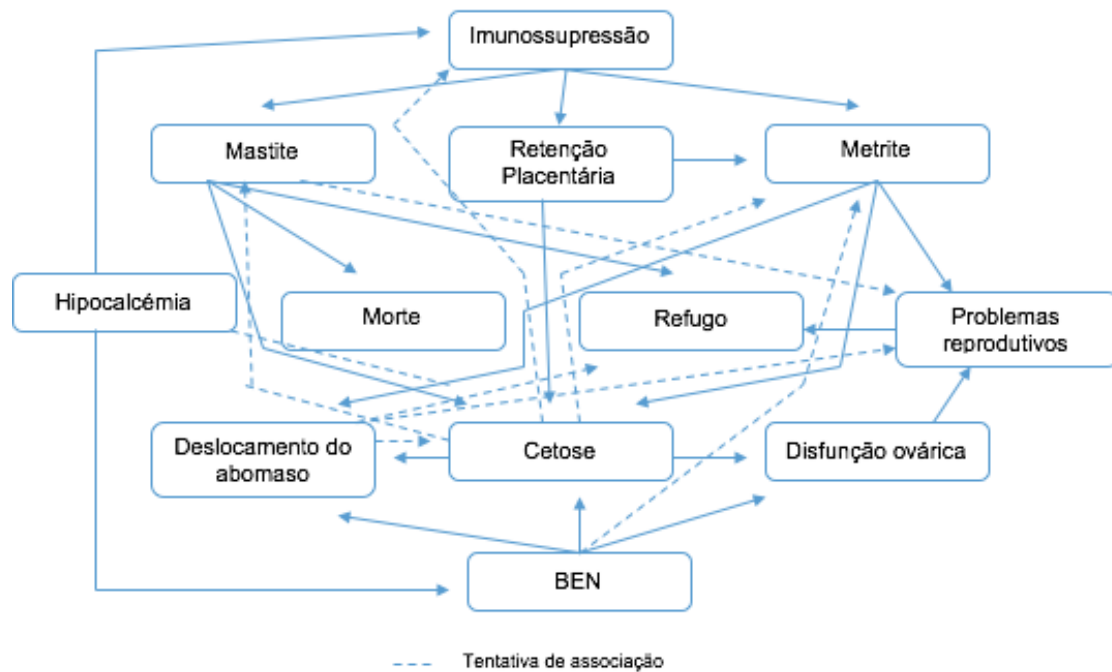
Esta imunossupressão está associada a uma alta incidência de doenças infecciosas. A metrite, a retenção placentária e a mastite são doenças conhecidas por estarem associadas à diminuição da função PMN. A razão para a diminuição da função PMN durante o periparto tem sido atribuída ao aumento da necessidade de nutrientes pelo crescimento fetal e pela produção de colostro no final da gestação. No início da lactação, a maioria das vacas atravessa por um BEN, bem como por alterações no estado mineral e vitamínico, que poderão contribuir para a diminuição da função PMN (Kimura et al., 2014). Uma suplementação com vitamina E, selénio e cobre pode melhorar a função PMN e reduzir a incidência de doenças (Kimura et al., 2014).

Sabe-se também que as vacas no periparto sofrem sempre de algum défice de imunidade, por diminuição das reservas de cálcio ou devido ao stress do parto. Para a produção de colostro, e para o início da lactação a vaca necessita de se adaptar e de mobilizar rapidamente energia e nutrientes, incluindo minerais como o cálcio. Sabe-se que para a ativação das células imunitárias é necessário que ocorra um aumento da concentração de cálcio intracelular, que vai funcionar como mensageiro secundário a sinais extracelulares (Williams, 2001).

O cálcio regula a proliferação celular, a produção de citoquinas e a expressão de recetores de citoquinas, bem como outras funções celulares (Kimura, Reinhardt & Goff, 2006).

As consequências do BEN e imunossupressão durante o periparto são mostradas na Figura 2.

Figura 2 – As consequências da imunossupressão e BEN (adaptado de Ruiz et al., 2017)



Estudos relacionados com o stress e imunidade demonstraram que muitos componentes do sistema imunitário inato e adquirido estão comprometidos durante períodos de stress. Em particular, alterações hormonais durante a altura do parto podem alterar a capacidade das células do sistema imunitário inato para responder a agentes patogénicos, através da inibição da produção de L-selectina, que é vital para a função normal dos neutrófilos (Chapman & O'Connor, 2010).

O stress metabólico estimula a hormona libertadora de corticotrofina (CRH), que por sua vez vai levar à produção de ACTH e, conseqüentemente, ao aumento da produção de corticosteroides. Alguns fatores que ocorrem na altura do parto, como distócia ou ajuda médico-veterinária, podem atuar como fatores de stress e aumentar o nível de cortisol e imunossupressão em vacas. O stress no periparto pode também ativar a produção de catecolaminas, especialmente a adrenalina, que durante a estimulação dos recetores adrenérgicos do miométrio, causam hipotonia ou atonia do útero, podendo levar a retenção placentária (Mordak & Anthony, 2015).

### 2.1. Imunidade Inata

A imunidade inata é a primeira linha de defesa do organismo, integrando mecanismos físico-químicos e celulares. Incluem barreiras mucocutâneas, secreções, microbiota da pele e mucosas, complemento e elementos como citocinas que reconhecem os microrganismos e

iniciam a resposta necessária para a sua eliminação (Rivera, Siracusa, Yap & Gause, 2016). As proteínas do complemento podem formar um poro na membrana celular, causando a lise de células infetadas. As citocinas são moléculas de comunicação, como a interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-8 e o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e estão envolvidas na resposta inflamatória. Estas citocinas aumentam a migração de fagócitos e causam vasodilatação, aumentando a eliminação de agentes patogénicos (Neal, 2013).

Durante as primeiras fases de uma infeção, a imunidade inata constitui a primeira linha de defesa onde também participam células como os macrófagos, neutrófilos e células *natural killer* (Rivera et al., 2016). Estas células envolvem agentes patogénicos invasores e degradam-nos em fragmentos mais pequenos. Após a sua degradação, o antigénio é expresso na superfície da célula e ativa outras células. Quando as células *natural killer* são ativadas, os grânulos citoplasmáticos libertam proteínas e proteases que lisam células infetadas com agentes patogénicos (Neal, 2013).

As células inatas são responsáveis pelo rápido reconhecimento da infeção e medeiam os mecanismos essenciais de eliminação de microrganismos patogénicos e também facilitam as respostas imunes adquiridas. Em vez de atuarem como células efetoras isoladas, as células inatas estão em comunicação constante com outras células que respondem ao sistema imunitário. Estas interações são muito importantes para o controlo eficiente de infeções primárias, bem como para o desenvolvimento de células inatas competentes que facilitam a rápida eliminação de infeções. Embora tradicionalmente vistas como células efetoras de curta duração que medeiam a eliminação de agentes patogénicos, os neutrófilos emergiram como importantes reguladores da imunidade inata e adquirida (Rivera et al., 2016).

Os neutrófilos têm origem e amadurecem na medula óssea e são, posteriormente, libertados para a circulação periférica. Após a passagem de um agente patogénico pelas barreiras epiteliais, os neutrófilos são as primeiras células imunes inatas que são rapidamente recrutadas da corrente sanguínea para locais de infeção. Ao reconhecerem os padrões moleculares associados aos antigénios (PAMPs), através dos *Toll-like receptors* (TLRs) localizados na sua superfície externa, os neutrófilos respondem a estes estímulos, fazem diapedese e migram para o local da infeção para realizar a fagocitose dos agentes patogénicos. O início da fagocitose requer o revestimento dos microrganismos com opsoninas que são reconhecidas por recetores de superfície específicos, cujo processo é denominado opsonização. As imunoglobulinas, desempenham um papel importante na opsonização das bactérias e subsequente reconhecimento por um recetor Fc específico presente na superfície dos neutrófilos (Teng, Ji A., Ji X. & Li, 2017).

Os neutrófilos podem servir como uma importante fonte de citocinas e quimiocinas para ativar e recrutar outras células do sistema imunitário. Além de ativar as funções de outras células inatas, os neutrófilos também podem atenuar as respostas imunes e promover a

resolução da inflamação através da produção de IL-10 que atenua as respostas de células dendríticas, monócitos e macrófagos (Rivera et al., 2016).

Os neutrófilos contêm grânulos que incluem enzimas tóxicas para os microrganismos, como peroxidase, fosfatase, lisozima, e péptidos catiónicos com atividade bactericida ou antiviral. Também possuem proteínas como a lactoferrina que capta zinco e ferro inibindo o crescimento bacteriano por diminuição da disponibilidade destes metais.

Os neutrófilos eliminam os microrganismos através da fagocitose ou através das enzimas referidas anteriormente, no entanto se tal não for possível, podem destruí-los extracelularmente eliminando o conteúdo dos seus grânulos para o exterior ou através da produção de estruturas extracelulares compostas por ADN e proteínas antimicrobianas denominadas *Neutrophil Extracellular Traps* (NET) (Guerrero, García & Casalta 2016).

Em vacas adultas existem aproximadamente 200 biliões de neutrófilos, metade em circulação e a outra metade aderida à parede dos vasos ou armazenada nos ossos (Chapman & O'Connor, 2010). A semi-vida dos neutrófilos é curta, entre 8 a 24 horas, e sofrem um processo de auto-destruição chamado de apoptose (Rivera et al., 2016).

Embora as células imunes inatas sejam rápidas a responder, não desenvolvem memória para agentes patogénicos anteriormente encontrados.

## **2.2. Imunidade Adquirida**

Ao contrário do sistema imune inato, as células do sistema imunitário adquirido reconhecem agentes patogénicos previamente encontrados. A primeira vez que uma célula imune adquirida se liga a um antigénio, passa por várias divisões, referida como expansão clonal. Durante a expansão clonal, a célula irá diferenciar-se em células efetoras de curta duração ou células de memória de longa duração (Neal, 2013).

O primeiro tipo de resposta na imunidade adquirida é a resposta mediada por células. A resposta imunitária mediada por células é composta por linfócitos T, distinguidos pela expressão superficial dos recetores das células T  $\alpha\beta$  ou  $\gamma\delta$ . Os dois principais subconjuntos de linfócitos  $\alpha\beta$  T incluem linfócitos T citotóxicos (CD8+) e linfócitos T helper (CD4+). Os linfócitos T CD8+ destroem diretamente as células imunitárias infetadas, produzindo citotoxinas e proteases. Os linfócitos T CD4+ estimulam a produção de anticorpos pelas células B, induzem o desenvolvimento de macrófagos e recrutam granulócitos. A célula T  $\gamma\delta$  pode responder diretamente a um agente patogénico, semelhante às células imunes inatas, ou ser ativada por fagócitos, como as células imunes adquiridas (Neal, 2013).

A resposta imune humoral é composta principalmente de células B. As células B amadurecem durante duas fases sequenciais. Uma fase independente de antigénio e uma fase dependente de antigénio. A fase independente do antigénio ocorre na medula óssea, nesta fase, todas as células B expressam IgM superficial e continuam a desenvolver-se no baço. A fase dependente de antigénio ocorre nos linfonodos, onde a estimulação antigénica

e a recombinação de genes leva a troca de isotipos, alterando a IgM de superfície para os isotipos IgG, IgA e IgE. A estimulação antigénica adicional resulta na expansão clonal de células B em plasmócitos ou células de memória de longa duração. Na corrente sanguínea, os anticorpos circulam e neutralizam agentes patogénicos. As células B de memória podem permanecer anos em órgãos linfóides como o baço, os linfonodos e a medula óssea (Neal, 2013).

Os vitelos recém-nascidos dependem predominantemente do seu sistema imunitário inato e das células T para proteção contra a doença durante as primeiras semanas de vida. As células B neonatais não iniciam uma produção apreciável de anticorpos até 4 a 5 semanas após o nascimento (Gelsinger & Heinrichs, 2017).

### **3. Colostro**

O colostro é a primeira secreção ordenhada da glândula mamária bebida pelo vitelo depois do parto e é uma fonte de imunidade passiva e nutrição essencial para o vitelo, fornecendo-lhe proteína e energia, anticorpos circulantes, além de desencadear a movimentação do mecónio no intestino e estimular o sistema enzimático digestivo. A formação do colostro inicia-se algumas semanas antes do parto, sob a influência de hormonas lactogénicas, como a prolactina, e termina abruptamente após o nascimento do vitelo. Apenas o leite da primeira ordenha após o parto pode ser considerado colostro, enquanto o leite da segunda à sexta ordenha é conhecido como leite de transição (Gratwick, 2015). O colostro tem uma composição diferente ao leite excretado subsequentemente. Assim, o colostro apresenta uma concentração de sólidos totais, gordura, proteína, imunoglobulinas e vitaminas superior e uma concentração inferior de lactose comparativamente ao leite de transição. A quantidade de sólidos e proteína decresce rapidamente no final do primeiro dia (Bovine Alliance on Management and Nutrition, 2001).

O colostro de um bovino contém uma contagem celular por mililitro, entre  $1 \times 10^6$  e  $2,5 \times 10^6$ , em que 30% são viáveis em colostro fresco. O colostro contém citoquinas, anticorpos e um elevado número de leucócitos maternos que conferem proteção ao vitelo recém-nascido (Novo et al., 2017). Estas células não serão viáveis em colostro que foi congelado (Costa et al., 2017) ou pasteurizado (Godden, 2008).

Os vitelos recém-nascidos necessitam do colostro materno como a sua primeira e mais importante fonte de nutrientes. A placenta sindesmocorial dos bovinos impede a passagem de proteínas séricas, principalmente imunoglobulinas (Ig) da mãe para o feto, pelo que os vitelos nascem agamaglobulinémicos, apresentando níveis inadequados de Ig circulantes. Consequentemente, a imunidade passiva é adquirida apenas após a ingestão de quantidade adequada de imunoglobulinas do colostro que são absorvidas através da parede do intestino, também conhecida como transferência passiva (Neal, 2013).

A ingestão e absorção inadequada de colostro podem levar a falha de transferência passiva (FTP), que pode ser responsável por uma mortalidade de 8% em vitelos (segundo um estudo de 2007 do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos), além de reduzir as taxas de crescimento e afetando negativamente a futura produção de leite (Halleran, Sylvester & Foster 2017). A FTP é definida como uma concentração sérica de IgG, medida através de imunodifusão radial (RID), inferior a 10 mg/ml às 24-48 horas de idade (Gratwick, 2015). Foi demonstrado que as novilhas que tiverem um nível sérico de IgG maior que 10 mg/ml nas primeiras 30-60 horas de vida atingem o seu peso para inseminação mais cedo do que as fêmeas com níveis mais baixos de IgG (Gratwick, 2015).

A presença de FTP em vitelos é determinada diretamente pela medição da concentração de IgG no soro do vitelo, utilizando um teste ELISA ou imunodifusão radial (RID), ou indiretamente medindo as proteínas séricas totais (STP) (Doepel & Bartier, 2014). Existe um consenso geral de que a concentração mínima de STP indicativa de transferência passiva adequada é de 5,2 g/dL, mas existe alguma variabilidade em torno desse valor, podendo variar entre 5,0 e 5,5 g/dL. Embora este intervalo seja geralmente útil, o estado de hidratação do vitelo deve ser considerado, uma vez que os vitelos desidratados têm o valor de STP elevado e podem ser classificados incorretamente como tendo uma transferência adequada de imunidade passiva. A correlação entre STP e concentração de IgG não é 100% porque o valor de STP mede proteínas diferentes de IgG (Doepel & Bartier, 2014).

De modo a evitar a FTP e garantir adequada proteção, os vitelos recém-nascidos devem ingerir uma quantidade adequada de colostro com alta concentração de imunoglobulinas nas primeiras horas de vida. O intestino delgado do vitelo recém-nascido permanece permeável a macromoléculas intactas, como imunoglobulinas e outras proteínas, até aproximadamente 24 horas após o nascimento, ocorrendo uma redução da absorção ao longo do tempo (Elizondo-Salazar & Heinrichs, 2009). Durante este período de tempo, as enzimas digestivas presentes no abomaso e no intestino delgado não funcionam ou a sua função encontra-se com uma atividade limitada, permitindo que as Ig atinjam o intestino delgado sem serem digeridas. Além disto, o colostro contém enzimas inibidoras que permitem a absorção intacta das Ig (Bovine Alliance on Management and Nutrition, 2001).

A presença de bactérias no intestino delgado no momento da ingestão do colostro pode interferir com a absorção sistêmica de imunoglobulinas (Elizondo-Salazar & Heinrichs, 2009). A eficiência da absorção de Ig é significativamente reduzida pela presença de bactérias no colostro devido à sua possível ligação a Ig livres no lúmen intestinal, bem como devido à interferência no transporte de moléculas de Ig através do epitélio intestinal (Mendonça, 2011). Além disso, se os enterócitos não estiverem saturados por proteínas do colostro, as bactérias patogênicas poder-se-ão ligar permitindo a sua colonização e, ao contactarem primeiro com os locais de absorção, o vitelo poderá correr risco de infecção, que poderá ser fatal (Bovine Alliance on Management and Nutrition, 2001). Por estes motivos, é

muito importante que o colostro seja ingerido o mais cedo possível após o nascimento, e que além do risco óbvio de exposição a potenciais agentes infecciosos, como *Mycobacterium avium paratuberculosis*, *Mycoplasma* spp, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp., recomenda-se que o colostro não seja ingerido com uma contagem total de bactérias superior a 100.000 ufc/ml ou coliformes totais superiores a 10.000 ufc/ml (Gratwick, 2015).

O tratamento térmico do colostro está a tornar-se uma prática comum em explorações leiteiras como meio de reduzir a infecção bacteriana em vitelos recém-nascidos e aumentar a absorção de IgG (Gelsinger & Heinrichs, 2017). Os protocolos de tratamento térmico recomendados exigem que o colostro seja aquecido a 60 °C e mantido a essa temperatura durante 30 a 60 minutos, com base nos dados de que a concentração de IgG e a viscosidade do colostro não são muito afetadas por este binómio temperatura-tempo (Gelsinger & Heinrichs, 2017).

Um estudo realizado por Gelsinger e Heinrichs (2017) onde compararam as respostas imunitárias em vitelos alimentados com colostro tratado termicamente ou não, verificou que o tratamento térmico não aumentou a absorção de IgG, contrariamente ao que é sugerido por vários autores. Neste mesmo estudo, o tratamento térmico reduziu a contagem bacteriana total e eliminou as bactérias coliformes. A quantidade de IgG presentes no colostro foi reduzida em 9,4%, resultando em 38,2 g a menos de ingestão de IgG por parte dos vitelos alimentados com colostro tratado termicamente (Gelsinger & Heinrichs, 2017).

O colostro pode ser conservado para uso futuro por refrigeração por um período limitado, ou congelação. Um estudo realizado por Costa et al. (2017) concluiu que a composição de colostro fresco e colostro congelado foi semelhante para IgG, sólidos totais, proteína, albumina e contagem total de coliformes. A única diferença significativa que identificaram entre o colostro fresco e congelado foi na viabilidade celular, sendo que o colostro fresco apresentou uma viabilidade celular de  $24 \pm 8\%$  e o colostro congelado 0%. Observaram que a percentagem de neutrófilos apresentou uma tendência significativa para ser mais elevada nos vitelos que ingeriram colostro fresco, relativamente aos vitelos alimentados com colostro que esteve congelado. A percentagem de neutrófilos diminuiu ao longo dos dias nos vitelos que ingeriram colostro fresco. Contudo, o mesmo não se verificou nos vitelos do grupo do colostro congelado, que mantiveram um nível de neutrófilos semelhante ao dia do parto. Esta diferença pode estar relacionada com uma maior eficácia da migração dos neutrófilos, dos vitelos alimentados com colostro fresco, da circulação para o intestino, após exposição a agentes patogénicos.

### **3.1. Anticorpos no colostro**

A absorção de anticorpos do colostro na circulação neonatal é o fator mais importante na saúde e na sobrevivência dos vitelos (Neal, 2013), embora leucócitos e citocinas também sejam importantes para a sua imunidade (Buczinski & Vandeweerd, 2016).

Os isótipos dos anticorpos presentes no colostro bovino incluem IgG, IgA e IgM e são representados a 85-90%, 5% e 7% dos anticorpos totais no soro, respetivamente. O isótipo IgG1 representa 80-90% e IgG2 representa 10-20% das IgG no colostro bovino (Doepel & Bartier, 2014). As IgM são produzidas em menor quantidade em relação às IgG, mas são mais eficientes na destruição de vírus (Mendonça, 2011). Estudos sugerem que, durante a formação do colostro, elevadas concentrações de IgG são transportadas seletivamente para a glândula mamária a partir do sangue através dos recetores presentes nas células epiteliais alveolares, enquanto que as IgM e IgA são produzidas localmente na glândula mamária a partir de células plasmáticas (Doepel & Bartier, 2014). A transferência de imunoglobulinas para o recém-nascido é altamente especializada em ruminantes. O soro sanguíneo materno do bovino contém muitas proteínas e classes de imunoglobulinas diferentes, mas apenas a classe IgG é transferida seletivamente em elevada quantidade para o colostro. As células da glândula mamária bovina contêm recetores de superfície para as IgG, o que fornece uma forte evidência de um mecanismo de transporte intracelular (Larson, Heary & Devery, 1979). As imunoglobulinas presentes no colostro materno refletem a exposição da vaca a doenças e é uma excelente fonte de Ig para o vitelo, que poderá vir a contactar com antígenos similares (Crawford, Quigley & Martin, 1995). Num estudo realizado por Crawford et al. (1995), onde administraram por via subcutânea Ig bovina a vitelos 24 horas após o parto, verificaram que a injeção subcutânea de Ig bovina não reflete necessariamente a história de doença da exploração e não deve ser considerada uma substituição para o colostro materno. Contudo, concluíram que a injeção subcutânea de Ig bovina proporcionou concentrações moderadas de Ig circulantes e parece ser uma opção viável para os vitelos hipogamaglobulinémicos com mais de 1 dia de vida.

### **3.2. Leucócitos no colostro**

De forma semelhante aos anticorpos, os leucócitos presentes no colostro podem passar passivamente através do epitélio intestinal para a circulação do vitelo (Neal, 2013).

O colostro contém uma variedade de constituintes celulares, incluindo leucócitos, nomeadamente macrófagos, linfócitos e neutrófilos (Larson et al., 1979).

O colostro bovino contém entre  $8,7 \times 10^5$  a  $3 \times 10^6$  leucócitos maternos (Neal, 2013). A sua percentagem diferencial varia consoante autores, assim e, segundo Neal (2013), 22-25% são linfócitos, 25-37% são neutrófilos e 40-45% são macrófagos. Por outro lado, segundo Costa et al. (2017), 13% são neutrófilos, 16% são linfócitos, 70% são macrófagos e células epiteliais e 0,3% são eosinófilos.

Num estudo realizado por Kalyan et al. (2010), sobre contagem diferencial de leucócitos no colostro de búfalos, o número de células somáticas presentes no colostro foi maior no primeiro dia após o parto e diminuiu até ao 5º dia pós-parto. Verificaram que a percentagem de neutrófilos presentes no colostro foi maior (36,91%) no primeiro dia após o parto,



diminuindo nos dias seguintes, com o valor mais baixo (24,90%) ao 5º dia. A percentagem de linfócitos aumentou ao longo dos 5 dias, passando de 54,35% a 64,43%. A percentagem de macrófagos foi maior no primeiro dia, diminuindo no segundo, e voltando a aumentar nos seguintes dias.

Os linfócitos foram as células predominantes, seguindo-se os neutrófilos e macrófagos. Os autores justificam estes resultados, com base em que o aumento do volume do úbere durante a gestação, resulta, geralmente, em níveis elevados de stress, o que pode ser responsável pelo aumento da contagem de células somáticas totais e neutrófilos no colostro do dia 1. Os valores retornam gradualmente aos valores normais à medida que o stress sobre o tecido do úbere diminui.

Existem evidências de que os leucócitos do colostro afetam a eliminação bacteriana *in vivo*. Num estudo realizado em 1993 por Riedel-Caspari, o colostro foi recolhido das vacas após o parto e subsequentemente centrifugado. O sobrenadante foi guardado e o sedimento dos leucócitos foi adicionado de novo ao colostro guardado (COL+) ou removido (COL-). Os vitelos foram infetados experimentalmente com uma estirpe de *E. coli* e, em seguida, foram alimentados com COL+ ou COL-. Os vitelos alimentados com COL+ excretaram menos unidades formadoras de colónias (UFC) de *E. coli* por grama de fezes durante os 3-6 dias de vida quando comparados com os vitelos alimentados com COL-. Adicionalmente, a secreção de *E. coli* em vitelos alimentados com COL+ atingiu o limite inferior de deteção mais cedo do que os vitelos alimentados com COL-. Finalmente, a concentração de anticorpos específicos de *E. coli* foi maior durante as primeiras 48 horas pós-infeção em vitelos alimentados com COL+, sugerindo que os leucócitos colostrais aumentaram a produção de linfócitos B. Estes dados sugerem que os leucócitos presentes no colostro podem ter um impacto na eliminação patogénica (Neal, 2013).

As células do colostro maternas também alteram a expressão dos recetores celulares. CD11a, CD43 e CD62L são três recetores celulares que estão envolvidos na migração celular através das células intestinais neonatais. CD11a é importante para a adesão dos leucócitos ao endotélio e facilita a migração através da superfície endotelial (Reber, Lockwood, Hippen & Hurley, 2005). CD43 é um recetor importante no movimento extravascular dos leucócitos. CD62L diminui o movimento dos leucócitos através dos vasos, permitindo um aumento do tempo em contacto com o endotélio e facilitando a adesão. Um estudo realizado por Reber et al. (2005), observou que a exposição a colostro com conteúdo celular, aumentou o número de células que expressaram CD43 e CD11a. Estes autores demonstraram que as células maternas não eram identificadas na circulação periférica neonatal 24 horas após a ingestão do colostro, justificando que estas células são direcionadas para os órgãos linfoides secundários, tendo a capacidade de conferir proteção ao vitelo.

As células maternas no colostro também influenciam a capacidade de expressão do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) pelos linfócitos. Num estudo realizado por Reber et al. (2005), os vitelos alimentados com COL+ tiveram uma maior percentagem de marcadores de superfície MHC classe I nos linfócitos. As células apresentadoras de antígenos usam o MHC-I para apresentar o antígeno às células T CD8<sup>+</sup>. O aumento de MHC-I sugere que as células apresentadoras de antígenos de vitelos alimentados com COL+ tiveram maior capacidade para ativar os linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Neal, 2013).

Os receptores CD25 e CD26 também foram analisados em linfócitos T em vitelos alimentados com COL+ ou COL-. As células T que expressam CD25 aumentaram em vitelos alimentados com COL+ no dia 7 quando comparados com vitelos alimentados com COL-. Adicionalmente, a expressão de CD26 aumentou em COL+ às 24 horas e ao dia 7. Poder-se-á supor que o aumento da expressão de CD25 e CD26 nos linfócitos é atribuído à transferência passiva de linfócitos T CD26<sup>+</sup> maternos através do intestino do vitelo e para a circulação (Neal, 2013).

Um estudo realizado por Neal (2013), verificou que os vitelos alimentados com colostro sem células apresentaram um número reduzido de células T CD4<sup>+</sup> nas primeiras 24 horas de vida quando comparadas com os vitelos alimentados com colostro fresco. As células T CD4<sup>+</sup> são responsáveis pelo aumento da capacidade fagocitária dos macrófagos, pelo recrutamento de neutrófilos para o local da infecção e aumento da produção de anticorpos pelas células B (Neal, 2013).

Os leucócitos do colostro também têm impacto nas respostas aos antígenos da vacinação, *in vitro*. Num estudo realizado em 2007, as vacas gestantes receberam uma vacina, incluindo BVDV inativado, antes do parto. Os vitelos foram alimentados com colostro fresco, colostro congelado ou colostro sem células após o nascimento. Foi realizada a recolha de sangue todos os dias aos vitelos e os leucócitos foram isolados e estimulados com um antígeno de BVDV ou um antígeno de controlo, contra o qual as vacas não foram vacinadas. Nenhum dos vitelos respondeu ao antígeno de controlo, no entanto, os leucócitos de vitelos alimentados com colostro fresco proliferaram em resposta ao antígeno de BVDV. Não houve resposta proliferativa observada em leucócitos de vitelos alimentados com colostro congelado ou sem células. Isto sugere que as células de memória específicas de antígenos maternas podem migrar do sangue para a glândula mamária durante a colostrogénese. Estes dados sugerem que o colostro contém linfócitos B e T de memória que podem modular a resposta imune neonatal e pode aumentar a capacidade do vitelo para responder a agentes patogénicos (Neal, 2013).

Estes estudos indicam que a transferência de células do colostro para os tecidos dos vitelos aumenta a sua resposta imunitária inata e específica.

### 3.3 Citoquinas no colostro

As citoquinas inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  podem ser encontradas no colostro bovino. Tal como o componente celular do colostro, as citoquinas podem passar passivamente através do intestino em vitelos recém-nascidos (Neal, 2013). Hagiwara et al. (2000) descreveram concentrações elevadas de IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-6 no colostro bovino, que diminui em cada ordenha subsequente, semelhante à IgG. Em animais adultos, essas citoquinas são importantes para ativar as células imunes e estimular as respostas pró-inflamatórias. Além disso, também podem estar envolvidas na ativação da resposta imune neonatal (Gelsinger & Heinrichs, 2017).

Goto et al. (1997) determinaram que as concentrações de IL-1 $\beta$  no soro dos vitelos estavam positivamente correlacionadas com a concentração de IL-1 $\beta$  no colostro ingerido. Hagiwara et al. (2000) demonstraram que a mesma citoquina foi absorvida por vitelos recém-nascidos e induziu maior proliferação de linfócitos T. Pesquisas posteriores demonstraram maior estimulação de linfócitos neonatais após exposição a citoquinas colostrais, indicando que estas são importantes para o desenvolvimento imunológico neonatal (Gelsinger & Heinrichs, 2017).

A pasteurização do colostro reduz as concentrações de lactoferrina e pode causar perdas de outras proteínas biologicamente ativas, incluindo citoquinas (Gelsinger & Heinrichs, 2017). Portanto, será de esperar que os vitelos sejam capazes de absorver citoquinas do colostro, mas que a absorção será menor em vitelos que receberam colostro pasteurizado. Além disso, é de esperar que a redução da absorção de citoquinas afete o desenvolvimento imunológico neonatal. Estes factos foram comprovados por um estudo realizado por Gelsinger e Heinrichs (2017), já mencionado anteriormente, em que aquecer o colostro a 60°C durante 60 minutos resultou em menor concentração de IL-1 $\beta$  no soro e no plasma nos vitelos, 24 a 48 horas e 14 dias após o nascimento. O tratamento térmico do colostro pode ter provocado agregação ou precipitação de IL-1 $\beta$ , tornando-a indisponível para absorção pelo vitelo. Segundo os mesmos autores, uma maior produção endógena também pode explicar uma concentração sérica de IL-1 $\beta$  mais elevada em vitelos que ingeriram colostro fresco. É possível que uma concentração bacteriana maior no colostro fresco proporcione maior estimulação de células imunes neonatais, resultando em concentrações plasmáticas de citoquinas mais elevadas (Gelsinger & Heinrichs, 2017).

O IFN- $\gamma$  é produzido por células T ativadas e por células *natural killer*. Como esta citoquina promove a expressão de MHC, e leva à ativação de macrófagos, neutrófilos e células *natural killer*, é considerada importante no desenvolvimento de uma resposta celular imunomediada eficaz (Nonnecke, Kimura, Goff & Kehrl, 2003).

### 3.4 Fatores que influenciam a absorção de Ig

A eficiente absorção de IgG em vitelos é afetada por diversos fatores, estando descrito que o momento de ingestão é o mais crítico. A conclusão de Stott et al. (1979), foi que as maiores taxas de absorção ocorrem nas primeiras quatro horas após a alimentação. Outros autores referem que o vitelo recém-nascido deve ingerir o colostro nas primeiras duas horas após o parto, e caso não seja possível, não deve ultrapassar as seis horas. Tais tendências são consequência de mudanças fisiológicas permanentes que ocorrem no sistema gastrointestinal do vitelo entre as 24 e 30 horas de idade, o que reduz a permeabilidade do intestino delgado a macromoléculas (Halleran et al., 2017). Nas primeiras 24 horas de vida, os enterócitos dos vitelos recém-nascidos têm capacidade de absorção não-seletiva de macromoléculas, como as Ig, através da pinocitose. As Ig são transportadas através do epitélio intestinal e libertadas nos vasos linfáticos por exocitose, entrando depois na circulação sistêmica através do ducto torácico. Quando a permeabilidade dos enterócitos às macromoléculas termina, a absorção de Ig para a circulação não ocorre, apenas confere imunidade local no lúmen intestinal (Godden, 2008).

Quando o colostro é ordenhado passadas mais de duas horas após o parto, o nível de IgG é significativamente menor do que o colostro ordenhado num período de tempo mais curto. Como a vaca produz leite após o parto, o leite dilui o colostro, cuja síntese pára no momento do parto, portanto, com o aumento do tempo após o parto que a vaca não é ordenhada, as concentrações de IgG diminuem de forma constante (Doepel & Bartier, 2014). Além disso, pode existir reabsorção de IgG pela glândula mamária ou perda de colostro pelo teto.

Relativamente à quantidade a ingerir, segundo um estudo realizado por Conneely et al. (2014), onde os vitelos foram alimentados com 7, 8,5 ou 10% do seu peso vivo com colostro, concluíram que a média das concentrações séricas de IgG foi maior para os vitelos alimentados com 8,5% do seu peso vivo, sugerindo uma saturação para a absorção de IgG (Halleran et al., 2017). A quantidade de colostro que deve ser consumido pelos vitelos nas primeiras seis horas de vida é um volume que fornece pelo menos 100 gramas de IgG, embora alguma literatura sugira que 150 a 200 gramas é mais apropriado (Doepel & Bartier, 2014). Como este parâmetro não é rotineiramente avaliado, a recomendação atual é alimentar os vitelos Holstein com 4 L de colostro o mais rápido possível após o parto e os vitelos Jersey com 3 L (Doepel & Bartier, 2014).

Quanto ao modo de administração, deixar o vitelo mamar exclusivamente da mãe pode resultar num consumo voluntário inadequado de colostro dentro da janela crítica das seis horas e assim contribuir para o desenvolvimento de FTP. Um método de ingestão de colostro é através de sonda esofágica, contudo com este tipo de alimentação, entre 500 a 1000 mL do colostro podem permanecer no reticulo-rúmen até 3 horas, alongando o tempo que o colostro leva para atingir o intestino delgado onde ocorre a absorção. Este atraso no transporte para o intestino delgado resultará em menores quantidades de IgG a serem

absorvidas e subseqüentes níveis mais baixos de IgG no soro (Doepel & Bartier, 2014). Além disso, ao inserir a sonda, podem ser causados traumatismos no esófago do vitelo e, podem ocorrer, eventualmente, falsos trajetos (Mendonça, 2011). Apesar destas desvantagens, a sonda esofágica é o método mais aconselhável. Uma alternativa à sonda esofágica é o uso de biberon. Contudo, com este método os vitelos podem ingerir uma quantidade de colostro inadequada, contribuindo para a FTP.

A absorção de Ig também poderá ser reduzida pela presença de acidose respiratória, que pode persistir durante mais de 24 horas, visto que um parto normal é, geralmente, acompanhado por momentos de hipóxia (Quigley & Drewry, 1998).

### **3.5. Qualidade do colostro**

Vários fatores como a idade da vaca, o número de partos e a raça, têm-se mostrado importantes na qualidade do colostro. A concentração de IgG é maior no colostro de vacas das raças Jersey e Ayreshire do que em Holsteins, o que pode ser devido a um efeito de diluição, uma vez que maior produtividade de colostro tem sido associada a menor qualidade. A qualidade do colostro também aumentou com a idade da vaca, pois as novilhas tendem a produzir colostro com menor concentração de IgG do que os animais múltiparos (Gratwick, 2015), visto que estes tiveram maior exposição a vários agentes patogénicos (Mendonça, 2011). Existem também fatores de gestão que têm um impacto na qualidade do colostro. O encurtamento do período seco de 60 a 40 dias não demonstrou ter efeito sobre a qualidade do colostro, mas a redução adicional para 21 dias ou a omissão completa do período seco tem sido associada a concentrações significativamente menores de Ig. A vacinação de vacas durante a gestação demonstrou aumentar a concentração de anticorpos específicos para certos agentes patogénicos e pode ser benéfica para a saúde dos vitelos (Gratwick, 2015).

A qualidade do colostro deteriora-se rapidamente após o parto devido à diluição. Como tal, e como referido anteriormente, deve ser ordenhado o mais rapidamente possível após o parto, não devendo passar mais de duas horas sobre o parto. Idealmente, o colostro deve ser ordenhado da vaca e alimentado diretamente ao seu próprio vitelo, desde que tenha boa qualidade (Gratwick, 2015).

O armazenamento do colostro também pode influenciar a sua qualidade. A rápida refrigeração do colostro é uma forma de diminuir o crescimento bacteriano. O melhor processo de refrigeração será dividir o colostro em quantidades pequenas, entre um a dois litros, e colocar, numa primeira fase, garrafas de gelo em contacto com o colostro fresco, num rácio gelo-colostro de 1:4. Este método vai permitir que o colostro ordenhado da vaca atinja os 15 °C em 30 minutos. Se isto se verificar, as bactérias coliformes não terão iniciado a sua multiplicação exponencial. Nos seguintes 150 minutos, o colostro deve ser refrigerado a 4°C (Kuratomi & Leadley, 2007).

Alternativamente, o colostro pode ser congelado até um ano, desde que vários ciclos de congelamento-descongelamento não ocorram. Os congeladores no-frost não são bons para o armazenamento prolongado do colostro, visto que atravessam por vários ciclos de congelamento-descongelamento (Quigley, 1997). A descongelação pode ser realizada com água morna (38°C) ou lentamente num microondas. A exposição a temperaturas acima de 60°C levará à desnaturação de Ig (Gratwick, 2015).

### **3.6 Avaliação da qualidade do colostro**

A qualidade do colostro depende principalmente da quantidade de anticorpos que contém. O colostro de alta qualidade é definido como tendo uma concentração de IgG superior a 50 mg/ml (Bielmann, 2010). A medição da qualidade do colostro de cada vaca é altamente benéfica e pode ser realizada como parte de um programa de manejo de colostro. A medição da densidade específica ou dos sólidos totais do colostro proporciona uma estimativa útil da concentração de IgG, mas poderá ser afetada pelo teor de gordura da amostra (Gratwick, 2015).

#### **3.6.1 Medição Direta**

Aparelhos de medição direta, como o ensaio de Imunodifusão Radial (RID), medem os níveis reais de anticorpos presentes no colostro. Os ensaios RID são considerados o *gold standard* e são frequentemente utilizados durante ensaios experimentais. Estes testes são realizados em laboratório utilizando protocolos padronizados e fornecem resultados muito precisos e repetíveis. O anticorpo específico do antigénio a ser medido (IgG bovino) é misturado num gel e colocado numa placa de Petri. A amostra de colostro ou soro sanguíneo é colocada num poço perfurado no gel e o antigénio (IgG bovino) da amostra difunde-se radialmente no gel até que seja atingido o equilíbrio com o seu anticorpo específico no gel. Quando ocorre o equilíbrio é formado um anel ou aureola do precipitado antigénio-anticorpo e o diâmetro deste anel é proporcional à concentração da proteína específica na amostra (Guiory & Pearson, 1979 citado por Arede, 2013).

No entanto, estes ensaios RID são caros e os resultados muitas vezes demoram mais de 24 horas, pelo que este método não é uma maneira prática para avaliar a qualidade do colostro no dia-a-dia.

#### **3.6.2 Medição Indireta**

Existem aparelhos de medição indireta como o refratómetro que é um instrumento ótico que mede a quantidade de luz refratada assim que esta atravessa um líquido. No colostro, as

proteínas fazem com que a luz sofra refração. Como uma grande proporção da proteína no colostro é IgG, as amostras com altos níveis de IgG causarão mais refração de luz (Bielmann, 2010). Os refratômetros têm diferentes escalas de medição, dependendo do uso pretendido. Para a medição no colostro, utiliza-se um refratômetro calibrado na escala Brix, sendo que os valores são lidos em percentagem. A escala Brix é usada para medição do conteúdo de açúcar em frutos, cerveja, vegetais, mel e vinho. Pode ser usado para medir o total de sólidos de algumas gotas de colostro com muito pouco efeito da temperatura. Assim, este aparelho tem sido também usado para medir a qualidade de colostro de vacas (Quigley et al., 2013).

Devido às imunoglobulinas se encontrarem em grande percentagem na proteína total do colostro e conseqüentemente nos sólidos totais, o nível de anticorpos na amostra é altamente correlacionada com a quantidade de luz refratada. Quando esta técnica é utilizada, para que o colostro seja considerado de boa qualidade (>50 mg/ml de IgG) deve ter um valor Brix  $\geq 22\%$  (Buczinski & Vandeweerd, 2016). Isto é verdadeiro tanto para o colostro fresco como para o congelado e para os refratômetros óticos ou digitais (Bielmann, 2010). O colostro com  $18 \leq \text{Brix} < 22\%$  pode ser considerado como de qualidade duvidosa, e é recomendada a adição de colostro congelado; quando o Brix é inferior a 18% deve ser considerado como de má qualidade, não devendo ser dado aos vitelos (Buczinski & Vandeweerd, 2016). Os refratômetros Brix são instrumentos precisos, económicos, duráveis e os resultados são praticamente instantâneos. Podem ser utilizados com colostro a qualquer temperatura sem que haja distorções de resultados e requerem apenas algumas gotas de líquido para realizar o teste. Encontram-se disponíveis na forma ótica e digital. Os refratômetros digitais apresentam o número exato da leitura e apesar de serem mais caros, podem-se tornar convenientes e de uso mais fácil e rápido (Quigley et al., 2013). A sensibilidade é de 90,5-92,5% e a especificidade é de 80-85%, indicando que esta é uma ferramenta de teste com exactidão.

Outro aparelho de medição indireta para avaliar a qualidade do colostro é o colostrómetro. Este instrumento é muito simples de utilizar e foi projetado para flutuar numa amostra de colostro e medir indiretamente a sua densidade específica. Regra geral, quanto mais IgG no colostro, mais denso será e maior será a leitura da densidade específica. O instrumento é frágil e facilmente parte-se. Os colostrómetros tendem a sobrevalorizar a qualidade do colostro e, em média, classificam duas em cada três amostras de baixa qualidade como aceitáveis. Isto significa que uma leitura de boa qualidade pode realmente não conter anticorpos suficientes. As leituras pelo colostrómetro são afetadas pela temperatura, espessura da amostra e teor de gordura e sólidos totais. Como tal, é necessário arrefecer o colostro até à temperatura ambiente antes da sua utilização. Amostras de colostro refrigeradas a 4°C, terão uma leitura sobrestimada e amostras de colostro com uma temperatura superior a 20°C, terão uma leitura subestimada (Morin, Constable, Maunsell &

McCoy, 2001). O colostro recém-ordenhado pela máquina de ordenha terá grandes quantidades de pequenas bolhas de ar (nem sempre visíveis macroscopicamente), que reduzem a densidade da amostra, dando uma leitura falsamente baixa no colostrómetro (Bielmann, 2010).

A densidade específica do colostro pode variar consoante o mês do parto, sendo que as vacas que parem no verão têm valores mais baixos, enquanto os partos no outono apresentam valores mais altos. Estes resultados podem ser devidos ao stress térmico, pois o stress por calor em vacas em lactação diminui a sua IMS, a produção de leite e as concentrações de proteína e gordura no leite e as concentrações de proteína, IgG, IgA, gordura e lactose no colostro (Morin et al., 2001).

A avaliação visual do colostro, observando a cor e consistência é o método menos preciso. O teste visual baseia-se na noção de que um colostro mais denso e mais escuro ficará mais concentrado e, portanto, terá níveis mais elevados de IgG. Infelizmente, a raça e o teor de gordura pode afetar a aparência do colostro independentemente da concentração de IgG. No entanto, uma avaliação visual é melhor do que nenhuma, e torna-se mais valiosa quando usado em combinação com outro teste indireto, como o colostrómetro ou refratómetro (Bielmann, 2010).

#### **4. Mastites**

As mastites são tidas como a doença mais frequente e com maior impacto económico na indústria leiteira, uma vez que são responsáveis pela diminuição da produção e aumento dos seus custos, bem como pela redução da qualidade do leite. No universo das doenças mais comuns em bovinos leiteiros, as mastites representam cerca de 38% da totalidade dos custos diretos. Quando ocorre invasão por microrganismos, a glândula mamária ativa as suas defesas e as células do sistema imunitário presentes no sangue migram para o leite. O leite tem sempre alguma quantidade de células somáticas, contudo, e como o aumento das células somáticas é parte importante da resposta do sistema imunitário, é a medida mais usada como indicador da presença de mastite subclínica. As células somáticas correspondem essencialmente a leucócitos, e a uma pequena percentagem de células epiteliais (NMC, 1998).

O limiar de contagem de células somáticas de leite que geralmente é usado na deteção de mastites subclínicas é 200.000 células/ml. Com contagens de células abaixo deste limiar é provável que a glândula mamária esteja livre de infeção intramamária, contudo não é um valor absoluto, estando associado à probabilidade. Contagens abaixo de 200.000 células/ml não asseguram a ausência de infeção, apenas existe uma maior probabilidade do leite ser proveniente de uma glândula sem inflamação, logo, sem infeção (Fox, 2013).



Apesar de décadas de pesquisa e uso de múltiplos métodos para o controlo de infeções bacterianas, incluindo antissépticos, selantes, melhorias no equipamento de ordenha, desenvolvimento de vacinas contra agentes patogénicos específicos, as mastites continuam a ser uma importante fonte de perdas económicas para os produtores de leite em todo o Mundo.

A genética animal e as práticas de manejo podem afetar substancialmente a imunidade da glândula mamária e a suscetibilidade à infeção intramamária (Hassfurth, TerHune & Canning, 2014). Além das barreiras anatómicas nos tetos, a proteção da glândula mamária contra a invasão microbiana requer uma interação complexa e coordenada entre o sistema imunitário inato e adquirido. Os bovinos apresentam períodos de maior suscetibilidade à mastite clínica durante o periparto, iniciando-se 1 a 2 semanas antes do parto e continuando até 3 semanas após o parto. Os neutrófilos desempenham um papel fundamental na defesa durante as infeções intramamárias e são o tipo de célula primária na glândula mamária no início de uma infeção (Hassfurth et al., 2014).

A inflamação da glândula mamária é muito dolorosa para as vacas e tem um impacto muito negativo sobre o seu bem-estar. Além disso, o facto de uma vaca sofrer de mastite multiplica por quatro o risco de desenvolver mastite em lactações posteriores (Elanco Animal Health, 2016).

Quando ocorre uma agressão na glândula mamária, isto desencadeia um processo inflamatório, no qual se geram citocinas, principalmente TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-8. A concentração destas citocinas no leite tem uma correlação direta com a gravidade da doença, atingindo níveis mais elevados quando a doença é mais grave (Guerrero et al., 2016).

O sistema mais eficaz de defesa do úbere contra agentes patogénicos é a atividade fagocítica dos neutrófilos. Normalmente, estas células estão presentes no leite em número muito reduzido, predominando macrófagos e linfócitos. Os PMNs são movidos pela presença de infeção ou por lesão tecidual e têm como função a fagocitose para eliminação dos microrganismos (NMC, 1998). Os PMNs podem ser ajudados na sua ação por células mononucleares, macrófagos e linfócitos. Estas células ajudam a recrutar novas células para a glândula mamária e a produzir anticorpos necessários para aumentar a fagocitose específica (Fox, 2013). O recrutamento de neutrófilos dentro da glândula mamária é, como referido, provavelmente desencadeado pela presença de bactérias e produtos bacterianos, que estimulam a formação de mediadores inflamatórios endógenos. Estes mediadores conduzem a uma marginalização de neutrófilos nos capilares, provocam um relaxamento das junções das células endoteliais e permitem uma diapedese dos neutrófilos nos tecidos conjuntivos circundantes. Os neutrófilos, por sua vez, podem libertar outros agentes inflamatórios, acelerando ainda mais o processo de mobilização de neutrófilos.

A participação ativa destas células e moléculas no processo inflamatório, assim como as

capacidades patogénicas dos microrganismos, causam destruição tecidual, que poderá provocar a perda funcional do parênquima mamário e, conseqüentemente, em perda de produção leiteira (Guerrero et al., 2016).

## **5. Retenção Placentária**

A retenção placentária, como já foi referido, é uma doença associada à imunossupressão e, mais recentemente, foi correlacionada com uma diminuição da função dos neutrófilos (Ruiz et al., 2017). A RP causa perdas financeiras significativas, pode diminuir a produção de leite, diminuir a condição corporal, aumentar o risco para as vacas desenvolverem metrite, diminuir a fertilidade e aumentar as taxas de refugo (Ruiz et al., 2017).

A normal expulsão da placenta em vacas é um processo multifatorial, devido à combinação de fatores hormonais, metabólicos e imunitários (Moretti, Probo, Cantoni, Paltrinieri & Giordano, 2016).

Durante o parto e na presença de imunossupressão, a proliferação de leucócitos, especialmente linfócitos e neutrófilos, está diminuída, assim como a capacidade de fagocitose dos neutrófilos, a atividade citotóxica dos linfócitos e produção da interleucina-8. Devido a estas alterações, a resposta imune materna e a expulsão das membranas fetais estão prejudicadas, podendo resultar em retenção placentária (Mordak & Anthony, 2015).

Dentro de 6 a 9 h após o parto, as membranas fetais que permanecem no útero começam a deteriorar-se e tornam-se num meio de cultura adequado para bactérias. Essas bactérias podem causar, inicialmente, uma metrite puerperal e posteriormente uma endometrite clínica ou subclínica, o que resulta na involução tardia do útero e na regressão tardia do corpo lúteo após o parto (Mordak & Anthony, 2015).

Durante o parto normal, o reconhecimento imunológico materno de proteínas fetais de classe I do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) expressas por células trofoblásticas, desencadeia uma resposta imunitária, que contribui para a separação da placenta. A maturação da placenta é especialmente importante para o reconhecimento imunológico e rejeição das membranas fetais. Os péptidos fetais do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) de classe I provenientes de células do trofoblasto, destruídas durante o parto, podem ser apresentadas por células apresentadoras de antígenos maternas (APC) por moléculas do MHC de classe II e, ser reconhecidas por linfócitos T helper. O reconhecimento de antígenos do trofoblasto pelos linfócitos T helper é transmitido por citocinas (IL-2) aos linfócitos T citotóxicos para a ativação da apoptose, como resposta celular. Além disso, os linfócitos T helper reconhecem antígenos do trofoblasto através de células dendríticas ou macrófagos e estimulam a ativação de linfócitos B como resposta humoral. Como consequência, os linfócitos ativados e as APC produzem interleucina-8 (IL-8), que atrai neutrófilos para os placentomas e ativam a fagocitose (Mordak & Anthony, 2015).

A IL-8 é uma citocina com grande capacidade quimiotática e de ativação de neutrófilos, presente nos placentomas de vacas sem RP. É produzida por uma grande variedade de células, como monócitos, neutrófilos ativados, células endoteliais e epiteliais, na presença de estímulos inflamatórios, tais como lipopolissacarídeos ou Interleucina-1. Os neutrófilos são fortemente atraídos para áreas com altas concentrações de IL-8. Esta interleucina também é secretada pelo útero e placenta em humanos e a sua quantidade aumenta no final da gestação (Kimura, Goff, Kehrl & Reinhardt, 2002). Os neutrófilos de vacas com RP são menos reativos a estímulos quimiotáticos do que vacas sem RP (Mordak & Anthony, 2015).

Num estudo realizado por Moretti et al. (2016), estes verificaram que as vacas com RP apresentaram menor circulação de neutrófilos após o parto, comparando com vacas sem RP.

Um estudo realizado por Kimura et al. (2002), onde os animais foram considerados como tendo RP se a placenta não foi expelida dentro das 24 h após o parto, verificaram que existiu uma baixa atividade quimiotática, expressa pelo número de células observadas em 5 campos microscópicos, nos sete dias antes do parto até ao primeiro dia pós-parto, bem como uma redução da atividade da mieloperoxidase (MPO) nos primeiros 14 dias de lactação, em vacas que desenvolveram RP. Concluíram que a função dos neutrófilos estava diminuída antes e depois do parto, e, como tal, sugeriram que esta diminuição não se deve à RP, mas que é uma causa de RP. Demonstraram ainda que a neutralização de IL-8 no sobrenadante cotiledonar, pela ação de anticorpos contra a IL-8, reduziu as propriedades quimiotáticas da preparação cotiledonar. A IL-8 secretada pelos cotilédones e útero pode ser absorvida na circulação sistémica, recrutar e ativar neutrófilos. Outra possível função para a IL-8 é a de aumentar a secreção de colagenase, que acelera a separação dos cotilédones fetais das carúnculas maternas (Kimura et al., 2002).

Um estudo mais recente, realizado por Moretti et al. (2016), observou que existiu um aumento do número de leucócitos e neutrófilos e uma diminuição no número de eosinófilos na corrente sanguínea, em vacas que não tiveram RP, o que pode ser justificado por ser uma resposta normal ao stress e inflamação. O número de leucócitos não teve alterações ao longo do tempo em vacas com RP, mas estas apresentaram um número inferior de neutrófilos circulantes e monócitos ao parto, comparativamente às vacas sem RP. Isto pode dever-se à redução na circulação de neutrófilos e monócitos no parto, levando a uma insuficiente migração destas células até ao endométrio, numa fase em que as células fagocitárias são necessárias para uma correta dissolução do colagénio na junção dos cotilédones com as carúnculas.

Foi demonstrado que existem menos imunoglobulinas no colostro de vacas com RP, comparativamente a vacas sem RP, o que pode ser explicado pelo facto de que a RP causa redução da capacidade dos linfócitos em produzir imunoglobulinas. Contudo, é mais

provável que a diminuição de Ig no colostro de vacas com RP esteja associada com a redução da função imunitária antes do parto e consequente suscetibilidade para RP (Kimura et al., 2002).

Vários estudos em vacas com RP chegaram à conclusão que vacas que sofreram hipocalcémia têm três vezes maior probabilidade de sofrer RP do que vacas com calcémia normal. Além da hipocalcémia por si só ser um fator de risco para RP, predispõe para distócia que por sua vez é um fator de risco para RP (Houe et al. 2001 citado por Mulligan et al., 2006).

Num estudo de Melendez et al. (2004), as concentrações de cálcio foram inferiores passadas seis horas após o parto em vacas com RP, mas no estudo de Moretti et al. (2016) não foram encontradas diferenças na concentração de cálcio das vacas com e sem RP. Neste estudo, a hipocalcémia foi observada tanto em vacas com RP como sem RP após o parto, provavelmente dependente do aumento da secreção de cálcio no colostro e da capacidade inadequada da vaca para mobilizar cálcio ósseo, de modo a restabelecer a concentração sanguínea nos dias após o parto (Moretti et al., 2016).

## **6. Metrites**

Antes de ocorrer o parto, durante a gestação, o lúmen uterino era considerado um ambiente estéril. Todavia, nos dias de hoje, num estudo realizado por Karstrup et al. (2017), concluiu-se que, durante a gestação, o útero bovino não apresenta um ambiente estéril, como anteriormente assumido por outros autores, e que uma vaca pode ter uma gestação apesar da presença de algumas bactérias potencialmente patogênicas no útero.

Após o parto, o cérvix, a vagina e a vulva deixam de exercer o efeito de barreira física contra contaminações do exterior, havendo dilatação do cérvix e relaxamento da vulva. Surge então uma oportunidade para as bactérias ascenderem no trato genital a partir do ambiente exterior, da pele do animal e também das fezes. De facto, está descrito que quase a totalidade das vacas leiteiras têm contaminação bacteriana do útero por volta das duas semanas após o parto. É importante manter presente que é possível existir contaminação bacteriana no lúmen uterino de vacas que não exibem sinais clínicos de infecção no útero (Sheldon et al., 2009).

O aumento da incidência de metrite, numa primeira abordagem, pode ser explicada pela maior incidência de doenças que predisponham para estas afeções, como distócia, RP e atrasos na involução uterina.

Os neutrófilos são as primeiras células fagocitárias a serem recrutadas para eliminar as bactérias e contribuir para a formação de pús no útero. Inicialmente, o mecanismo de defesa imunitário inato desempenhado pelos PMN é o predominante no sistema de defesa do útero. Estas células possuem TLRs que detetam componentes microbianos, como as endotoxinas, o peptidoglicano e o DNA bacteriano. Está comprovado que as células do endométrio

também possuem estes recetores, um dos quais, o TLR-4, que deteta os lipopolissacáridos (LPS) da membrana das bactérias gram-negativas, tornando-se importante na defesa contra agentes como *E. coli*. Forma-se então uma cascata de interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8), que levam a um maior recrutamento de células do sistema imunitário (Sheldon & Dobson, 2004). Como a iniciação da cascata de sinalização e da resposta imune inata está dependente da quantidade de TLR-4 envolvida no reconhecimento do LPS, assim que a produção destas moléculas está diminuída, a capacidade de identificação do agente patogénico presente pelos neutrófilos no pós-parto diminui (Younger, 2016).

## 7. Cetose

Em vacas leiteiras, o BEN que ocorre durante o período de transição induz a ativação da via metabólica da lipólise, que é refletida pelo aumento de ácidos gordos não esterificados (NEFA) e corpos cetónicos no sangue. Estas moléculas são responsáveis por efeitos diretos e indiretos nas funções do fígado e das células imunes que podem determinar, por um lado um estado inflamatório e, por outro lado, uma supressão da capacidade de resposta imune. Ambos os fatores aumentam a predisposição para doenças como endometrite, cetose, DA e RP (Moretti et al., 2016).

Os corpos cetónicos demonstram algum grau de variação diurna relacionada com a ingestão alimentar, mas o betahidroxibutirato (BHBA) é aquele que apresenta uma variação mais marcada. O pico de BHBA ocorre 4 a 5 horas após a ingestão alimentar, sendo que uma hora após a ingestão alimentar o animal apresenta um pico de BHBA relacionado com a produção ruminal deste corpo cetónico a partir do ácido butírico (Eicher et al., 1998 citado por Oetzel, 2004).

A medição dos corpos cetónicos pode ser realizada no sangue, no leite ou na urina. O BHBA é mais estável na circulação sanguínea que o acetoacetato ou a acetona e encontra-se em quantidade predominante. Para determinar o BHBA no sangue, verificou-se que, um dos métodos eficazes e rápidos é a utilização de um aparelho portátil Precision Exceed® utilizando uma pequena quantidade de sangue, através de colheita na veia coccígea. O aparelho foi concebido para doseamento de corpos cetónicos em humanos, no entanto a sua utilização foi recentemente validada para bovinos com uma sensibilidade de 85% e uma especificidade de 98% (Iwersen et al., 2009; Voyvoda & Erdogan, 2010).

Para monitorizar a cetose subclínica em vacas leiteiras pode ser usado o betahidroxibutirato, considerando-se que existe hipercetonémia quando o valor de BHBA for maior que 1,2mmol/l (Moretti et al., 2016).

Testes rápidos realizados na urina e no leite têm sido tradicionalmente utilizados para o diagnóstico ou acompanhamento da cetose clínica e subclínica. A deteção de valores elevados de corpos cetónicos no leite, realiza-se a partir da reação da acetona e do acetoacetato com o nitroprussiato de sódio. A interpretação deste teste é semi-quantitativa,

estando associada com a intensidade de reação do nitroprussiato de sódio. O BHBA não reage com este produto, contudo, existem métodos que permitem a identificação de BHBA no leite, como por exemplo, tiras identificadoras de BHBA (Ketotest™) (Larsen & Nielsen, 2005).

Tal como no leite, a deteção de corpos cetónicos na urina é realizada através da reação do nitroprussiato de sódio com o acetoacetato e acetona. Este teste é mais sensível através da urina, uma vez que a concentração de acetoacetato é superior nesse líquido orgânico. Vários estudos referem a hipercetonémia como uma causa possível de disfunção dos leucócitos em ruminantes. Está descrito que o BHBA em concentrações normalmente observadas após o parto de vacas leiteiras, pode inibir a proliferação de células hematopoiéticas a partir da medula óssea. Níveis elevados de BHBA podem resultar em contagens de neutrófilos baixas (Moretti et al., 2016).

## **8. Fator estimulador de colónias de granulócitos**

O fator estimulador de colónias de granulócitos (G-CSF) é um fator de crescimento hematopoiético endógeno que estimula a produção e diferenciação dos neutrófilos através das células progenitoras localizadas na medula óssea. O G-CSF é produzido por várias células, entre as quais macrófagos ativados, células endoteliais e fibroblastos, e atua por ligação a recetores de superfície celular específicos localizados nas células precursoras dos neutrófilos. A administração do fator estimulador de colónias de granulócitos é usado em Medicina Humana para aumentar o número de PMN em pacientes com cancro que sofrem quimioterapia mielossupressiva e apresentam leucopénia, de modo a melhorar a sua capacidade de combater infeções. A administração do fator estimulador de colónias de granulócitos a doentes com vírus da imunodeficiência humana reduz a incidência de infeções bacterianas e o número de dias passados no hospital (Kimura et al, 2014).

### **8.1 Fatores estimuladores de colónias de granulócitos recombinantes humanos**

Foram desenvolvidas moléculas análogas ao G-CSF humano através de engenharia genética, nomeadamente por tecnologia de ADN recombinante. O primeiro G-CSF recombinante humano (rhG-CSF) a aparecer foi o filgrastim, produzido através da inserção do seu gene em células de *E. coli*, seguindo-se-lhe o lenograstim. Estas moléculas apresentam eficácia *in vivo* equiparável, diferindo essencialmente na sua estabilidade. O filgrastim é instável à temperatura ambiente e a valores de pH fisiológicos, enquanto que o lenograstim é estável nestas condições. Ambos os compostos são eliminados por via renal, apresentando um tempo de semi-vida de 3-4 horas, pelo que a sua posologia requer várias administrações SID (Shah & Welsh, 2014).

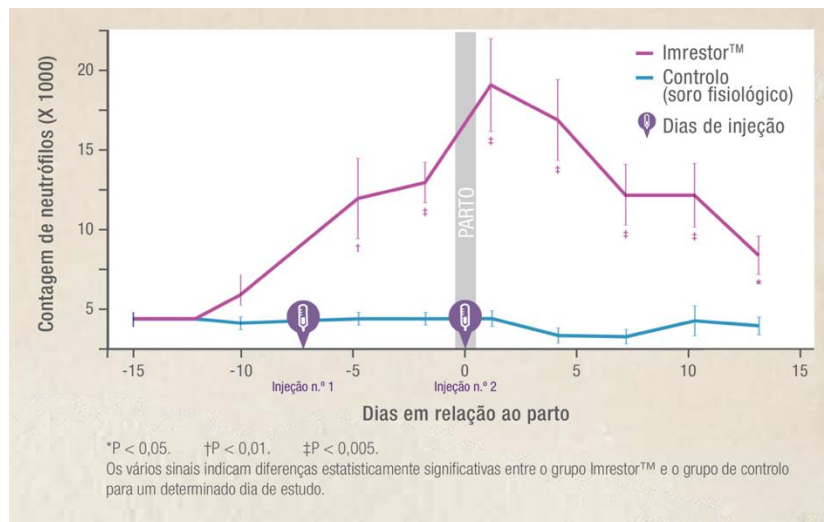
Com o objetivo de obter rhG-CSF de longa ação, foi desenvolvido o pegfilgrastim, nome comercial Neulasta®, que consiste em filgrastim seguido de conjugação com polietilenoglicol (PEG). Ao aumentar a sua massa molecular, verifica-se uma diminuição da sua excreção renal, sendo essencialmente eliminado por enzimas presentes nos neutrófilos. Desta forma, o tempo de semi-vida do pegfilgrastim aumenta para 15-80 horas, sendo assim apenas necessária uma dose (toma única), a qual é equivalente a múltiplas administrações SID de filgrastim ou lenograstim (Shah & Welsh, 2014; Guariglia et al., 2016).

De acordo com o Resumo das Características do Medicamento, recomenda-se uma dose de 6 mg (uma única seringa pré-cheia) de Neulasta®, via subcutânea, por cada ciclo de quimioterapia administrada pelo menos 24 horas após a quimioterapia citotóxica. Neulasta® é usado em doentes oncológicos para diminuir alguns dos efeitos adversos do seu tratamento. A quimioterapia leva à destruição dos leucócitos, o que pode causar neutropenia e, conseqüentemente, levar ao desenvolvimento de infeções. O pegfilgrastim é utilizado para reduzir a duração da neutropenia e a ocorrência de neutropenia febril. Os efeitos secundários mais frequentes com Neulasta® (observados em mais de 1 em 10 doentes) são dores musculares, cefaleias e náuseas. Neulasta® foi tão eficaz como o filgrastim na redução da duração da neutropenia grave. Os pacientes apresentaram neutropenia grave durante cerca de 1,7 dias no primeiro ciclo de quimioterapia, em comparação com cinco a sete dias, quando nenhum fator estimulador é administrado (European Medicines Agency, 2011).

## **8.2 Fator estimulador de colónias de granulócitos em bovinos**

Imrestor™ é uma citoquina imunomoduladora, desenvolvida pela Elanco Animal Health para vacas de leite e novilhas no periparto. A sua substância ativa é pegbovigrastim que é um fator estimulador de colónias de granulócitos bovinos *peguilados* (PEG bG-CSF). O bG-CSF tem atividade semelhante ao rhG-CSF, pois induz a produção de neutrófilos maduros a partir da medula óssea e estimula a sua atividade fagocítica e bactericida (Elanco Animal Health, 2016), foi desenvolvido através de engenharia genética com a inserção do seu gene em células de *E. coli* (Hassfurth et al., 2014). Restaura a atividade e aumenta o número de neutrófilos (Figura 3) durante o periparto, o que permite combater uma ampla gama de agentes patogénicos, incluindo bactérias gram-negativas e gram-positivas.

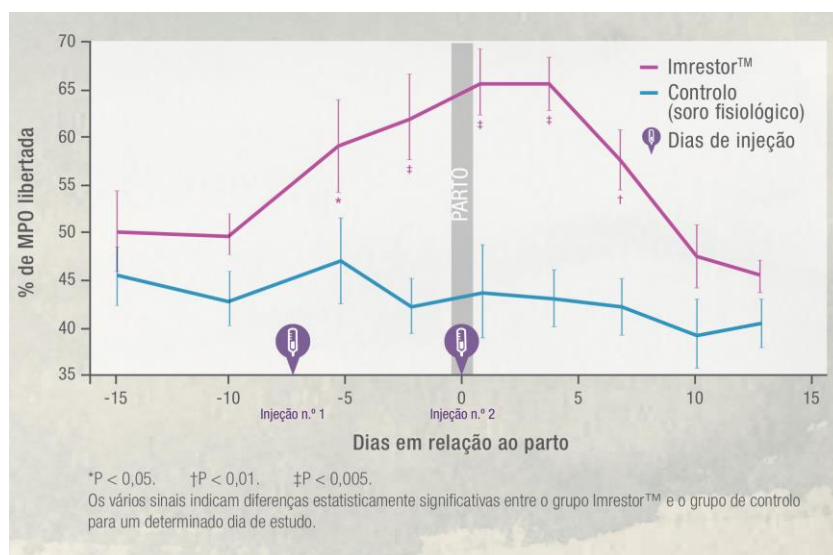
Figura 3 – Efeito do Imrestor™ na contagem de neutrófilos durante o periparto  
Imagem cedida por Elanco Animal Health Portugal



Este imunomodulador melhora a atividade dos neutrófilos ao permitir a libertação de até 50% mais de mieloperoxidase (MPO) pelos neutrófilos. A MPO desempenha um papel crucial na ação bactericida dos neutrófilos e a sua determinação é amplamente usada como método para medir a atividade dos neutrófilos (Elanco Animal Health, 2016). A mieloperoxidase é um componente principal dos grânulos primários especialmente em neutrófilos jovens. Está também presente, mas em concentrações mais baixas, em monócitos e macrófagos. É produzida em níveis elevados durante a inflamação e é conhecida por gerar ácido hipocloroso, uma espécie de oxigénio reativo prejudicial para as bactérias, que utiliza peróxido de hidrogénio e cloro (Prata et al., 2016). A MPO gera substâncias microbicidas, sendo assim importante para a capacidade bactericida de PMN (Kimura et al., 2014). A administração de PEG-bG-CSF no periparto cerca de 7 dias antes da data prevista do parto e dentro de 24 horas após o parto melhora a atividade da MPO, que se encontra diminuída durante o periparto (Hassfurther et al., 2014), conforme evidenciado na Figura 4. O aumento de MPO pela administração de PEG bG-CSF é promissora na função PMN e deve permitir uma melhor prevenção de doenças (Kimura et al., 2014).



Figura 4 – Efeito do Imrestor™ na percentagem de MPO libertada pelos neutrófilos  
Imagem cedida por Elanco Animal Health Portugal



O bG-CSF atua especificamente sobre as células precursoras dos neutrófilos, aumentando a sua produção. É formada por 175 aminoácidos e tem uma semi-vida muito curta (horas). Numa das fases da produção do pegbovigrastim, e tal como referido para o pegfilgrastim, o bG-CSF submete-se a um processo de peguilação, que consiste em adicionar por ligações covalentes um polímero hidrossolúvel, o polietilenoglicol (PEG), a um ponto específico da proteína bG-CSF. O PEG protege a proteína da degradação enzimática e reduz a velocidade de eliminação pelos rins, prolongando o tempo de semi-vida de horas a dias, conservando a sua atividade no organismo (Elanco Animal Health, 2016).

Os resultados dos ensaios clínicos realizados pela Elanco para obtenção de autorização na União Europeia revelaram que o Imrestor™ permite reduzir em 26% os casos de mastite clínica, comparando com os animais do grupo controlo, contribuindo para o bem-estar da vaca. Ao reduzir a incidência de mastite clínica, o Imrestor™ pode ajudar a reduzir o uso de antibióticos e a quantidade de leite descartado (Elanco Animal Health, 2016).

Esta citocina está indicada como adjuvante dentro de um programa de manejo do rebanho, de modo a reduzir o risco de mastite clínica em vacas e novilhas nos primeiros 30 dias após o parto. Este medicamento restaura a função do sistema imunitário durante o periparto, quando a vaca sofre imunossupressão. Todas as vacas podem receber o Imrestor™, visto que a imunossupressão pode afetar a totalidade das vacas leiteiras (Elanco Animal Health, 2016).

A administração do Imrestor™ consiste em duas injeções subcutâneas, sendo que a primeira injeção deve ser administrada 7 dias antes da data prevista do parto e a segunda injeção nas 24 horas posteriores ao parto. O intervalo entre as duas administrações não deve ser inferior a 3 dias ou superior a 17 dias. O intervalo de segurança para o leite ou para a carne é de zero dias. Podem ser consultadas mais informações acerca do medicamento

no Anexo 1 - Resumo das Características do Medicamento.

Um estudo realizado por Kimura et al. (2014) demonstrou que a injeção de PEG bG-CSF aumentou a contagem total de leucócitos em circulação, sendo significativamente devido ao número total de PMN, sobretudo os PMN maduros. O número destas células permaneceu alto até 13 dias após a última injeção. Concluiu, também, que os PMN exibiram uma percentagem maior de MPO, comparativamente ao grupo controlo. Segundo os mesmos autores, a administração desta citocina não teve efeitos negativos detetáveis na homeostase de cálcio, nem efeitos negativos detetáveis nos NEFA ou BHBA, sugerindo que não afetou o consumo de alimento.

Um outro estudo sobre o tema, realizado por Hassfurther et al. (2014), concluiu que os animais injetados com soro fisiológico apresentaram contagens absolutas de neutrófilos relativamente constantes ao longo do tempo. Em contraste, os animais aos quais foi administrado PEG-bG-CSF apresentaram aumentos acentuados na contagem absoluta de neutrófilos dentro de 24 horas após a sua administração. As contagens de neutrófilos permaneceram elevadas, em relação ao grupo controlo, 7 dias após a segunda dose de PEG- bG-CSF com uma dose de 10 e 20 µg/kg, mas não permaneceram elevadas com uma dose de 5 µg/kg. No estudo aqui relatado, os animais foram colocados em pavimento sujo e húmido, de modo a maximizar a incidência de mastites clínicas. Neste mesmo estudo, o grupo experimental apresentou, com doses de 10 ou 20 µg/kg, uma redução significativa na incidência de mastite clínica, em relação à incidência para o grupo controlo. Os bovinos tratados com PEG-bG-CSF a 5 µg/kg não tiveram uma redução significativa na incidência de mastite clínica. Concluíram também que as novilhas e as vacas múltiparas apresentaram uma resposta semelhante ao tratamento. Os resultados das análises microbiológicas indicaram que os casos de mastite clínica nesta população de estudo estavam associados com bactérias gram-positivas e gram-negativas. Os isolados mais comuns foram *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus* spp coagulase negativo e *E. coli*. Não existiram diferenças significativas na produção média diária de leite entre os grupos no estudo, nem efeitos significativos sobre as CCS ou a composição do leite. Hassfurther et al. (2014) verificaram que as contagens de neutrófilos absolutos na circulação periférica aumentaram durante pelo menos 14 dias após 2 injeções, administradas com uma semana de intervalo, de PEG-bG-CSF a 10 e 20 µg/kg. Contudo, a duração de cada mastite clínica não foi significativamente diferente entre os grupos. Seria de esperar que os neutrófilos preparados para uma atividade microbicida aumentada por exposição a PEG-bG-CSF na circulação deviam ser capazes de eliminar infeções antes que uma resposta inflamatória seja aparente. No entanto, uma vez que a resposta imunitária esteja sobrecarregada e surja uma resposta inflamatória aguda, a gravidade da resposta inflamatória e quantidade de tempo necessário para a resolução permanecem inalterados (Hassfurther et al., 2014). Estes autores verificaram que a administração da primeira dose

de PEG-bG-CSF antes do parto não teve efeito significativo sobre a duração da gestação ou percentagem de nascimentos. Estes dados sugerem que a manipulação do número e da função dos neutrófilos durante a gestação não teve efeitos negativos na capacidade de manter a gestação ou na viabilidade dos fetos.

Um estudo recente realizado por Ruiz et al. (2017) em 17 explorações no México, concluiu que a administração de Imrestor™ reduziu a incidência de mastites em 25% e reduziu a incidência de RP em 4,15%. Contudo, verificou que a incidência de metrites foi 17,1% maior para vacas tratadas com Imrestor™ em comparação com as vacas do grupo controlo, apesar da duração de tratamento de metrites ser inferior para o grupo experimental, comparativamente ao grupo controlo. Nos primeiros 30 dias em leite, a produção leiteira de vacas múltiparas com mastite que receberam Imrestor™ foi 2,1 kg/dia maior do que as vacas do grupo controlo. As vacas múltiparas que desenvolveram metrite dentro dos primeiros 21 dias após o parto e receberam Imrestor™ tiveram 2,3 kg/dia maior produção de leite, comparativamente às vacas do grupo controlo, nos primeiros 120 dias em leite. Neste estudo, o uso de Imrestor™ reduziu o número de dias que o leite foi descartado devido à presença de mastites de 7,6 a 7,2 dias, o que representa uma ordenha a menos a ser descartada devido ao tratamento com fármacos, ou uma contribuição para a redução do risco de presença de antibióticos no tanque de leite.

A regulação da resposta inflamatória no periparto é bastante complexa e não se correlaciona, necessariamente, com a presença de um agente patogénico (Ruiz et al., 2017). De modo a justificar o aumento da incidência de metrites, Ruiz et al. (2017) referem que com base no modo de ação de Imrestor™, o aumento de neutrófilos poderá levar mais animais a exibir inflamação clinicamente aparente (Ruiz et al., 2017). O aumento de neutrófilos que levam mais animais a exibirem respostas inflamatórias precoces não são, necessariamente, más para o animal (Ruiz et al., 2017).

## II PARTE - CASO DE ESTUDO

### 9. Objetivos

Estudar o efeito do tratamento de vacas leiteiras no periparto com Imrestor™ através da determinação:

- a) da relação entre a administração de Imrestor™ e o número de neutrófilos, linfócitos, macrófagos e células somáticas totais presentes no colostro;
- b) da incidência de mastites clínicas, metrites e retenção placentária em vacas nos 30 dias após o parto e comparação desses valores entre os grupos em estudo;
- c) da relação entre a administração de Imrestor™ e o valor Brix do colostro;
- d) da correlação entre a administração de Imrestor™ e a produção de leite nos primeiros 30 dias após o parto;
- e) da correlação entre a administração de Imrestor™ e a presença de cetose subclínica entre o 10º e o 20º dia após o parto.

### 10. Material e Métodos

#### 10.1. Descrição da Exploração

O estudo decorreu numa exploração intensiva de bovinos de leite, com cerca de 800 vacas em lactação, com três ordenhas diárias e cujo efetivo foi exclusivamente composto por vacas de raça Holstein Frísia, no período de 2 de janeiro de 2017 a 22 de março de 2017.

Nesta exploração, as vacas que apresentaram no período de secagem condição corporal maior ou igual a 4, segundo a escala de 1 a 5 da Elanco Animal Health 2009, ou quando existiu história de gestação gemelar ou quando o período de secagem foi superior a 80 dias foi administrado Kexxtone entre 22 e 28 dias antes do parto.

Por volta de um mês antes do parto, as vacas foram levadas até à maternidade, onde permaneceram até ao dia do parto.

Durante a realização do estudo não foi possível controlar, na amostra selecionada, quaisquer mudanças na ração e/ou administrações de medicamentos e vacinações.

#### 10.2. Amostra

Foram criados aleatoriamente dois grupos de estudo, grupo controlo (n=50) e grupo experimental com administração de Imrestor™ (n=52). Assim, foi criada uma lista com a identificação das vacas (número do brinco) que tinham partos previstos entre 9/01/2017 – 22/03/2017. Foi escrito em pequenos papéis o número de cada animal, tendo-se posteriormente feito a separação, aleatória, dos papéis.

Às vacas que tiveram três contagens seguidas de células somáticas inferiores a 200.000 células/ml foi feita secagem seletiva, ou seja, não foi administrado antibiótico intramamário no período de secagem. Estas vacas foram, antes do sorteio, divididas em igual número pelo grupo controlo e experimental.

Apesar do grupo experimental ser constituído por 52 vacas, apenas se efetuou a recolha de colostro em 48 destas vacas, uma vez que não se cumpriu o intervalo de tempo para a recolha da amostra de colostro, pelo que os resultados das contagens celulares no colostro do grupo experimental dizem respeito apenas a esta amostragem. Além disso, os animais do grupo experimental deveriam receber duas doses de pegbovigrastim, contudo 13 dos 52 animais receberam apenas uma dose, pelo que foram excluídos do estudo.

Tabela 1 – Animais do grupo experimental

Número de vacas no grupo experimental	
Número inicial	52
Apenas uma dose de pegbovigrastim	13 (excluídos do estudo)
Duas doses de pegbovigrastim	38
Três doses de pegbovigrastim	1
Recolha de colostro	48
Sem dados no colostro	4

Não foram incluídas novilhas devido à inexistência de cornadris na maternidade destas, impossibilitando a administração, em segurança, por via subcutânea de soro fisiológico ou Imrestor™.

### 10.3. Desenho Experimental

#### Grupo Experimental

- Administração de 2,7 ml de pegbovigrastim, via subcutânea, cerca de 7 dias antes da data prevista do parto. Administração de uma segunda dose, por via subcutânea, no espaço de 24 horas após o parto, exceto quando o espaçamento entre a 1ª dose e a 2ª dose foi inferior a 3 dias, neste caso não foi dada a 2ª dose. Caso tenham passado mais de 13 dias após a administração da 1ª dose e o parto, foi aplicada a 2ª dose, mesmo que o animal não tenha parido. Se o animal não pariu nos 3 dias seguintes, foi administrada uma 3ª dose no dia do parto.

Cada dose de Imrestor™ apresenta-se numa seringa de plástico pré-carregada de 3 ml, contendo pegbovigrastim (15 mg), hidrocloreto de arginina (94 mg), arginina (40 mg) e ácido cítrico monohidratado (17 mg).

- Recolha de uma amostra de colostro na 1ª ordenha após o parto (partos durante a noite – ordenha às 11h00 – 12h; partos durante o dia – ordenha às 18h30 – 19h com refrigeração do colostro; durante a ordenha que decorre entre as 22h00 – 4h00 não se ordenham vacas recém-paridas);
- Avaliação da qualidade do colostro através do refratómetro digital da Kruuse;
- Contagem das Células Somáticas Totais no colostro com o contador de células DCC da DeLaval;
- Colocação de uma gota de colostro numa lâmina, realização de um esfregaço e secagem para posterior observação ao microscópio, diferenciação e contagem celular, pela aluna, com uma ampliação de 400x, após a fixação com metanol durante 5 minutos e coloração com Giemsa durante 10 minutos, no laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa;
- Centrifugação da amostra de colostro, 1000 rpm durante 15 minutos, colocação de uma gota do sedimento numa lâmina e observação ao microscópio, pela aluna, com uma ampliação de 400x, após a fixação com metanol durante 5 minutos e coloração com Giemsa durante 10 minutos, no laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa;
- Medição dos corpos cetónicos no sangue entre o 10º e o 20º dia após o parto com tiras FreeStyle Optium β Ketones. Algumas medições ocorreram durante o período da manhã, enquanto outras ocorreram durante o período da tarde;
- Medição da produção de leite no 1º mês após o parto;
- Registo de ocorrência de doenças no pós-parto, nomeadamente mastite, metrite e retenção placentária.

### **Grupo Controlo**

- Administração de 2,7 ml de soro fisiológico, via subcutânea, cerca de 7 dias antes da data prevista para o parto;
- Recolhas e registos segundo o protocolo referido para o grupo experimental.

### **Motivos de exclusão do estudo**

- Não permanência na exploração durante todo o período de estudo (morte, refugo ou venda);
- Não cumprimento do intervalo de tempo para a recolha de amostra de colostro (1ª ordenha após o parto);
- Administração de apenas uma dose de Imrestor™.

#### **10.4. Recolha de dados**

Na construção da base de dados foram considerados: a data prevista do parto, a data do parto, o número de lactações, a produção leiteira nos primeiros 30 dias após o parto, a presença de mastites, retenção placentária, metrite ou outras doenças, a administração de Kexxtone e a idade da vaca. Os dados recolhidos foram retirados das bases de dados da exploração. Da base de dados ISA Leite foi retirada a informação relativa à presença de doenças, a contagem de células somáticas no leite foi retirada do contraste leiteiro, enquanto os restantes dados foram retirados de Delaval Alpro.

##### **10.4.1. Mastites Clínicas**

As mastites clínicas foram identificadas pela observação visual de jatos de leite anormal, pelos ordenhadores. Após a sua identificação, as vacas foram separadas e observadas pelo Médico Veterinário, o qual recolheu, aseticamente, uma amostra de leite anormal que foi submetida para cultura microbiana e instituiu a terapêutica adequada a cada caso.

O tratamento inicial consistiu na administração de 36 mL/dia de Penetamato iohidrato durante 4 dias. Caso a mastite não se resolvesse apenas com este tratamento foram administrados 33 mL/dia de Tilosina durante 3 dias. Casos de mastite além dos 30 dias após o parto não foram contabilizados.

##### **10.4.2. Metrites**

Entre os 4 e 10 dias pós-parto, foi feita a medição da temperatura rectal em todos os animais. Quando a temperatura foi superior a 39,5° C, por vezes acompanhado de corrimento fétido, foram tratados com uma administração de 36 mL de ácido tolfenâmico e com 15 mL/dia de ceftiofur durante 5 dias. Entre os 11 e 17 dias pós-parto, foi feita palpação rectal em todas as vacas para avaliação do estado de involução uterina e aspeto do corrimento vaginal, mesmo àquelas que demonstraram hipertermia anteriormente. O corrimento era extraído do trato genital por massagem vaginal à palpação rectal. Sempre que, no exame do útero, este fosse considerado como sobredimensionado e o corrimento vaginal se apresentasse com aspeto purulento e cheiro fétido a vaca era diagnosticada como estando a sofrer de metrite.

##### **10.4.3. Retenção Placentária**

A retenção placentária (RP) é geralmente reconhecida quando as membranas fetais ainda são visíveis na vulva da vaca 24 h após o parto. Os animais foram considerados como tendo RP se a placenta não era expelida dentro das 24 h após o parto. O tratamento consistiu na

administração de 15 mL/dia de ceftiofur durante 7 dias e uma injeção de 36 mL de ácido tolfenâmico.

### **10.5. Colheita das amostras**

As amostras de colostro foram obtidas por ordenha mecanizada após higienização dos tetos.

No caso de o parto ocorrer durante a noite, a vaca era ordenhada na ordenha das 11h30-12 horas e feita a análise do colostro no momento, sem ser necessário recorrer à sua refrigeração. Nos partos que ocorreram durante o dia, a ordenha ocorreu apenas entre as 18h30 e as 19h, sendo necessário recorrer à refrigeração a 4°C do colostro, de forma a preservar a sua qualidade e prevenir o rápido crescimento bacteriano. O mesmo se verificou com os partos que ocorreram durante os fins-de-semana do período de estudo. Não se procedeu à congelação do colostro, porque os leucócitos maternos são destruídos durante o processo de congelamento e descongelamento (Costa et al., 2017).

### **10.6. Protocolo experimental**

Após a sua colheita, as amostras foram homogeneizadas e foi feita a avaliação da sua qualidade utilizando um refratómetro digital da Kruuse. Antes de cada uso o refratómetro era calibrado com água destilada. Foram colocadas, para cada amostra, com uma pipeta descartável entre duas a quatro gotas de colostro no prisma e foi realizada e registada a leitura do valor Brix. Em seguida, foi feita a contagem de células somáticas no colostro com um contador de células DCC da DeLaval, com a ajuda de uma cassette que succionava uma pequena quantidade de colostro e se introduzia no DCC. O resultado era apresentado como x1000 células/ml de colostro após 45 segundos da inserção da cassette. Em 12 amostras de colostro, 8 amostras do grupo controlo e 4 amostras do grupo experimental, não foi possível obter um resultado por parte do contador devido a erro de fluxo.

Para cada amostra de colostro, foram ainda realizadas duas lâminas de esfregaço de colostro. Numa lâmina, após a sua identificação com lápis de carvão, foi colocada, com a ajuda de uma pipeta de Pasteur descartável, uma gota de colostro e feito de seguida um esfregaço segundo a técnica do esfregaço de sangue. Imediatamente após a realização do esfregaço, foi feita a fixação ao ar causando a desidratação celular. Na outra lâmina foi colocada uma gota do sedimento de colostro que foi obtido por centrifugação de 1 ml de colostro centrifugado a 1000 rpm durante 15 minutos numa centrífuga angular digital 2615/1 Nahita-Blue e realizado seguidamente o esfregaço. A fixação foi realizada de igual forma.

Após terminar o estágio na exploração, as 198 lâminas obtidas foram fixadas com metanol durante 5 minutos e coradas com Giemsa durante 10 minutos, no laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária, e foi, posteriormente, feita a sua



observação, contagem e diferenciação de neutrófilos, linfócitos e macrófagos com contagem direta ao microscópio ótico composto utilizando uma ampliação de 400x. Para a contagem diferencial foram analisadas 100 células. Quando a contagem celular não atingiu as 100 células, foi realizada uma regra de três simples. Não foram contadas células de morfologia duvidosa ou que apresentassem francos sinais de autólise. Para facilitar a contagem das células foi utilizado um contador de células – Counter Diff 15.

### **10.7 Análise estatística**

O registo dos dados foi feito recorrendo ao programa Microsoft Excel<sup>®</sup>. A análise estatística foi realizada pela Elanco Animal Health. Para uma análise coerente dos dados, estes foram agrupados em variáveis qualitativas dicotómicas para a administração de Imrestor<sup>TM</sup> (0=grupo controlo, 1=grupo experimental) e para cada doença do pós-parto relevante para o estudo (0=ausente, 1=presente).

Para a realização da análise estatística das variáveis discretas foram utilizados o teste de Fisher e o teste do qui-quadrado. A análise das variáveis contínuas foi realizada com o teste T-student e teste ANOVA. Foi considerado sempre um nível de significância estatística quando  $P \leq 0,05$  e um nível de tendência estatística quando  $P \leq 0,10$ , para um intervalo de confiança de 95%.

## **11. Resultados**

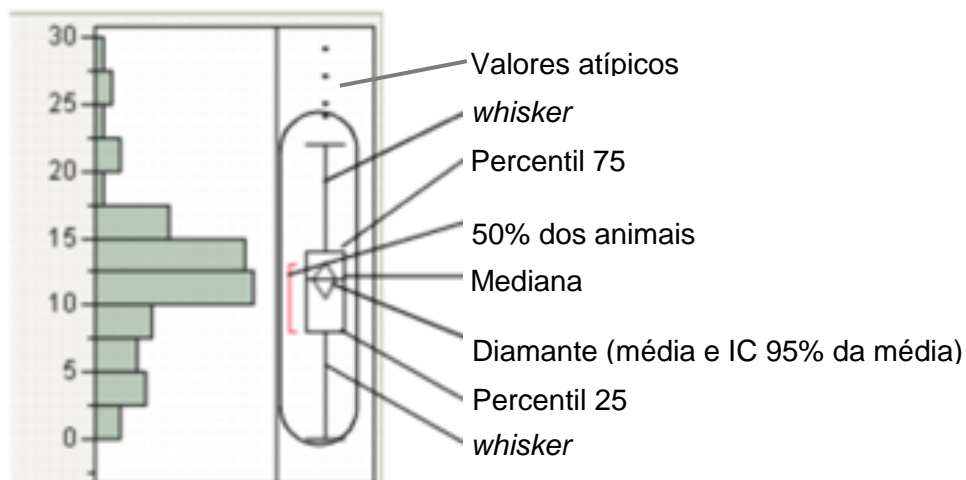
### **11.1 Animais excluídos do estudo**

Na totalidade foram acompanhadas 106 vacas adultas, no entanto quatro vacas morreram antes de atingirem os 30 dias em leite, pelo que foram eliminadas do estudo. Além disso, e como referido anteriormente, os animais que receberam apenas uma dose de Imrestor<sup>TM</sup> (n=13) foram eliminados do estudo, por se considerar que não completaram o tratamento.

De referir que existiu uma vaca, à qual foram administradas três doses de Imrestor<sup>TM</sup>, que foi incluída no estudo. Assim, foram incluídos no estudo apenas 39 animais do grupo experimental.

Não foram excluídos animais do grupo controlo.

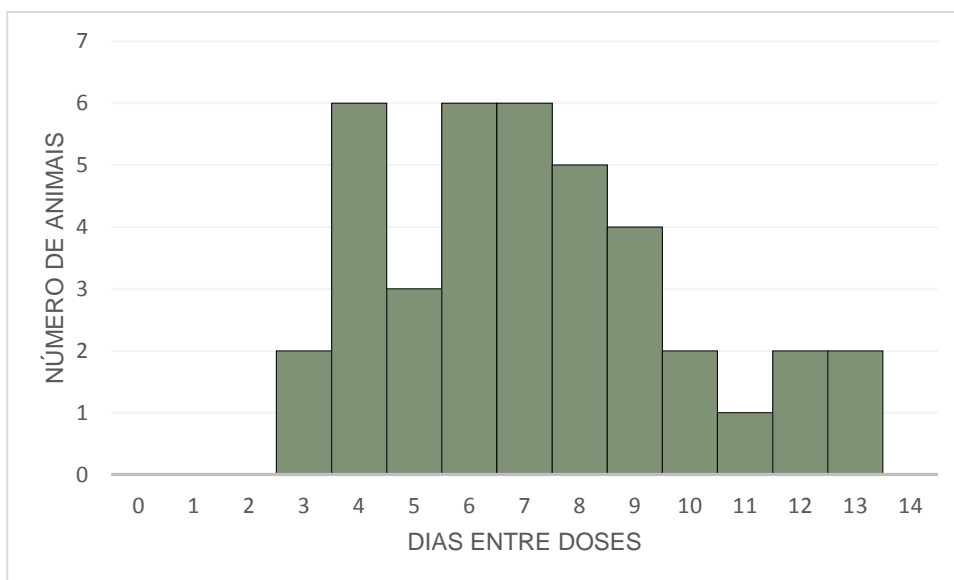
## 11.2 Interpretação de Box-Plot



## 11.3 Intervalo de dias entre as doses de Imrestor™

O Gráfico 1 mostra o intervalo de tempo, em dias, entre a administração das doses de Imrestor™. A maioria dos animais do grupo experimental que receberam as duas doses, fizeram-no no intervalo de dias que recomenda o protocolo. As vacas receberam a primeira dose entre os 3 e os 13 dias antes do parto (média  $\pm$  SE: 6,18  $\pm$  2,71).

Gráfico 1 – Intervalo de dias entre as doses de Imrestor™



### 11.4 Número de lactações

A distribuição dos animais segundo o número de lactações foi semelhante entre o grupo controlo (Gráfico 2) e o grupo experimental (Gráfico 3).

Gráfico 2 – Distribuição do número de lactações do grupo controlo

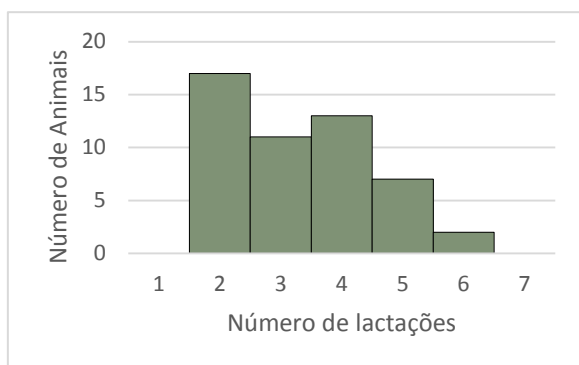
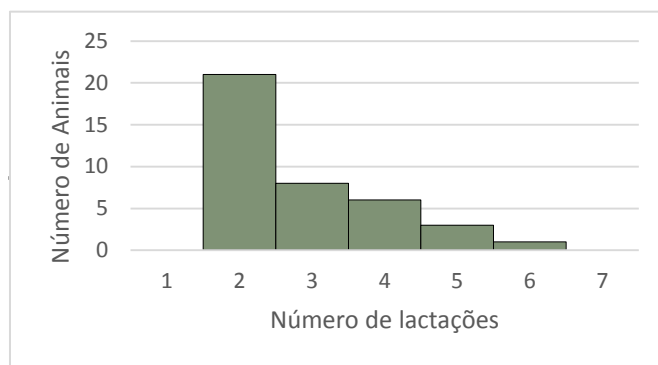


Gráfico 3 – Distribuição do número de lactações do grupo experimental

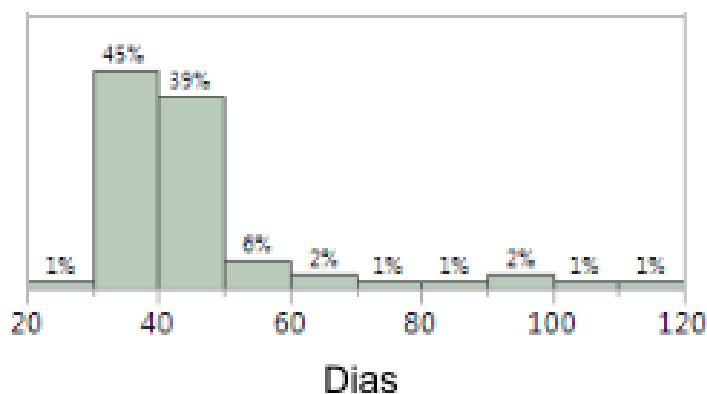


### 1.5 Duração do período de secagem

A duração do período de secagem nas vacas dos dois grupos em estudo é considerada curta, visto que, e de acordo com o Gráfico 4, 75% dos animais tiveram um período de secagem inferior a 43 dias, sendo que 45% dos animais apresentou um período de secagem inferior a 40 dias (média  $\pm$  SE:  $43,8 \pm 15,3$ ).

A percentagem de animais com secagem seletiva (sem uso de antibiótico no momento de secagem) foi de 55%.

Gráfico 4 – Duração do período de secagem nas vacas em estudo



## 11.6 Efeito na qualidade do colostro

O colostro de vacas do grupo experimental teve um número de células somáticas totais significativamente superior ao das vacas do grupo controlo ( $p=0,0295$ ). A média de CCS no grupo controlo foi de 420 mil células/ml, enquanto a média de CCS no colostro do grupo experimental foi 700 mil células/ml. Verificou-se que o colostro de vacas do grupo experimental teve uma média de 300 mil células/ml superior ao colostro do grupo controlo.

O número de células somáticas presentes no colostro, também variou de acordo com o número de lactações. Assim, o número de células somáticas no colostro aumentou com o número de lactações, exceto nas vacas com cinco lactações, como é possível constatar na Tabela 2.

Tabela 2 – Relação entre o número de lactações e a média de CCS presentes no colostro

Nº Lactações	Média	Erro Padrão da Média
2	409,82	104,15434
3	569,47	143,46908
4	851,00	163,94188
5	436,37	221,95477
6	1183,00	605,66376

Na análise diferencial dos leucócitos presentes no colostro, apenas se consideraram as lâminas com contagens de 100 células.

Não se observaram diferenças significativas entre os dois grupos, relativamente ao número de neutrófilos (Gráficos 5 e 6) e macrófagos (Gráficos 7 e 8) nos esfregaços de colostro centrifugado e não centrifugado. Contudo, os valores máximos de neutrófilos e macrófagos, foram superiores no colostro centrifugado e não centrifugado de vacas do grupo experimental.

Gráfico 5 – Relação entre o número de neutrófilos de colostro não centrifugado e o grupo controlo (0) e grupo experimental (1)

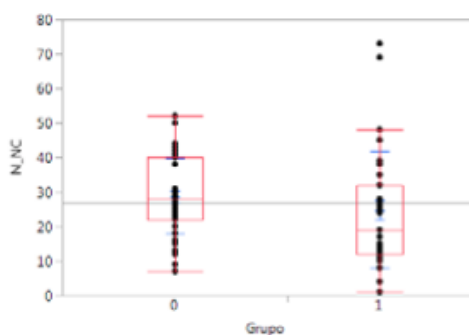


Gráfico 6 – Relação entre o número de neutrófilos de colostro centrifugado e o grupo controlo (0) e grupo experimental (1)

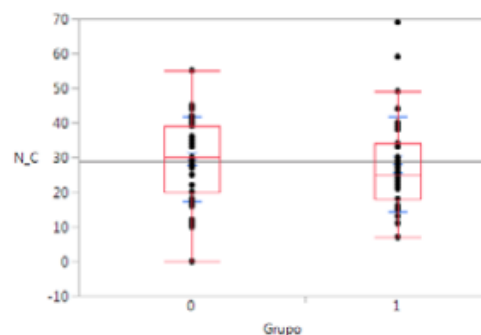


Gráfico 7 – Relação entre o número de macrófagos de colostro não centrifugado e o grupo controlo (0) e grupo experimental (1)

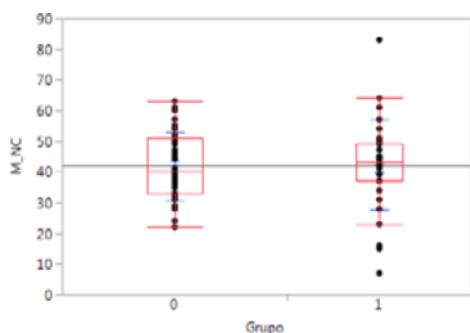
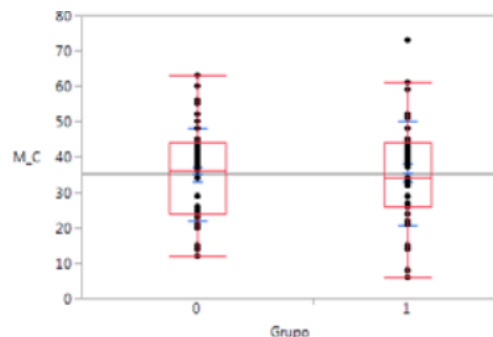


Gráfico 8 – Relação entre o número de macrófagos de colostro centrifugado e o grupo controlo (0) e grupo experimental (1)



Relativamente ao número de linfócitos, verificou-se que o colostro não centrifugado das vacas do grupo experimental apresentou um número de linfócitos tendencialmente superior, comparando com o grupo controlo ( $p=0,08$ ). O número de linfócitos de colostro centrifugado não obteve diferenças significativas entre o grupo controlo e o grupo experimental.

Os macrófagos foram a célula predominante no colostro pré-centrifugado no grupo controlo (52%) e grupo experimental (67%). Nos esfregaços de colostro centrifugado, os linfócitos e os macrófagos foram, em igual quantidade, as células predominantes no grupo controlo (74%) e no grupo experimental (80%).

### 11.7 Incidência de mastites, metrites e retenção placentária

A Tabela 3 resume a análise estatística da incidência de mastites, metrites e retenção placentária nas vacas do grupo controlo e grupo experimental. Apesar de não existirem diferenças significativas, o grupo controlo apresentou maior incidência de mastites (4,00%, 50 vacas), comparativamente ao grupo experimental (0%, 39 vacas).

A incidência de metrites foi maior no grupo controlo (20,00%) em relação ao grupo experimental (10,26%), no entanto estes valores não foram estatisticamente diferentes.

Relativamente à incidência de retenção placentária, verificou-se que o grupo controlo apresentou maior incidência (6,00%), do que o grupo experimental (2,56%), contudo estes valores também não foram estatisticamente diferentes.

Tabela 3 – Resumo da análise estatística referente à incidência de Mastites (MAS), Metrites (MET) e Retenção Placentária (RP)

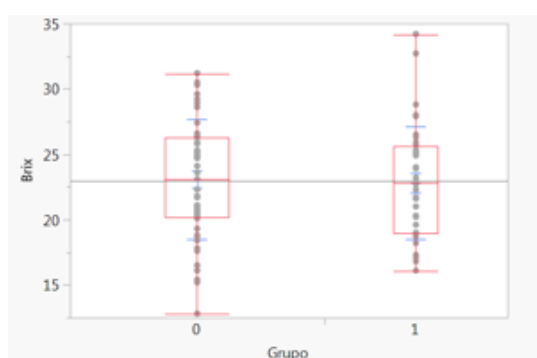
Doença	Incidência		P-value
	%		
	Controlo	Experimental	Fisher's test
MAS	4,00	0,00	0,5020
MET	20,00	10,26	0,2521
RP	6,00	2,56	0,6282

Além dos resultados acima descritos, verificou-se que a percentagem de animais que desenvolveu alguma doença (mastite e/ou metrite e/ou retenção placentária) no pós-parto foi tendencialmente significativa, visto que a incidência de animais afetados foi inferior no grupo experimental, comparando com o grupo controlo (13% vs. 26%  $p=0.1$ ). Através do modelo de regressão logística, obteve-se um valor de odds ratio de 2,75, concluindo-se que a probabilidade de as vacas desenvolverem alguma destas doenças após o parto sem a administração de Imrestor™ é 2,75 vezes maior.

### 11.8 Valor Brix

O valor Brix obtido com o refratómetro digital foi semelhante entre os dois grupos em estudo (Gráfico 9). A média do valor Brix no grupo controlo foi 23,1% e no grupo experimental 22,8%.

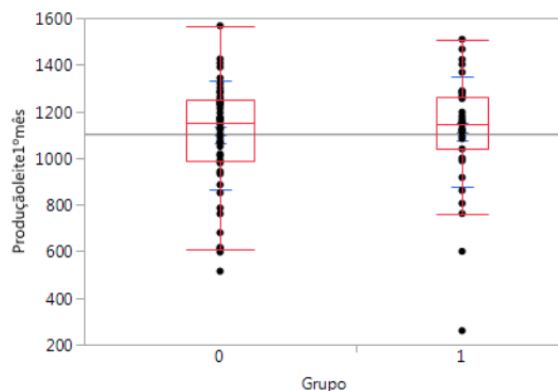
Gráfico 9 – Relação entre o valor Brix e o grupo controlo (0) e o grupo experimental (1)



### 11.9 Produção leiteira no primeiro mês após o parto

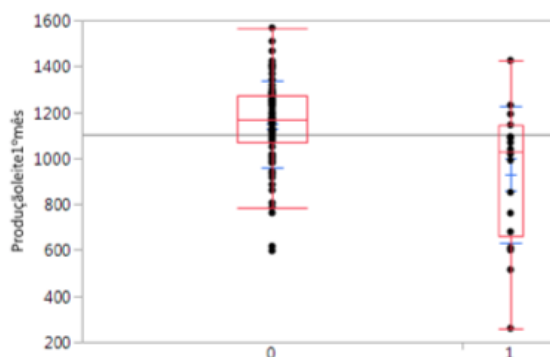
Não se observaram diferenças significativas entre o grupo controlo e experimental na produção leiteira acumulada no primeiro mês após o parto. A média de produção de leite para o grupo controlo foi de 1099 litros e para o grupo experimental 1111 litros (Gráfico 10).

Gráfico 10 – Produção de leite acumulada no primeiro mês após o parto no grupo controlo (0) e grupo experimental (1)



No entanto, a produção acumulada de leite no primeiro mês de lactação em vacas que desenvolveram alguma doença no pós-parto (mastite e/ou metrite e/ou retenção placentária), foi estatisticamente diferente ( $p=0,0037$ ), visto que estes animais produziram, em média, menos 120 litros de leite, comparativamente aos animais que não apresentaram alguma destas doenças (Gráfico 11).

Gráfico 11 – Produção acumulada de leite no primeiro mês de lactação em vacas que não desenvolveram, MAS ou MET ou RP (0) e em vacas que desenvolveram (1)

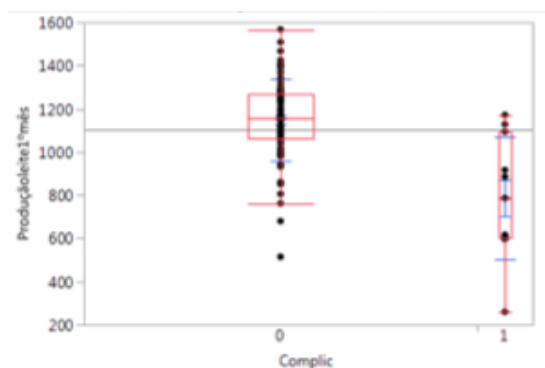


As vacas que desenvolveram alguma complicação no pós-parto (Tabela 4), como DAE, acidose, septicémia, indigestão ruminal, hipocalcémia, tiveram uma produção leiteira nos primeiros 30 dias estatisticamente diferente ( $p=0,0008$ ), relativamente às vacas que não desenvolveram estas complicações. Verificou-se que vacas com estas complicações produziram em média menos 300 litros (Gráfico 12).

Tabela 4 – Número de animais com complicações no grupo controlo e grupo experimental

	Grupo Controlo	Grupo Experimental
DAE	4	1
Acidose	1	0
Septicémia	1	0
Indigestão ruminal	1	0
Hipocalcémia	2	1

Gráfico 12 – Produção acumulada de leite em vacas sem complicações pós-parto (0) ou com complicações (1)



De referir, que as vacas que pariram no mês de março tiveram uma produção significativamente maior ( $p=0,0274$ ) do que as vacas que pariram no mês de janeiro (mais 150 litros em média de produção acumulada no primeiro mês de lactação).

### 11.10 Células somáticas no leite

A contagem de células somáticas no leite no primeiro mês após o parto não foi estatisticamente diferente entre os grupos em estudo. A média de CCS no leite do grupo controlo foi 344.660 células/ml e no grupo experimental foi 321.231 células/ml.

A percentagem de vacas com contagens de células somáticas elevadas (>200.000 células/ml), no primeiro controlo pós-parto, apesar de não ser significativo, foi 10 pontos mais baixo no grupo experimental (28% vs. 38%). Existiu uma maior percentagem de vacas com CCS elevadas no primeiro controlo, em vacas que se secaram com contagens maiores que 200.000 células/ml ( $p=0,0316$ ).

### 11.11 Vacas com cetose subclínica

A percentagem de vacas com hipercetonémia (concentração de BHBA >1,2 mmol) foi 5,3% no grupo experimental e 8,2% no grupo controlo.

## 12. Discussão

O periparto é o período mais crítico para a saúde e para a performance futura da vaca leiteira, independentemente da exploração. Neste estudo foi administrado a vacas no periparto o produto injetável Imrestor<sup>TM</sup> de forma a perceber qual o impacto do tratamento na incidência de mastites, metrites e retenção placentária no pós-parto e estudar o seu efeito na qualidade do colostro.



A primeira dose de Imrestor™ deve ser administrada sete dias antes da data prevista do parto. Neste estudo, a maioria dos animais receberam a primeira dose no período recomendado pelo protocolo. Contudo, existiram 13 vacas, o que corresponde a 24,5% dos animais, aos quais foi administrada apenas uma dose, devido ao facto, e segundo o protocolo do Imrestor™, do parto ter ocorrido nos dois dias seguintes à primeira injeção. Estes animais foram excluídos do estudo, pois não se pode considerar que concluíram o tratamento. Segundo a análise estatística dos dados obtidos, as vacas que receberam apenas uma dose não tiveram uma menor incidência de doenças, visto que das 13 vacas, duas tiveram mastite (15,35%) e quatro desenvolveram metrite (30,77%). Pelo que se conclui que a administração de apenas uma dose poderá não ser eficaz na redução da incidência destas doenças.

A incidência de mastites, metrites e retenção placentária foi inferior no grupo experimental, comparativamente ao grupo controlo, contudo e contrariamente a estudos já publicados (Elanco Animal Health, 2016; Hassfurther et al., 2014; Ruiz et al., 2017), esta redução não foi estatisticamente significativa. Estes resultados poderão estar relacionados com o reduzido número de animais usados no presente estudo e com as boas práticas de manejo verificadas na exploração onde o estudo decorreu. No entanto, se as três doenças avaliadas forem consideradas em conjunto, verifica-se uma tendência para uma menor incidência de doenças no grupo de animais tratados com Imrestor™. Concluiu-se que a probabilidade de as vacas desenvolverem alguma destas doenças após o parto sem a administração de Imrestor™ é 2,75 vezes maior, o que vai de encontro ao esperado. Embora exista uma relação entre o desenvolvimento de RP e metrite, apenas duas vacas do grupo controlo desenvolveram as duas doenças.

Do ponto de vista económico, os produtores não devem ser confrontados apenas com o custo do tratamento de determinada doença, mas também com as suas consequências a longo prazo (Mulligan et al., 2006). Verificou-se que a produção acumulada de leite no primeiro mês de lactação em vacas que desenvolveram alguma doença no pós-parto (mastite e/ou metrite e/ou retenção placentária), foi estatisticamente diferente ( $p=0,0037$ ), visto que estes animais produziram, em média, menos 120 litros de leite. Se considerarmos o preço do leite a trinta cêntimos por litro, o produtor terá perdido, com uma vaca que tenha desenvolvido uma ou mais destas doenças, 36€ ( $0,30€ \times 120L$ ) mais os custos com o tratamento, custos de mão-de-obra acrescidos e custos a longo prazo, como a diminuição da fertilidade (atraso no retorno ao estro, maior intervalo entre partos, aumento do número de inseminações por concepção, diminuição na taxa de concepção) e, eventualmente, custos com o refugo prematuro ou morte. Nos estudos clínicos de segurança para o registo de Imrestor™ nos EUA, verificou-se que aos 80 dias de lactação, um número significativamente maior de vacas no grupo experimental apresentou sinais de cio, em comparação com o grupo controlo. Além dos custos mensuráveis, o stress do produtor, a frustração associada

ao tratamento das vacas doentes, a ansiedade com a perda de animais valiosos e a redução do bem-estar dos animais revelam também elevada importância (Elanco Animal Health, 2016). Pode-se então concluir que é mais rentável manter uma função imunitária normal, do que tratar problemas de saúde.

As vacas que desenvolveram alguma complicação no pós-parto, como deslocamento do abomaso, também tiveram uma produção leiteira nos primeiros 30 dias estatisticamente diferente ( $p=0,0008$ ), relativamente às vacas que não desenvolveram estas complicações. Verificou-se que vacas com estas complicações produziram em média menos 300 litros. A ocorrência de DA pode, entre outras causas, estar associada a mastites, metrites e RP, doenças que na sua maioria são acompanhadas por processos febris e inflamatórios. Nestes casos a alteração na motilidade abomasal pode ser provocada pelo efeito depressivo de endotoxinas e substâncias pirogênicas endógenas (Interleucina-1). As contrações retículo-ruminais são abolidas pela estimulação dos mediadores inflamatórios sobre o tônus do músculo gástrico liso, o que leva à inibição dos reflexos, e pelo efeito depressor direto sobre o núcleo central vagal (Gingerich & Murdick, 1975; Guard, 2002; McGuirk & Butler, 1980).

No presente estudo, existiu uma vaca, pertencente ao grupo controlo, que desenvolveu RP, metrite e DA.

A administração desta citoquina não apresentou diferenças significativas na produção de leite acumulada nos primeiros 30 dias pós-parto em vacas saudáveis. Este resultado também foi obtido num estudo realizado por Hassfurther et al. (2014), onde referem que para o desenvolvimento e manutenção de competência imunitária é necessária energia. É possível que a administração de Imrestor<sup>TM</sup> ao alterar o número e a função dos neutrófilos durante o periparto possa desviar essa energia da produção de leite em vacas saudáveis.

Outro aspeto observado foi que as vacas que pariram no mês de março produziram mais leite em comparação com as vacas que pariram nos meses de janeiro e fevereiro. Uma possível justificação passará pelo aumento dos carboidratos não-fibrosos na alimentação durante o mês de março, que conduziu a uma maior produção de leite. Outra possível explicação é que durante os meses de inverno, as baixas temperaturas, levam os animais a necessitar de mais energia de manutenção, e conseqüentemente uma redução na quantidade de leite produzido.

Relativamente às CCS do leite no primeiro controlo após o parto, verificou-se que as vacas que foram secas com contagens elevadas ( $>200.000$  células/ml) mantiveram CCS elevadas. Estas vacas eventualmente não terão curado uma infeção da lactação anterior, apesar da administração de antibiótico de secagem, o que pode ser justificado pelo curto período de secagem, pois 75% dos animais tiveram um período de secagem inferior a 43 dias. A duração do período de secagem deve variar entre os 45 e 60 dias, de modo a permitir a substituição de células epiteliais destruídas, antes do início da lactação seguinte. Além

disso, um período de secagem curto pode afetar negativamente a produtividade na lactação seguinte, visto que não favorece a formação de novo tecido secretor (Díaz & Melo, 2015).

A percentagem de vacas com contagens de células somáticas elevadas no leite, no primeiro controlo pós-parto, apesar de não ser significativo, foi mais baixo no grupo experimental. Este estudo focou-se em casos de mastites apenas durante os primeiros 30 dias após o parto. O efeito do uso de Imrestor™ na redução de casos de mastites após este período deve ser futuramente explorado.

A percentagem de animais com cetose subclínica foi reduzida nos dois grupos. Durante o período de estudo, apenas se identificou uma vaca com cetose clínica, pertencente ao grupo controlo. Num estudo realizado por Kimura et al. (2014), a administração de pegbovigrastim também não teve efeitos negativos detetáveis na concentração de BHBA, sugerindo que a administração de Imrestor™ não afeta negativamente a IMS.

O colostro de vacas que receberam as duas doses de Imrestor™ teve, com uma confiança de 97%, maior número de CCS. Verificou-se que o colostro de vacas do grupo experimental teve uma média de 300 mil células/ml superior ao colostro do grupo controlo. Este resultado não está de acordo com os resultados obtidos nos ensaios clínicos realizados pela Elanco Animal Health, visto que o Imrestor™, nos estudos de eficácia, não aumentou a contagem das células somáticas, não modificou o conteúdo em gordura, proteína, lactose e extrato seco do leite e não afetou a qualidade do colostro nem a incidência de doenças de tipo respiratório ou digestivo em vitelos. Contudo, é esperado que as vacas tratadas com Imrestor™ tenham maior número de neutrófilos na glândula mamária, pois, de acordo com o modo de ação desta citoquina, o aumento do número de PMN deve permitir que mais PMN se dirijam para um local precoce de infeção, como a glândula mamária, evitando a neutropenia (Kimura et al., 2014).

A média de células somáticas no colostro do grupo controlo foi de 420 mil células/ml, enquanto a média de células somáticas no colostro do grupo experimental foi 700 mil células/ml. Estes valores são inferiores ao esperado visto que, o colostro de um bovino pode conter uma contagem celular por mililitro, entre  $1 \times 10^6$  e  $2,5 \times 10^6$  (Novo et al., 2017). Uma possível explicação passa pelo facto de o contador de células somáticas usado não estar validado para leitura de colostro, tendo inclusive admitido um erro de fluxo em 12 amostras de colostro.

O número de células somáticas no colostro aumentou com o número de lactações, exceto nas vacas com cinco lactações, o que pode ser explicado pelo facto dos animais, com o aumento da idade, produzirem colostro de melhor qualidade por estarem expostos a mais agentes patogénicos e, conseqüentemente, produzirem mais células de defesa (Mendonça, 2011), como os linfócitos, que são transferidos aos vitelos através do colostro materno. Além disso, os animais mais velhos também têm uma estrutura glandular com mais ductos, e eventualmente mais alvéolos, logo com mais células epiteliais.

Contudo, se os animais mais velhos não estiverem expostos a mais agentes patogénicos, o colostro produzido não terá um elevado nível de anticorpos (Bovine Alliance on Management and Nutrition, 2001), que poderá ter sido o caso das vacas com cinco lactações.

De acordo com estudos anteriormente realizados (Hassfurth et al. 2014; Kimura et al. 2014), seria de esperar um aumento do número de neutrófilos no colostro de vacas tratadas com Imrestor™, contudo não se observaram diferenças significativas entre os dois grupos, relativamente ao número de neutrófilos e macrófagos nos esfregaços de colostro centrifugado e não centrifugado. Uma possível explicação passa pelo facto do colostro das vacas que pariram durante o dia e fins-de-semana, ter sido refrigerado a 4°C. Segundo Novo et al. (2017), a refrigeração do colostro a 4°C até seis horas não diminui a viabilidade celular. No caso das vacas referidas, como terão passado mais de seis horas até se efetuarem os esfregaços de colostro, poderá ter ocorrido lise celular, tornando difícil a sua identificação ao microscópio.

Relativamente ao número de linfócitos, verificou-se que o colostro não centrifugado das vacas do grupo experimental apresentou um número de linfócitos tendencialmente superior, comparando com o grupo controlo. Pode-se supor que os neutrófilos presentes na glândula mamária de vacas do grupo experimental, devido à administração de pegbovigrastim, podem ter ativado e recrutado linfócitos para o colostro destas vacas, pelo facto de serem uma importante fonte de citoquinas e quimiocinas que ativam e recrutam outras células do sistema imunitário (Rivera et al., 2016), justificando, desta forma, o aumento de linfócitos no colostro destas vacas.

Os macrófagos foram a célula predominante no colostro pré-centrifugado no grupo controlo e grupo experimental, o que vai de encontro ao estudo realizado por Costa et al. (2017), onde indica que 70% dos leucócitos presentes no colostro são macrófagos. No entanto, nos esfregaços de colostro centrifugado, os linfócitos e os macrófagos foram, em igual quantidade, as células predominantes. Deve-se ressaltar que uma das limitações encontradas pelo uso da técnica de citocentrifugação foi a dificuldade encontrada na diferenciação morfológica entre núcleos destacados do citoplasma de algumas células, principalmente de células epiteliais, e linfócitos, o que pode ter aumentando, aparentemente, o número de linfócitos do colostro centrifugado (Gomes et al., 2011).

Tendo em conta o modo de ação do pegbovigrastim, e de modo a evitar a destruição dos leucócitos maternos presentes no colostro, não se deveria proceder à congelação do mesmo, porque os leucócitos maternos são destruídos durante o processo de congelamento e descongelamento (Costa et al., 2017). Além disso, um estudo realizado por Costa et al. (2017) concluiu que existiu uma diferença significativa entre o colostro fresco e congelado, visto que a viabilidade celular no colostro fresco foi de  $24 \pm 8\%$  e no colostro congelado de 0%.

Neste estudo seria interessante estudar o efeito que o colostro de vacas tratadas com Imrestor™ teria na incidência de doenças em vitelos, contudo tal não foi possível visto que na exploração onde o estudo foi realizado, o colostro é pasteurizado e, geralmente, congelado para uso futuro. Ambos os processos (pasteurização e congelação) causam destruição celular, impedindo a transferência dos leucócitos maternos presentes no colostro ao vitelo.

O valor Brix foi semelhante entre os dois grupos em estudo, o que pode ser justificado pelo facto do uso de Imrestor™ estar relacionado com a imunidade inata e não com o desenvolvimento da imunidade adquirida.

### **13. Conclusão**

As vacas leiteiras apresentam uma elevada incidência de doenças durante o periparto. Estas doenças prejudicam diretamente a produção de leite, aumentam os custos de tratamento e poderão aumentar a mortalidade, assim como o risco de refugo. A elevada incidência de doenças durante este período deve-se, em parte, à redução da atividade dos neutrófilos, o que leva a imunossupressão.

Imrestor™ é a primeira citocina imunomoduladora para vacas leiteiras e novilhas no periparto. O seu uso está indicado na restauração da função imunitária, na redução da incidência de mastites clínicas no periparto e proteção do potencial da vaca e o seu bem-estar (Elanco Animal Health, 2016).

Neste estudo, a incidência de mastites, metrites e retenção placentária não foi estatisticamente diferente entre o grupo controlo e o grupo experimental, o que poderá ser explicado pela reduzida amostra do estudo e boas práticas de manejo realizadas pela exploração. Ainda assim, concluiu-se que com a administração de duas doses de Imrestor™, a probabilidade de as vacas desenvolverem alguma destas doenças após o parto foi 2,75 vezes menor.

Os animais que desenvolveram mastite e/ou metrite e/ou retenção placentária produziram em média menos 120 litros de leite durante os primeiros 30 dias de lactação, comparativamente aos animais que não apresentaram alguma destas doenças. Além disso, as vacas que apresentaram alguma complicação no pós-parto, nomeadamente deslocamento do abomaso, produziram em média menos 300 litros durante os primeiros 30 dias de lactação.

Relativamente à qualidade do colostro, verificou-se que o colostro de vacas do grupo experimental teve uma média de 300 mil células/ml superior ao colostro do grupo controlo. Apesar de não se terem observado diferenças significativas no número de neutrófilos e macrófagos nos esfregaços de colostro, os valores máximos destes leucócitos foram sempre superiores no colostro de vacas do grupo experimental. O número de linfócitos foi

tendencialmente superior no colostro não centrifugado das vacas tratadas com Imrestor™, comparando com o grupo controlo. Estes resultados sugerem que existe interesse em não congelar o colostro de vacas tratadas com Imrestor™, embora seja necessário comprovar o benefício clínico deste imunomodulador.

É de todo o interesse que futuramente se desenvolvam estudos idênticos com um maior número de animais, durante um maior período de tempo, de modo a obter conclusões mais consolidadas. Seria igualmente interessante estudar o efeito que o colostro de vacas tratadas com Imrestor™ teria na incidência de doenças em vitelos.

## 14. Bibliografia

- Almeida, J.P.G. (2015). *Avaliação da calcémia em vacas leiteiras no pós-parto após a administração de vitamina D*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa.
- Arede, M.C. (2013). *Comparação do manejo de vitelos recém nascidos em explorações leiteiras inglesas e americanas*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa.
- Bielmann, J. D. (2010). An evaluation of Brix refractometry instruments for the measurement of colostrum quality in dairy cattle. *J. Dairy Sci*, 93, 3713-3721.
- Bovine Alliance on Management and Nutrition (2001). A guide to colostrum and colostrum management for dairy calves. Acedido em Abr, 7, 2017, disponível em: [https://www.aphis.usda.gov/animal\\_health/nahms/dairy/downloads/bamn/BAMN01\\_Colostrum.pdf](https://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/bamn/BAMN01_Colostrum.pdf)
- Buczinski, S. & Vandeweerd, J. M. (2016). Diagnostic accuracy of refractometry for assessing bovine colostrum quality: A systematic review and meta-analysis. *J. Dairy Sci*, 9, 7381-7394.
- Chapman, J. D. & O'Connor, D. L. (2010). The immune system of ruminants. Acedido em Dez. 10, 2016, disponível em: <http://www.theomnigendifference.com/resource/immune-system-ruminants/>
- Costa, J. F. R., Novo, S. M. F., Baccili, C. C., Sobreira, N. M., Hurley, D. J. & Gomes, V. (2017). Innate immune response in neonate holstein heifer calves fed fresh or frozen colostrum. *Research in Veterinary Science*, 115, 54-60.
- Crawford, M. L., Quigley, J. D. & Martin, K. R. (1995). Immunoglobulin concentrations in serum in response to injectable immunoglobulin in neonatal dairy calves. *J. Dairy Sci*, 78, 1567-1572.
- Díaz, C. N. R. G. & Melo, L. M. E. (2015). Efecto de la duración del período seco sobre el comportamiento reproductivo pos parto en vacas lecheras. Acedido em Jun, 20, 2017, disponível em: <http://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/4579/1/CPA-2015-032.pdf>
- Doepel, L. & Bartier, A. (2014). Colostrum management and factors related to poor calf immunity. *WCDS Advances in Dairy Technology*, 26, 137-149.
- Elanco Animal Health (2009). The 5 – point body condition scoring system. Acedido em Abril. 25, 2017, disponível em: <https://www.elanco.us/pdfs/ai10752-body-condition-score-insert.pdf>
- Elanco Animal Health (2016). Imrestor. Acedido em Nov. 01, 2016, disponível em: <http://www.elanco.co.nz/products-services/dairy/imrestor.aspx>
- Elizondo-Salazar, J.A & Heinrichs, A.J. (2009). Feeding heat-treated colostrum to neonatal dairy heifers: effects on growth characteristics and blood parameters. *J. Dairy Sci*, 7, 3265-3273.
- European Medicines Agency (2011). Neulasta. Acedido em Dez. 27, 2016, disponível em: [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000420/human\\_med\\_000924.jsp&mid=WC0b01ac058001d124](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000420/human_med_000924.jsp&mid=WC0b01ac058001d124)

- Fox, L. (2013). Can milk somatic cells get too low? a question to be revisited. In National Mastitis Council Meeting Proceedings (pp. 55–63).
- Gelsing, S. L. & Heinrichs, A. J. (2017). Comparison of immune responses in calves fed heat-treated or unheated colostrum. *J. Dairy Sci*, 5, 1-12.
- Gingerich, D., & Murdick, P. (1975). Paradoxical aciduria in bovine metabolic alkalosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 166, 227-230.
- Godden, S. (2008). Colostrum management for dairy calves. *Vet Clin Food Anim*, 24, 19-39.
- Gomes, V., Madureira, K.M., Libera, A. M. M. P., Blagitz, M. G., Alves, M., Baptistella, F. & Benesi, F. J. (2011). Dinâmica da celularidade do colostro de vacas da raça Holandesa no pós-parto imediato. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 63, 1047-1053.
- Gratwick, W. (2015). Colostrum management in dairy herds. Acedido em Abr, 22, 2017, disponível em: <http://vet360.vetlink.co.za/colostrum-management-dairy-herds-2/>
- Guard, C. (2002). Abomasal displacement and Volvulus. In B.P. Smith, Large Animal Internal Medicine: Part five Disorders of the organ system, Chapter 30 Diseases of the Alimentary Tract. (third edition). (pp. 756-759). Missouri: Mosby.
- Guariglia, R., Martorelli, M.C., Lerose, R., Telesca, D., Milella, M.R. & Musto, P. (2016). Lipegfilgrastim in the management of chemotherapy-induced neutropenia of cancer patients, *Biologics: Targets and Therapy*, 10, 1-8.
- Guerrero, F. F., García, J. P. & Casalta, J. D. (2016). *Inmunología y enfermedades infecciosas en vacuno*. Zaragoza: Grupo Asís Biomedica S.L.
- Halleran, J., Sylvester, H & Foster, D. M. (2017). *Short communication*: Apparent efficiency of colostral immunoglobulin G absorption in holstein heifers. *J. Dairy Sci*, 4, 1-5.
- Hassfurth, R. L., TerHune, T.N. & Canning, P.C. (2014). Efficacy of polyethylene glycol–conjugated bovine granulocyte colony-stimulating factor for reducing the incidence of naturally occurring clinical mastitis in periparturient dairy cows and heifers. *AJVR*, 76, 231-238.
- Iwersen, M., Falkenberg, U., Voigtsberger, R., Forderung, D. & Heuwieser, W., (2009). Evaluation of an electronic cowside test to detect subclinical ketosis in dairy cows. *J. Dairy Sci*, 92, 2618-2624.
- Kalyan, D., Dang, A. K., Mukherjee, J. & Prasad, S. (2010). Studies on differential leukocyte counts in the colostrum of murrah buffalo. *Revista Veterinaria*, 21, 602-605.
- Karstrup, C. C., Klitgaards, K., Jensen, T. K., Agerholm, J. S. & Pedersen, H. G. (2017). Presence of bacteria in the endometrium and placentomes of pregnant cows. *Theriogenology*, 99, 41-47.
- Kimura, K., Goff, J. P., Kehrl, M. & Reinhardt, T. A. (2002). Decreased neutrophil function as a cause of retained placenta in dairy cattle. *J. Dairy Sci*, 85, 544-550.
- Kimura, K., Reinhardt, T. A. & Goff, J. P. (2006). Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle. *J. Dairy Sci*, 89, 2588-2595.



Kimura, K., Goff, J. P., Canning, P., Wang, C. & Roth, J. A. (2014). Effect of recombinant bovine granulocyte colony-stimulating factor covalently bound to polyethylene glycol injection on neutrophil number and function in periparturient dairy cows. *J Dairy Sci*, 97, 4842–4851.

Kuratomi, M. & Leadley, S. (2007). Chilling fast is cool for colostrum, not bacteria. *Hoard's Dairyman*, 826-827.

Larsen, T. & Nielsen, N. I. (2005). Fluorometric determination of  $\beta$ -hydroxybutyrate in milk and blood plasma. *J. Dairy Sci*, 88, 2004–2009.

Larson, B. L., Heary, H. L & Devery, J. E. (1979). Immunoglobulin production and transport by the mammary gland. *J. Dairy Sci*, 63, 665-671.

McGuirk, S. & Butler, D. (1980). Metabolic alkalosis with paradoxical aciduria in cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 177, 551-554.

Mendonça, K. M. (2011). Factors affecting passive transfer in neonatal calves. Acedido em Maio, 22, 2017, disponível em: <http://digitalcommons.calpoly.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1048&context=dscisp>

Mordak, R. & Anthony, S. P. (2015). Periparturient stress and immune suppression as a potential cause of retained placenta in highly productive dairy cows: examples of prevention. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 2015, 57-84.

Moretti, P., Probo, M., Cantoni, A., Paltrinieri, S. & Giordano, A. (2016). Fluctuation of neutrophil counts around parturition in holstein dairy cows with and without retained placenta. *Res in Vet Sci*, 107, 207-212.

Morin, D. E., Constable, P. D., Maunsell, F. P. & McCoy, G. C. (2001). Factors associated with colostral specific gravity in dairy cows. *J. Dairy Sci*, 84, 937-943.

Mulligan, F. J., O'Grady, L., Rice, D. A. & Doherty, M.L. (2006). A herd health approach to dairy cow nutrition and production diseases of the transition cow. *Animal Reproduction Science*, 96, 331-353.

National Mastitis Council. (1998). *Current Concepts of Bovine Mastitis* (4th ed.). Madison, USA.

Neal, S.M. (2013). *Adoptively transferred maternal colostral cells impact immune status and development in dairy calves*. Dissertação de Mestrado. Blacksburg: Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University.

Nonnecke, B. J., Kimura, K, Goff, J. P & Kehrli, M. E. (2003). Effects of the mammary gland on functional capacities of blood mononuclear leukocyte populations from periparturient cows. *J. Dairy Sci*, 86, 2359-2368.

Novo, S. M.F., Costa, J. F. R., Baccili, C. C., Sobreira, N. M., Silva, B. T., Oliveira, P.L., Hurley, D. J. & Gomes, V. (2017). Effect of maternal cells transferred with colostrum on the health of neonate calves. *Research in Veterinary Science*, 112, 97-104.

Oetzel, G. (2004). Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 20, 651–674.

- Prata, M. M. G., Havt, A., Bolick, D.T., Pinkerton, R., Lima, A.A.M & Guerrant, R.L. (2016). Comparisons between myeloperoxidase, lactoferrin, calprotectin and lipocalin-2, as fecal biomarkers of intestinal inflammation in malnourished children. *J Transl Sci*, 2, 134-139.
- Quigley, J. D. (1997). Raising replacement heifers from birth to weaning. Acedido em Jun, 18, 2017, disponível em: <http://www.wcds.ca/proc/1997/ch21-97.htm>
- Quigley, J. D. & Drewry, J. J. (1998). Nutrient and Immunity Transfer from Cow to Calf Pre- and Postcalving. *J. Dairy Sci*, 81, 2779-2790.
- Quigley, J. D., Lago, A., Chapman, C., Erickson, P., & Polo, J. (2013). Evaluation of the Brix refractometer to estimate immunoglobulin G concentration in bovine colostrum. *J. Dairy Sci*, 96(2), 1148–1155. doi:10.3168/jds.2012-5823.
- Reber, A. J., Lockwood, A., Hippen, A. R. & Hurley, D. J. (2005). Colostrum induced phenotypic and trafficking changes in maternal mononuclear cells in a peripheral blood leukocyte model for study of leukocyte transfer to the neonatal calf. *Vet Immunol*, 109, 139-150.
- Rivera, A., Siracusa, M. C., Yap, G. S. & Gause, W. C. (2016). Innate cell communication kick-starts pathogen-specific immunity. *Nat Immunol*, 17, 356-363.
- Ruiz, R., Tedeschi, L.O. & Sepúlveda, A. (2016). Investigation of the effect of pegbovigrastim on some periparturient immune disorders and performance in mexican dairy herds. *J. Dairy Sci*, 100, 1-13.
- Shah, J. & Welsh, S.J. (2014). The clinical use of granulocyte-colony stimulating factor, *British Journal of Hospital Medicine*, 75(2), 29-32.
- Sheldon, I.M. & Dobson, H. (2004). Postpartum uterine health in cattle. *Animal Reproduction Sci*, 82–83, 295-306.
- Sheldon, I. M., Cronin, J., Goetze, L., Donofrio G. & Schuberth H. J. (2009). Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biology of Reproduction*, 81(6), 1025-1032.
- Stott, G. H, Marx, D. B., Menefee, B. E. & Nightengale, G. T. (1979). Colostral immunoglobulin transfer in calves. *J. Dairy Sci*, 62, 1902-1907.
- Teng, T., Ji, A., Ji, X. & Li, Y. (2017). Neutrophils and immunity: from bactericidal action to being conquered. *Journal of Immunology Research*, 2017, 1-14.
- Voyvoda, H. & Erdogan, H. (2010). Use of a hand-held meter for detecting subclinical ketosis in dairy cows. *Res Vet Sci*, 89, 344-351.
- Williams, J. A. (2001). Intracellular signaling mechanisms activated by cholecystokinin-regulating synthesis and secretion of digestive enzymes in pancreatic acinar cells. *Annu Rev Physiol*. 2001;63:77-97.
- Younger, K. G. (2016). *The effects of prostaglandin F2α on reproductive performance in the postpartum dairy cow and the mechanism behind its benefits*. Dissertação de mestrado. Portland, Oregon State University.

## **Anexo 1 – Resumo das Características do Medicamento (Imrestor™)**

### **1. NOME DO MEDICAMENTO VETERINÁRIO**

Imrestor 15 mg solução injetável para bovinos

### **2. COMPOSIÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA**

Cada seringa pré-cheia de 2,7 ml contém:

#### **Substância ativa:**

Pegbovigrastim (fator estimulador de colónias de granulócitos bovinos peguilados [PEG bG-CSF]) 15 mg

Lista completa de excipientes, ver secção 6.1.

### **3. FORMA FARMACÉUTICA**

Solução injetável. Solução transparente, incolor a amarelo pálido.

### **4. INFORMAÇÕES CLÍNICAS**

#### **4.1 Espécies-alvo**

Bovinos (vacas leiteiras e novilhas).

#### **4.2 Indicações de utilização, especificando as espécies-alvo**

Como adjuvante num programa de manutenção de manadas, para reduzir o risco de mastite clínica nas vacas leiteiras periparturientes e novilhas durante os 30 dias subsequentes ao parto.

#### **4.3 Contra-indicações**

Não administrar em caso de hipersensibilidade à substância ativa ou a algum dos excipientes.

#### **4.4 Advertências especiais para cada espécie-alvo**

Num ensaio de campo realizado a nível europeu, a incidência de mastite clínica observada no grupo tratado foi de 9,1% (113/1235) e no grupo de controlo foi de 12,4% (152/1230), refletindo uma redução relativa de 26,0% ( $p=0,0094$ ) na incidência de mastite. A eficácia foi testada em conjunto com a prática de tratamento normal.

A mastite clínica é investigada como uma alteração no aspeto do leite ou do quarto ou de ambos.

Com base em todos os estudos em campo, a proporção de mastite evitada devido ao tratamento da manada com Imrestor (Fração evitada) foi de 0,25 (com um intervalo de confiança de 95% - 0,14 – 0,35).

O medicamento veterinário deverá ser administrado apenas se existir uma análise benefício:risco positiva a nível da manada realizada pelo médico veterinário responsável.

#### **4.5 Precauções especiais de utilização**

##### Precauções especiais para utilização em animais

Apenas para administração subcutânea.

Num estudo de segurança com vacas Jersey, a margem de segurança deste medicamento veterinário foi 1,5x a da dose mais alta recomendada (foi administrada uma sobredosagem de 60 µg/kg em três ocasiões) (ver também secção 4.10). Não exceder a dose indicada.

Como previsto a partir do modo de ação da substância ativa, os dados de segurança demonstram um aumento ligeiro e transitório das contagens de células somáticas individuais das vacas.

#### Precauções especiais a adotar pela pessoa que administra o medicamento veterinário aos animais

Em caso de autoinjeção acidental, podem ocorrer dores de cabeça, ósseas e musculares. Também podem ocorrer outros efeitos, incluindo náuseas, erupção cutânea e reações de hipersensibilidade (dificuldades respiratórias, hipotensão, urticária e angioedema). Dirija-se imediatamente a um médico e mostre-lhe o folheto informativo ou o rótulo.

As pessoas com hipersensibilidade conhecida a pegbovigrastim devem evitar o contacto com o medicamento veterinário.

Durante o manuseamento de seringas partidas ou danificadas, deve ser utilizado equipamento de proteção individual constituído por luvas. Remover as luvas e lavar as mãos e a pele exposta após a administração.

#### **4.6 Reações adversas (frequência e gravidade)**

Nos estudos clínicos, foram pouco frequentemente observadas reações anafilactóides não habituais. As vacas apresentaram inchaço das membranas mucosas (nomeadamente, na vulva e pálpebras), reações cutâneas, aumento da frequência respiratória e da salivação. Em casos raros, o animal pode colapsar. Estes sinais clínicos surgem normalmente entre 30 minutos e 2 horas após a primeira dose e resolvem-se no espaço de 2 horas. Pode ser necessário tratamento sintomático.

A administração subcutânea do medicamento veterinário pode induzir inchaço local transitório no local de injeção, bem como reações inflamatórias que se resolvem no espaço de 14 dias após o tratamento.

A frequência dos eventos adversos é definida utilizando a seguinte convenção: - Muito comum (mais de 1 em 10 animais apresentando reação(ões) adversa(s) no decurso de um tratamento) - Comum (mais de 1 mas menos de 10 animais em 100 animais) - Pouco frequentes (mais de 1 mas menos de 10 animais em 1.000 animais) - Raros (mais de 1 mas menos de 10 animais em 10.000 animais) - Muito rara (menos de 1 animal em 10.000 animais, incluindo relatos isolados).

#### **4.7 Utilização durante a gestação, a lactação ou a postura de ovos**

Pode ser administrado durante a gestação e lactação.

#### **4.8 Interações medicamentosas e outras formas de interação**

A administração concomitante de substâncias que alteram a função imunitária (por exemplo, medicamentos corticosteróides ou anti-inflamatórios não esteróides) pode reduzir a eficácia do medicamento veterinário. A administração concomitante destes medicamentos deverá ser evitada. Não existe informação disponível sobre a segurança e a eficácia deste medicamento veterinário imunológico quando administrado concomitantemente com vacinas.

#### **4.9 Posologia e via de administração**

Administração subcutânea.

O regime de tratamento consiste em duas seringas. O conteúdo de uma única seringa pré-

cheia deve ser administrado por via subcutânea a uma vaca leiteira/novilha 7 dias antes da data prevista do parto. O conteúdo de uma segunda seringa pré-cheia deve ser administrado por via subcutânea no espaço de 24 horas após o parto. Os intervalos entre as duas administrações não devem ser inferiores a 3 dias ou superiores a 17 dias.

Uma única seringa administra uma dose de 20-40 µg/kg de pegbovigrastim para a maioria das vacas dependendo do peso corporal: por exemplo, uma dose de 21 µg/kg de peso corporal para uma vaca de 700 kg ou 33 µg/kg de peso corporal para uma novilha de 450 kg.

A agitação excessiva da seringa poderá agregar o pegbovigrastim, reduzindo a sua atividade biológica. A solução deverá ser inspecionada visualmente antes de ser administrada. Apenas deverão ser administradas soluções transparentes sem partículas.

#### **4.10 Sobredosagem (sintomas, procedimentos de emergência, antídotos), se necessário**

Indícios de substâncias ativas semelhantes nos seres humanos sugerem que a administração acidental de uma dose superior à autorizada poderá resultar em reações adversas, que estão relacionadas com a atividade do pegbovigrastim.

O tratamento deverá ser sintomático. Não existe antídoto conhecido.

Num estudo de segurança com vacas *Jersey*, face a uma sobredosagem de 60 µg/kg administrada em três ocasiões (1,5x a dose mais alta recomendada), foram observadas úlceras.

#### **4.11 Intervalo(s) de segurança**

Carne e vísceras: zero dias. Leite: zero dias.

### **5. PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS**

Grupo farmacoterapêutico: Fatores estimuladores de colónias. Código ATCvet: QL03AA90

#### **5.1 Propriedades farmacodinâmicas**

Pegbovigrastim é uma forma modificada da citocina imunorreguladora de ocorrência natural, o fator estimulador de colónias de granulócitos bovinos (bG-CSF). O fator estimulador de colónias de granulócitos bovinos é uma proteína de ocorrência natural produzida por leucócitos mononucleares, células endoteliais e fibroblastos. Os fatores estimuladores de colónias regulam a produção e as atividades funcionais das células imunitárias. As atividades imunorreguladoras do fator estimulador de colónias de granulócitos dizem respeito particularmente às células da linhagem de granulócitos neutrofílicos que transportam recetores de superfície celular para a proteína. O medicamento veterinário aumenta o número de neutrófilos circulantes. Também foi demonstrado que melhora as capacidades microbicidas mediadas por halido de peróxido de hidrogénio mieloperoxidase dos neutrófilos. O bG-CSF apresenta funções adicionais para além da sua ação sobre os neutrófilos, podendo estas funções ser direta ou indiretamente exercidas sobre outras células/recetores e vias das citocinas. Não existe informação disponível relativamente a uma possível reação imunitária ao medicamento veterinário ou à molécula endógena (bG-CSF) após a administração repetida do medicamento veterinário em vacas.

#### **5.2 Propriedades farmacocinéticas**

Não existem informações disponíveis sobre a farmacocinética de pegbovigrastim em bovinos.

### **6. INFORMAÇÕES FARMACÊUTICAS**

#### **6.1 Lista de excipientes**

Ácido cítrico monohidratado. Hidrocloreto de arginina. Arginina. Água para injeções.

## **6.2 Incompatibilidades**

Não misturar com qualquer outro medicamento veterinário.

## **6.3 Prazo de validade**

Prazo de validade do medicamento veterinário tal como embalado para venda: 2 anos. Prazo de validade após a primeira abertura do acondicionamento primário: administrar imediatamente.

## **6.4. Precauções especiais de conservação**

Conservar no frigorífico (2°C – 8°C). Não congelar. Proteger da luz. Conservar na embalagem original. O medicamento veterinário pode ser conservado a 25 °C durante, no máximo, 24 horas.

## **6.5 Natureza e composição do acondicionamento primário**

2,7 ml de solução injetável numa seringa incolor de polipropileno pré-cheia com rolha de clorobutilo siliconizado e uma agulha de aço inoxidável com proteção.  
As seringas são embaladas em caixas de cartão da seguinte forma:  
10 seringas. 50 seringas. 100 seringas.  
É possível que não sejam comercializadas todas as apresentações.

## **6.6 Precauções especiais para a eliminação de medicamentos veterinários não utilizados ou de desperdícios derivados da utilização desses medicamentos**

O medicamento veterinário não utilizado ou os seus desperdícios devem ser eliminados de acordo com os requisitos nacionais.

## **7. TITULAR DA AUTORIZAÇÃO DE INTRODUÇÃO NO MERCADO**

Eli Lilly and Company Limited  
Elanco Animal Health  
Priestley Road  
Basingstoke  
Hampshire RG24 9NL  
Reino Unido

## **8.NÚMERO(S) DA AUTORIZAÇÃO DE INTRODUÇÃO NO MERCADO**

EU/2/15/193/001-003

## **9.DATA DA PRIMEIRA AUTORIZAÇÃO/RENOVAÇÃO DA AUTORIZAÇÃO**

Data da primeira autorização: 09/12/2015

## **10 DATA DA REVISÃO DO TEXTO**

Encontram-se disponíveis informações detalhadas sobre este medicamento veterinário no website da Agência Europeia de Medicamentos (<http://www.ema.europa.eu/>).