



UNIVERSIDADE DE LISBOA

**Faculdade de Medicina Veterinária**

MEDICINA DA PRODUÇÃO LEITEIRA: ESTUDOS DE RELAÇÃO ENTRE O  
DESEMPENHO REPRODUTIVO E AS MASTITES.

CECÍLIA ARCHER DE MENEZES CASTRO FRAGA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Miguel Luís Mendes Saraiva Lima

Doutor João Nestor das Chagas e Silva

Doutor Luís André de Oliveira Pinho

ORIENTADOR

Doutor Luís André de Oliveira Pinho

CO-ORIENTADOR

Doutor José Ricardo Dias Bexiga

2018

LISBOA

---





UNIVERSIDADE DE LISBOA

**Faculdade de Medicina Veterinária**

MEDICINA DA PRODUÇÃO LEITEIRA: ESTUDOS DE RELAÇÃO ENTRE O  
DESEMPENHO REPRODUTIVO E AS MASTITES

CECÍLIA ARCHER DE MENEZES CASTRO FRAGA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Miguel Luís Mendes Saraiva Lima

Doutor João Nestor das Chagas e Silva

Doutor Luís André de Oliveira Pinho

ORIENTADOR

Doutor Luís André de Oliveira Pinho

CO-ORIENTADOR

Doutor José Ricardo Dias Bexiga

2018

LISBOA

---



## **Agradecimentos**

Ao Professor Luís Pinho e ao Professor Ricardo Bexiga, pelo exemplo e apoio incondicional.

Ao Professor Doutor Júlio Carvalheira, pela ajuda na análise dos dados e por ter facilitado o acesso aos mesmos.

A toda a equipa da SVA, por me terem permitido contactar com a realidade da produção leiteira no norte de Portugal, e por me terem possibilitado o contacto com várias valências da medicina da produção leiteira. Agradeço tudo o que me ensinaram e o acolhimento com que me receberam.

A toda a equipa do CVTona, por me terem permitido contactar com a realidade da produção leiteira em Espanha, e por me terem alertado para uma nova perspetiva do papel do médico veterinário na produção. Agradeço tudo o que me ensinaram e o acolhimento com que me receberam.

À Doutora Adriana Siruana, pela ajuda que me deu ao longo da realização deste trabalho.

Aos “javalis”.

# **Medicina da produção leiteira: estudos de relação entre o desempenho reprodutivo e as mastites**

## **Resumo**

O impacto das mastites na eficiência reprodutiva dos bovinos leiteiros, tem sido estudado ao longo dos últimos anos, por diversos autores. O objetivo do presente estudo, foi analisar a possível associação causal entre a ocorrência de mastites subclínicas e a alteração do desempenho reprodutivo.

Recorrendo a uma base de dados de contraste leiteiro, na qual existiam registos provenientes de 9 explorações nacionais, introduzidos entre 1996 e 2016, procedeu-se à análise da relação da contagem de células somáticas, com o intervalo parto-conceção. Os resultados obtidos demonstraram que, à medida que aumenta a contagem de células somáticas, aumenta o intervalo parto-conceção. Tais resultados foram estatisticamente significativos e mais pronunciados para os dados relativos à segunda lactação. Observou-se ainda que, para cada aumento do número de eventos, cuja contagem de células somáticas se encontra acima do limiar de distinção entre infetado e saudável, o intervalo parto-conceção aumenta 28,7 dias para a primeira lactação e 27,9 dias para a segunda. Tais resultados, sugerem a hipótese de haver uma relação da cronicidade da infeção, com a fertilidade.

Assim, à semelhança do reportado por autores anteriores, os resultados obtidos apontam a existência de uma relação entre as mastites subclínicas e o desempenho reprodutivo dos bovinos leiteiros.

**Palavras-chave:** bovinos leiteiros; contagem de células somáticas; intervalo parto-conceção; mastites; desempenho reprodutivo.

# **Dairy Production Medicine: studies of the relationship between reproductive performance and mastitis**

## **Abstract**

The impact of mastitis on reproductive performance of dairy cattle has been studied throughout the last years, by several authors. The objective of this study was to evaluate the possible causal association between the occurrence of subclinical mastitis and altered reproductive performance.

Through the analysis of a database, in which there was access to milk recording data from 9 national dairy farms, introduced from 1996 to 2016, the relationship between the somatic cell count and the calving-to-conception interval was analyzed. The obtained results showed that, as the somatic cell count increases, the calving-to-conception interval increases. These results were statistically significant and more pronounced on the second lactation. Furthermore, it was observed that, with increases in the number of mastitis episodes, in which somatic cell counts were above the considered threshold between infected and healthy, the calving-to-conception interval progressively increased 28,7 days for the first lactation and 27,9 days for the second. These results support the existence of a relationship between the chronicity of the episodes and fertility.

As such, similarly to results presented by previous authors, this study supports the existence of a direct relationship between mastitis and the reproductive performance of dairy cattle.

**Key words:** calving-to-conception interval; dairy cattle; mastitis; reproductive performance; somatic cell count.

## Índice

I.	Estágio curricular.....	1
II.	Introdução.....	3
III.	Revisão bibliográfica.....	5
	1. Mastites.....	6
	2. Reprodução.....	8
	3. Influência das mastites no desempenho reprodutivo.....	11
	4. Fatores confundidores na relação mastites-fertilidade.....	27
IV.	Objetivos.....	31
V.	Materiais e métodos.....	32
VI.	Resultados.....	38
VII.	Discussão.....	45
VIII.	Conclusão.....	51
IX.	Bibliografia.....	52
X.	Anexos.....	60

## Lista de figuras

Figura 1. Evolução do estradiol ao longo do tempo em animais com mastites por <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> e grupo de controlo (Lavon et al., 2011b, adaptado). .....	24
Figura 2: Representação esquemática do protocolo ovsynch. ....	26
Figura 3: Dados reprodutivos, originais e calculados, por animal (exemplo). ....	33
Figura 4: Contraste leiteiro anterior à data de concepção (classe linear score A). ....	36
Figura 5: Contraste leiteiro anterior à data de concepção (classe linear score B). ....	36
Figura 6: Estudo do evento com a maior classe de linear score dos dias abertos (classe de linear score B) relativamente à classe de linear score anterior à concepção (classe de linear score A). ....	37
Figura 7. Distribuição dos animais da primeira lactação, por classe de linear score em cada um dos eventos analisados. ....	41
Figura 8. Distribuição dos animais da segunda lactação, por classe de linear score em cada um dos eventos analisados. ....	41
Figura 9. Distribuição dos animais analisados, por classe de linear score em cada um dos eventos analisados. ....	42
Figura 10. Evolução do intervalo parto-concepção para a primeira lactação, de acordo com o número de eventos cujo <i>linear score</i> é superior à classe 1. ....	43
Figura 11. Evolução do intervalo parto-concepção para a segunda lactação, de acordo com o número de eventos cujo <i>linear score</i> é superior à classe 1. ....	43

## Lista de tabelas

Tabela 1: Locais de estágio e respetivas áreas de intervenção. ....	1
Tabela 2: Indicadores reprodutivos alterados em animais com mastites. ....	11
Tabela 3: Número de animais por lactação, em cada uma das explorações estudadas. ....	33
Tabela 4: Média do primeiro e segundo intervalo parto-concepção, em cada exploração estudada. ..	34
Tabela 5: Relação entre <i>linear score</i> e contagem de células somáticas (DHI, n.d., adaptado). ....	35
Tabela 6: Agrupamento dos valores de linear score em classes. ....	35
Tabela 7: Média do linear score e classe de linear score, em cada exploração estudada. ....	35
Tabela 8: Dispersão do intervalo parto-concepção na primeira e segunda lactação. ....	38
Tabela 9: Impacto do linear score anterior à data de concepção e do maior linear score dos dias abertos, no intervalo parto-concepção, para a primeira lactação. ....	39
Tabela 10: Impacto do linear score imediatamente anterior à data de concepção e do maior linear score dos dias abertos, no intervalo parto-concepção, para a segunda lactação. ....	39
Tabela 11: Comparação dos resultados obtidos para a primeira e segunda lactação. ....	40
Tabela 12: Valores extremo e médio de eventos com classe de linear score superior a 1, por animal. ....	42
Tabela 13: Dispersão das variáveis relativas ao estudo de regressão linear. ....	44

## Lista de abreviaturas e siglas



AINES	Anti-inflamatório não esteroide
BEN	Balanco energético negativo
CCS	Contagem de células somáticas
COX	Cicloxigenase
EUA	Estados Unidos da América
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FSH	Hormona folículo estimulante
GDF-9	Fator de diferenciação e crescimento 9
GnRH	Hormona libertadora de gonadotropina
IA	Inseminação artificial
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL	Interleucina
IPC	Intervalo parto-concepção
LH	Hormona luteinizante
LS	<i>Linear score</i>
PVE	Período voluntário de espera
PGF2 $\alpha$	Prostaglandina F2 $\alpha$
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. uberis</i>	<i>Streptococcus uberis</i>
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
TLR	<i>Toll like receptor</i>



## I. Estágio curricular

O estágio curricular decorreu em dois locais distintos: Serviços Veterinários Associados, Lda, de 9 de novembro de 2016 a 31 de março de 2017; CVTONA *consultors* slp, de 8 de maio de 2017 a 8 de julho de 2017.

Tabela 1: Locais de estágio e respetivas áreas de intervenção.

Local de estágio	Áreas de intervenção
Serviços Veterinários Associados, Lda 	Clínica ambulatória Reprodução e fertilidade Qualidade de leite Gestão técnica Nutrição
CVTONA <i>consultors</i> , slp 	Consultoria Economia Nutrição Saneamento

O estudo realizado no âmbito da dissertação de mestrado, foi concretizado com o apoio da base de dados BOVINFOR 2016. Como complemento do projeto, foi apresentada uma comunicação livre na VI conferência anual do Conselho Português de Saúde do Úbere, com base nos resultados obtidos até à data. Paralelamente, foi realizado um poster para o concurso de posters de estudantes de medicina veterinária das XIX jornadas da Associação Portuguesa de Buiatria, tendo obtido a classificação de primeiro lugar (anexo 1).

### 1. Serviços Veterinários Associados, Lda

A autora acompanhou a equipa de médicos veterinários dos Serviços Veterinários Associados, Lda, empresa que presta apoio às explorações de bovinos leiteiros da região litoral norte de Portugal. A autora foi convidada a participar em todas as áreas de intervenção, tendo sido fomentado o seu espírito crítico e proatividade. Na clínica ambulatória, foram abordados casos clínicos, tendo-se assistido a consultas médicas, cirúrgicas e serviços obstétricos. Nesta área, a autora realizou exames físicos, prestou auxílio em alguns procedimentos cirúrgicos e discutiu diagnósticos diferenciais e métodos de tratamento com o médico veterinário presente. Na área da reprodução e fertilidade, foram realizados exames de avaliação uterina pós-parto, diagnósticos e acompanhamento da gestação e avaliação global do desempenho reprodutivo. A autora realizou exames reprodutivos, tendo explorado tanto a técnica manual como ecográfica. No final de cada exame, o estado reprodutivo do animal era

discutido com o médico veterinário. Na área da qualidade de leite, foram realizadas assistências a ordenhas, recolha e processamento de amostras para microbiologia e culturas microbiológicas. A autora acompanhou tanto as técnicas de laboratório, como as rotinas de ordenha e provas de estábulo. Na área da gestão técnica, pretendia-se aumentar a rentabilidade económica das explorações, analisando-se indicadores de *performance*, de modo a formar e programar o trabalho do produtor. Nesta área, a autora acompanhou a recolha e análise dos indicadores e as reuniões com os produtores, relativas à situação da exploração. Na área da nutrição, procedeu-se à recolha de amostras para análise e à implementação de medidas práticas que auxiliassem o manejo nutricional de cada vacaria.

## **2. CVTONA *consultors* slp**

O CVTONA *consultors* slp tem sede em Espanha, na comunidade autónoma da Catalunha, prestando serviços a explorações de bovinos leiteiros desta e de outras regiões de Espanha e também a nível internacional, inclusivamente em Portugal. A autora foi convidada a participar ativamente nos trabalhos realizados por esta equipa, tendo sido fomentado o seu espírito crítico e proatividade. Na área da consultoria, cada exploração recebe um acompanhamento que visa, como objetivo final, a sua rentabilidade económica, pretendendo-se reduzir os custos e aumentar os benefícios. Através da recolha de dados, cada exploração é caracterizada, identificando-se e quantificando-se problemas para os quais são propostas medidas corretivas, estabelecidas de acordo com as prioridades. A autora acompanhou a equipa nas visitas às explorações e reuniões com os produtores e respetivas equipas técnicas. Na área da economia, analisaram-se investimentos e modos de otimização dos custos de produção. Aqui, a autora acompanhou a realização de diversos trabalhos relativos à expansão de explorações, economia da reprodução, secagem seletiva, entre outros. No âmbito da nutrição, formularam-se rações e implementaram-se medidas de manejo alimentar, tendo a autora acompanhado todo o processo relativo à formulação. Na área de saneamento, realizaram-se visitas a explorações de bovinos de carne e de leite, tendo a autora integrado equipa de saneamento e acompanhado as visitas e a discussão dos resultados. Durante o período passado no CVTONA *consultors* slp, a autora acompanhou os médicos veterinários deste grupo, na ida a alguns congressos e conferências de medicina veterinária. A autora acompanhou ainda uma equipa de qualidade de leite, Q-LLET slp, na realização de um contraste leiteiro e visita a ordenhas.

## II. Introdução

A mastite é uma inflamação da glândula mamária (Fuenzalida, Fricke & Ruegg, 2015), sendo uma das doenças mais comuns da vaca leiteira adulta (Edmonson & Bramley, 2004). Ao longo dos últimos anos, vários autores têm estudado a relação entre as mastites e a eficiência reprodutiva (Lavon *et al.*, 2016). Vários fatores, tais como a idade do animal, o stress térmico, as doenças metabólicas e a imunossupressão do início da lactação, estão associados tanto a uma maior incidência de mastites como a uma menor fertilidade, o que complica o estudo desta relação (Ruegg, Fricke & Fuenzalida, 2015). No entanto, o impacto direto das mastites no desempenho reprodutivo foi estudado há mais de 25 anos por Moore, Cullor, Bondurant e Sischo (1991) e desde aí tem vindo a ser comprovado por diversos autores (Schrick *et al.*, 2001; Santos, Cerri, Ballou, Higginbotham & Hirk, 2004; Pinedo, Melendez, Villagomez-Cortes & Risco, 2009; Lavon, Ezra, Leitner & Wolfenson, 2011a; Fuenzalida *et al.*, 2015).

Ao longo dos últimos 40 anos, as explorações de bovinos leiteiros registaram um aumento da produtividade por animal (Oltenacu & Broom, 2010), sendo que nos Estados Unidos da América (EUA), entre 1950 e 2000, a produção anual de leite por animal aumentou de 2,4 toneladas para 8,2 toneladas (United States Department of Agriculture, 2002) e na União Europeia, entre 2001 e 2013, o incremento foi de 5,6 toneladas para 6,7 toneladas (Eurostat, 2013).

O aumento do potencial produtivo, tem sido acompanhado por uma diminuição da fertilidade (Dobson, Smith, Royal & Sheldon, 2007) e por uma maior incidência de mastites (Oltenacu & Broom, 2010). De Vries (2004) ao estudar a evolução do desempenho reprodutivo de 1980 a 2000 nos EUA, verificou que o intervalo entre partos aumentou de 13,2 meses para 14,4 meses, os dias à concepção aumentaram de 121 dias para 158 dias e a taxa de prenhez (*pregnancy rate*) diminuiu de 23% para 17%. Oltenacu e Broom (2010) também reportaram diminuições na taxa de prenhez nos EUA, Reino Unido e Suécia. O aumento da produção leiteira nos últimos 40 anos, tem-se acompanhado também de uma maior incidência de mastites, apesar da evolução alcançada ao nível da sua prevenção e terapêutica (Bradley, 2002).

Animais com mastites, sejam clínicas ou subclínicas, veem prejudicados alguns indicadores reprodutivos, tais como os dias abertos, dias à primeira inseminação artificial, número de serviços por concepção (Schrick *et al.*, 2001), probabilidade de prenhez à primeira inseminação artificial (Fuenzalida *et al.*, 2015), probabilidade de concepção (Lavon *et al.*, 2011a) e perdas de gestação (Santos *et al.*, 2004; Pinedo *et al.*, 2009).

O menor desempenho reprodutivo parece ter que ver com a existência de alterações em diferentes fases do ciclo reprodutivo dos animais com mastites, tais como o intervalo inter-éstrico (Moore *et al.*, 1991), o desenvolvimento folicular (Barker, Schrick, Lewis, Dowlen & Oliver, 1998; Lavon *et al.*, 2008), a maturação do oócito (Schrick *et al.*, 2001; Roth *et al.*, 2013; Roth *et al.*, 2015) e o desenvolvimento embrionário precoce (Schrick *et al.*, 2001).

A data do episódio de mastite relativamente à data de inseminação artificial, parece ser importante quando se estuda a influência que esta doença tem no desempenho reprodutivo dos bovinos leiteiros (Kumar *et al.*, 2017), pelo que o impacto das mastites na reprodução, é determinado pela sua localização temporal (Roth & Wolfenson, 2016). Ao longo dos últimos anos, têm sido estudados essencialmente três períodos de tempo: mastites anteriores à data de inseminação artificial, entre esta e o diagnóstico de gestação e após o mesmo. Os episódios localizados imediatamente antes e após a inseminação são aqueles que parecem ter um maior impacto na reprodução (Ruegg *et al.*, 2015).

As mastites, por si só, têm um importante impacto económico para os produtores de leite. Este, tem que ver com a menor produção e qualidade de leite, aumento do leite de desperdício, de gastos com serviços veterinários e maior probabilidade de refugo (DeGraves & Fetrow, 1993). O impacto das mastites na reprodução traz também consequências a nível económico. Quando uma vacaria tem uma eficiência reprodutiva baixa, diminui a produção, aumenta a média de dias em leite e a taxa de refugo por motivos reprodutivos (Risco & Melendez, 2011). Além, do mais, aumentam os gastos com sêmen e hormonas, serviços veterinários e o custo de reposição dos animais que não ficaram gestantes (LeBlanc, 2007). Deste modo, importa compreender a relação das mastites com a fertilidade, procurando estratégias que, seja pela prevenção das mastites, seja pela prevenção do baixo desempenho reprodutivo, diminuam este impacto.

O presente estudo resulta da análise de uma base de dados, através da qual se relaciona a contagem das células somáticas, com o intervalo parto-conceção. Deste modo, pretendeu-se estudar o impacto das mastites subclínicas no desempenho reprodutivo dos bovinos leiteiros. Inicialmente, será apresentada uma breve revisão da bibliografia publicada até à data. Seguir-se-á uma segunda parte, na qual será abordado o trabalho desenvolvido, os respetivos resultados e conclusões obtidas.

### III. Revisão bibliográfica

Ao longo dos últimos anos, as explorações de bovinos leiteiros, tanto na Europa como em Portugal, têm sido acompanhadas por um grande aumento na produtividade. No nosso país, nos últimos 30 anos, houve uma profissionalização do sector, alcançada através de melhorias ao nível da sanidade, alimentação e genética dos animais. Assim, foi possível a Portugal atingir padrões de produtividade semelhantes aos Europeus. De 1989 a 2013, desapareceram em Portugal 90.000 explorações, tendo havido uma redução do efetivo na ordem dos 140.000 animais. Não obstante, durante estes anos, a produção média de leite por vaca presente evoluiu de 3,9 toneladas/ano para 7 toneladas/ano (Instituto Nacional de Estatística, 2016), tendo alcançado as 8,2 toneladas em 2015 (Eurostat, 2016).

A constante seleção para uma maior produção de leite tem, no entanto, trazido outros problemas, nomeadamente ao nível do desempenho reprodutivo dos animais. O maior potencial produtivo das vacas leiteiras tem sido acompanhado por uma diminuição da fertilidade (Dobson *et al.*, 2007). A eficiência reprodutiva dos animais é influenciada por vários fatores, como por exemplo o clima e a saúde (Roth & Wolfenson, 2016). Deste modo, problemas tais como a retenção placentária, distocia, metrite, disfunção ovárica, problemas podais (Maizon, Oltenacu, Gröhn, Strawderman & Emanuelson, 2004) e mastites (Maizon *et al.*, 2004; Roth & Wolfenson, 2016), conduzem a um menor desempenho reprodutivo dos bovinos leiteiros. Estudos recentes, demonstram que os efeitos das mastites não se cingem apenas à saúde do úbere, tendo também impacto no aparelho reprodutivo, o que traz consequências para a fertilidade dos animais (Lavon *et al.*, 2011c). Assim, as mastites conduzem a uma alteração de indicadores reprodutivos, tais como o intervalo do parto à primeira inseminação artificial (IA), taxa de prenhez, dias abertos, mortalidade embrionária (Santos *et al.*, 2004) e taxa de conceção (Lavon *et al.*, 2011a). Ao diminuir o desempenho reprodutivo dos animais, vê-se também afetada a rentabilidade económica de uma exploração, já que esta está diretamente relacionada com a produtividade dos animais. Assim, ao terem impacto na fertilidade, as mastites influem direta e indiretamente na estabilidade financeira de uma vacaria.

De seguida, serão revistos alguns temas de interesse para a análise do impacto das mastites no desempenho reprodutivo dos bovinos leiteiros: as mastites; reprodução e fisiologia reprodutiva; relação das mastites com a fertilidade; fatores confundidores no estudo desta relação.

## 1. Mastites

As mastites (*mastos*, glândula mamária; *itis*, inflamação) são uma inflamação da glândula mamária. Na maioria dos casos têm etiologia infecciosa, sendo as bactérias o principal agente invasor. No entanto, a infecção pode ser devida a outros agentes patogénicos, tais como leveduras e algas. Casos de etiologia viral ou consequentes de agressões físicas ou químicas podem ser encontrados, embora tais situações sejam menos frequentes (Bradley, 2002; Bramley *et al.*, 2003).

Quando a glândula mamária é invadida por um microrganismo, há um aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos e mobilização de leucócitos (em particular os neutrófilos polimorfonucleares) para o local afetado. Estes fagocitam os agentes patogénicos, com o objetivo de neutralizar a infeção (Bramley *et al.*, 2003). Assim, independentemente da gravidade da infeção, as mastites caracterizam-se por um aumento da contagem de células somáticas (CCS) no leite. A população de células somáticas é constituída em 95% por leucócitos (neutrófilos, macrófagos e linfócitos), contendo também uma pequena percentagem de células epiteliais (Bradley & Green, 2005). Deste modo, a CCS no leite é um bom indicador de infeções intra-mamárias, considerando-se que um animal está infetado quando apresenta uma CCS superior a 200.000 células/ml (Bramley *et al.*, 2003).

As mastites podem ser agrupadas de acordo com a manifestação de sinais clínicos ou o modo de transmissão. De seguida será revista a sua classificação relativamente à manifestação de sinais clínicos, na qual se dividem em clínicas e subclínicas, sendo que ambas podem ser provocadas por bactérias Gram-positivas e/ou Gram-negativas (Roth & Wolfenson, 2016).

- i. Mastites clínicas, ocorrem quando o animal manifesta sinais clínicos da doença. De acordo com a sua distribuição, estes classificam-se em locais, tais como dor, rubor, tumor, calor e inchaço da glândula mamária, ou sistémicos, como por exemplo febre, perda de apetite e desidratação. Também podem ser encontradas alterações no aspeto macroscópico do leite, tais como o aparecimento de secreções serosas ou com coágulos de sangue (Edmonson & Bramley, 2004). As mastites clínicas podem ser agudas e de curta duração, ou insidiosas e de longa duração. Dependendo dos sinais clínicos presentes, os episódios agudos classificam-se em subagudos ou per-agudos (Bramley *et al.*, 2003). Geralmente as mastites clínicas acompanham-se de um grande aumento da CCS no leite (De Haas, Barkema & Veerkamp, 2002). A sua prevalência em Inglaterra e no País de Gales é de 47% a 71% (Bradley, Leach, Breen, Green & Green, 2007).
- ii. Mastites subclínicas, não se acompanham de sinais clínicos, sejam estes locais ou sistémicos. Deste modo, não são detetáveis sem recurso a métodos auxiliares de diagnóstico, pelo que

este se realiza através do teste californiano de mastites, CCS ou pelo diagnóstico bacteriológico. O teste californiano de mastites é um indicador da CCS no leite, baseando-se numa reação entre os ácidos nucleicos e um detergente (Edmonson & Bramley, 2004). A CCS é a medida mais utilizada para a deteção de mastites subclínicas (Bramley *et al.*, 2003). Ainda que nestes casos, o aumento da CCS não seja tão pronunciado como nas mastites clínicas, este pode manter-se por um maior período de tempo (Lavon *et al.*, 2011b; Roth & Wolfenson, 2016). As infeções subclínicas, caracterizam-se por serem episódios crónicos e de longa duração, sendo que os animais em questão constituem uma importante via de infeção do rebanho (Bramley *et al.*, 2003). A prevalência nos países desenvolvidos está entre os 20% e 50% (Lavon *et al.*, 2011c).

Relativamente ao modo de transmissão, as mastites classificam-se em:

- i. Ambientais, que são provocadas por bactérias que incluem *Echerichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella spp.*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis* (*S. uberis*). Estas encontram-se no meio ambiente do animal (fezes, água, matéria vegetal, cama e solo), não estando bem-adaptadas a sobreviver no hospedeiro. Uma vez estabelecida a infeção num quarto da glândula mamária, a transmissão para outros não infetados pode ocorrer, sendo, no entanto, pouco comum. As mastites ambientais ocorrem essencialmente no período seco e na época do parto (Smith & Hogan, 1993; Bradley, 2002; Bramley *et al.*, 2003).
- ii. Contagiosas, que são provocadas por bactérias tais como *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis* e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Ao contrário das anteriores, estas apresentam boas condições de sobrevivência no hospedeiro, nomeadamente ao nível do úbere. Geralmente estão na origem de infeções subclínicas de longa duração. A transmissão das mastites contagiosas ocorre de animal para animal, sendo que as máquinas de ordenha, mãos dos operadores e panos ou papéis de limpeza dos tetos, representam importantes veículos de transmissão (Fox & Gay, 1993; Bradley, 2002; Bramley *et al.*, 2003).

Sendo uma das doenças mais comuns dos bovinos leiteiros, as mastites estão relacionadas com importantes perdas económicas para o produtor. Animais com mastites, sejam clínicas ou subclínicas, têm uma menor produção de leite, o que conduz a uma diminuição dos rendimentos recebidos (DeGraves & Fetrow, 1993). As perdas por produção representam 70% a 80% do seu impacto económico (Petrovskia, Trajcevb & Buneski, 2006; Huijps, Lam & Hogeveen, 2008). Além da menor produção, as mastites conduzem também a uma menor qualidade do leite produzido. A indústria compradora de leite, estabelece aos produtores um limite máximo de CCS e níveis microbiológicos. Ao ultrapassar um destes limites, o que pode ocorrer em caso de mastites, há uma penalização sobre

o preço base do leite pago ao produtor. Também se deve ter em conta a presença de resíduos de antibióticos, cujo risco pode aumentar sempre que existam vacas tratadas, conduzindo a penalizações. Outro fator que se relaciona com o impacto económico das mastites é o aumento do leite de desperdício (Halasa, Huijps, Østerås & Hogeveen, 2007). Este corresponde ao leite que não é apto para consumo humano, sendo constituído pelo colostro, leite de animais com mastites e de animais tratados com antibióticos ou outros fármacos que possam deixar resíduos (Brunton, Duncan, Coldham, Snow & Jones, 2012). Verifica-se também um aumento dos gastos com serviços veterinários, fármacos e outras despesas relacionadas com o diagnóstico, como por exemplo culturas microbiológicas. Além do mais, há um aumento de gastos com mão de obra. Caso esta seja externa, o seu valor é facilmente contabilizável. Caso seja interna, a perceção do seu valor não é tão fácil, podendo ser estimado através do menor tempo que um trabalhador despense noutras tarefas, em prole de trabalhos relacionados com as mastites (Halasa *et al.*, 2007).

Santos *et al.* (2004) observaram que os animais com mastites, independentemente do período de ocorrência, apresentaram uma maior taxa de refugo relativamente àqueles que permaneceram saudáveis. Gröhn, Eicker, Ducrocq e Hertl (1998) estudaram o efeito de várias doenças na taxa de refugo dos animais, através de diferentes modelos estatísticos. Os resultados obtidos demonstraram que as mastites clínicas são um importante fator de risco no refugo dos animais ao longo da lactação, tendo inclusivamente sido a doença que mais influenciou a taxa de refugo. A maior probabilidade de refugo observada nestes animais, traduz-se também num menor benefício económico. Tal impacto, deve-se ao custo de um animal de reposição, à menor produção esperada de uma primipara relativamente a uma múltipara e à menor eliminação de animais por motivos produtivos, devida a uma maior eliminação por mastites (Halasa *et al.*, 2007).

## **2. Reprodução**

### **2.1. Fisiologia reprodutiva da vaca**

A vaca é um animal poliéstrico contínuo, pelo que não estando gestante, retorna ao cio em intervalos de 18 a 24 dias (média 21 dias) ao longo do ano. O ciclo éstrico é o intervalo entre o início de dois períodos sucessivos de recetividade sexual. A duração deste ciclo e a manifestação dos sinais de cio, são o resultado de alterações cíclicas que ocorrem nos ovários, ao nível do corpo lúteo e folículos, e nas suas principais secreções hormonais, sendo estas progesterona e estrogénio, respetivamente. O ciclo éstrico é controlado, essencialmente, pela secreção da hormona libertadora de gonadotropina

(GnRH) pelo hipotálamo, hormona folículo estimulante (FSH) e hormona luteinizante (LH) pela hipófise anterior, e progesterona e estrogénio pelo ovário (Hartigan, 2004).

O ciclo éstrico encontra-se dividido em duas fases, folicular e luteínica:

- i. Fase folicular, período no qual cada folículo em crescimento possui dois tipos de células: células da teca, que contêm recetores da LH, respondendo a esta através da síntese de androgénios (androstediona e testosterona); células da granulosa, que contêm recetores da FSH, respondendo a esta pela conversão dos androgénios em estrogénios. Os folículos crescem sob a influência da FSH e estrogénio, secretando estrogénio folicular. Este, ao passar para a circulação, exerce *feedback* negativo sobre a FSH, dando-se assim a seleção de um folículo. A partir desta fase, o folículo selecionado passa a ser dependente da LH, para crescer e secretar estrogénio. Este, por sua vez, exerce *feedback* positivo no eixo hipotálamo-hipofisário, aumentando a frequência do pulso da GnRH. Tal aumento conduz ao pico pré-ovulatório da LH e consequente ovulação. Nesta fase, um padrão de secreção da LH inapropriado pode levar a atresia ou persistência indevida do folículo dominante, comprometendo assim o sucesso da ovulação (Hartigan, 2004).
- ii. Fase luteínica, ocorre após a ovulação. As células foliculares diferenciam-se em células luteínicas, secretoras de progesterona. Através da secreção de progesterona, o corpo lúteo prepara o endométrio para a implantação e manutenção inicial da gestação. Em condições normais, o corpo lúteo cresce até ao dia 16 a 18 do ciclo éstrico. A secreção da LH mantém-no funcional até à secreção de prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$  (PGF<sub>2</sub> $\alpha$ ) pelo útero, com consequente luteólise (Hartigan, 2004). Caso não haja fecundação, o ciclo éstrico retorna ao início após a lise do corpo lúteo (Kojima, 2003).

## 2.2. Desempenho reprodutivo

O desempenho reprodutivo de uma exploração de bovinos leiteiros, tem um importante impacto na sua rentabilidade económica. A eficiência reprodutiva dos animais, pode ser avaliada através de vários indicadores, tais como: dias ao primeiro serviço, intervalo parto-conceção (IPC), dias abertos, intervalo entre partos, número de serviços por conceção, taxa de conceção, taxa de deteção de cios, taxa de prenhez (Dayyani, Karkudi & Bakhtiari, 2013) e perdas de gestação (Chebel *et al.*, 2004).

- i. Dias ao primeiro serviço, correspondem ao tempo decorrido entre a data de parto e a primeira IA registada (Rocha, Martins & Carvalheira, 2010).
- ii. IPC, determina o intervalo de tempo entre o parto e a IA fecundante, em todos os animais confirmados gestantes (Rocha *et al.*, 2010).

- iii. Dias abertos, incluem os animais gestantes, correspondendo ao intervalo de tempo entre o parto e a concepção, e os não gestantes, nos quais se calcula o intervalo de tempo entre o parto e a data de refúgio (Agriculture and Horticulture Development Board [AHDB], 2012).
- iv. Intervalo entre partos, diz respeito ao número de dias entre dois partos consecutivos (Rocha *et al.*, 2010).
- v. Número de serviços por concepção, corresponde ao número de IAs totais realizadas nas vacas que ficaram gestantes, a dividir pelo número total de vacas prenhas (Rocha *et al.*, 2010).
- vi. Taxa de concepção, é um valor percentual que se calcula dividindo o número de animais gestantes pelo número total de inseminações (Cook, 2009).
- vii. Taxa de deteção de cios, é calculada através da divisão do número de vacas inseminadas pelo número de vacas elegíveis para inseminar, a cada 21 dias, durante o ano (Dayyani *et al.*, 2013).
- viii. Taxa de prenhez (*pregnancy rate*), calcula-se multiplicando a taxa de concepção pela taxa de deteção de cios. O seu valor corresponde à proporção de vacas que ficaram gestantes, dentro daquelas que poderiam ter ficado, a cada 21 dias (Dayyani *et al.*, 2013). Melhorias ao nível deste parâmetro aumentam os benefícios esperados por vaca por ano (Chebel *et al.*, 2004). A taxa de prenhez tem vindo a diminuir ao longo dos últimos 30 anos (Hansen, Soto & Natzke, 2004).

Uma produção de leite rentável e eficiente, depende da gestão de custos das explorações. A rentabilidade do sector leiteiro é influenciada pela saúde e eficiência reprodutiva dos animais, sendo que estas afetam tanto a produção de leite como as decisões de refúgio de uma exploração (Santos *et al.*, 2004). Quando uma vacaria tem uma eficiência reprodutiva baixa, aumenta a média de dias em leite, diminui a produção e aumenta a taxa de refúgio por motivos reprodutivos (Risco & Melendez, 2011). Assim, ao melhorar o desempenho reprodutivo, haverá um maior número de animais cuja produção se encontra mais próxima do pico, do que de uma fase mais avançada da curva de lactação, o que se reflete num aumento da produção. Explorações com baixa eficiência reprodutiva têm maiores gastos com sêmen, hormonas, serviços veterinários, mão de obra e ainda, um aumento no custo de reposição das vacas que não ficam gestantes. Há também uma diminuição dos rendimentos, devida a uma menor produção de leite e venda de bezerras. Importa considerar ainda os custos de oportunidade de prolongar os dias abertos e os custos de não eliminar outras vacas, devido a uma maior eliminação por motivos reprodutivos (Le Blanc, 2007). O custo de oportunidade representa o valor associado a uma melhor alternativa que, no entanto, não foi a escolhida.

### 3. Influência das mastites no desempenho reprodutivo

#### 3.1. Indicadores reprodutivos alterados

Ao longo dos últimos anos, vários autores estudaram a relação das mastites, sejam clínicas ou subclínicas, com um menor desempenho reprodutivo dos bovinos leiteiros (Lavon *et al.*, 2016). A tabela 2 resume os principais indicadores reprodutivos que se demonstram alterados na presença de mastites, segundo diversos autores.

Tabela 2: Indicadores reprodutivos alterados em animais com mastites.

	Mastites clínicas	Mastites subclínicas
<b>Intervalo parto-concepção</b>	A, B, C, I, L	J
<b>Dias abertos</b>	D, E	D
<b>Dias à 1ª inseminação artificial</b>	A, B, D, I, L	D, J
<b>Nº serviços por concepção</b>	C, D, E, I, L	D, J
<b>Probabilidade prenhez à 1ª inseminação artificial</b>	F	F
<b>Perdas de gestação</b>	E, K	J
<b>Probabilidade de concepção</b>	G	G
<b>Alterações ciclo éstrico</b>	H	-

Legenda:

<sup>A</sup>Barker *et al.* (1998);

<sup>B</sup>Nava-Trujillo, Soto-Belloso e Hoet (2010);

<sup>C</sup>Ahmadzadeh *et al.* (2009);

<sup>D</sup>Schrick *et al.* (2001);

<sup>E</sup>Santos *et al.* (2004);

<sup>F</sup>Fuenzalida *et al.* (2015);

<sup>G</sup>Lavon, Ezra, Leitner e Wolfenson (2011a);

<sup>H</sup>Moore *et al.* (1991);

<sup>I</sup>Chegini, Hossein-Zadeh, Hosseini-Moghadam e Mhadparvar (2016);

<sup>J</sup>Pinedo *et al.* (2009);

<sup>K</sup>Chebel *et al.* (2004);

<sup>L</sup>Gunay & Gunay (2008).

As mastites aumentam a CCS no leite, sendo esta medida o principal método de diagnóstico utilizado para as mastites subclínicas (Bramley *et al.*, 2003). De seguida, serão apresentados resultados obtidos por diversos autores, no que diz respeito ao impacto da CCS em alguns indicadores reprodutivos.

### **3.1.1. Taxa de prenhez**

Elevadas CCS perto da data de IA estão associadas a reduções significativas da taxa de prenhez. Quando a CCS foi superior a 399.000 células/ml, nos primeiros 31 dias após a data de IA, houve uma redução de 26% na taxa de prenhez. Esta redução demonstrou ser ainda mais significativa nos casos em que, além da CCS elevada, os animais apresentavam sinais clínicos da infeção. Quando a CCS apresentou valores compreendidos entre 200.000 células/ml e 399.000 células/ml, o impacto observado foi menor, tendo-se registado uma redução da taxa de prenhez na ordem dos 18%. Também as CCS datadas entre 31 a 60 dias antes da IA mostraram ter impacto na taxa de prenhez, no entanto, tal não ocorreu para todas as categorias de CCS estabelecidas (Hudson, Bradley, Breen & Green, 2012).

### **3.1.2. Taxa de conceção**

Lavon *et al.* (2011a) avaliaram o efeito das mastites, determinadas pelo padrão da CCS, na taxa de conceção. Para tal analisou registos correspondentes a 287.192 primeiras IAs, datadas entre 2002 e 2008. Os animais analisados foram divididos em três grupos, consoante a evolução da infeção: CCS elevadas antes e após a IA, ou seja, animais crónicos/subclínicos; CCS elevadas após a IA, ou seja, novas infeções; CCS elevadas antes da IA, ou seja, animais curados. Todos os grupos estudados, registaram uma menor taxa de conceção, relativamente aos animais saudáveis. Os animais com infeções subclínicas foram, posteriormente, divididos em três grupos, de acordo com a elevação da CCS: ligeira, entre 150.000 células/ml e 450.000 células/ml; moderada, entre 450.000 e 1.000.000 células/ml; grave, superior a 1.000.000 células/ml. Os três grupos estudados apresentaram uma taxa de conceção inferior à dos animais saudáveis. Nas infeções ligeiras, moderadas e graves, a redução foi de, respetivamente 14,1%, 14,5% e 20,5%, relativamente aos animais saudáveis.

### **3.1.3. Intervalo parto-conceção, dias ao primeiro serviço e número de serviços por conceção**

Pinedo *et al.* (2009) estudaram o efeito de altas CCS na eficiência reprodutiva de bovinos leiteiros. Neste estudo, todos os animais com *linear score* (LS) superior a 4,5 (correspondente à CCS de 282.843 células/ml), foram contabilizados como tendo uma elevação alta das células somáticas. Os animais presentes neste grupo registaram um aumento do IPC de 48,7 dias, relativamente aos que permaneceram saudáveis. Também se observaram alterações nos dias ao primeiro serviço e no número de serviços por conceção. No primeiro caso, o aumento foi de 21,8 dias e no segundo de 0,48 serviços por conceção.

Para o estudo da influência da CCS nos indicadores reprodutivos, importa considerar a cronicidade da elevação da CCS. Vacek, Stádník e Štípková (2007), compararam o impacto reprodutivo de animais com apenas um episódio de mastite clínica durante a lactação, relativamente a animais que registaram dois ou mais eventos. Os resultados obtidos demonstraram que, a ocorrência de dois ou mais episódios de mastites, tem um maior impacto no IPC e no número de serviços por concepção, relativamente a um único caso de mastites. Ainda assim, comparativamente aos animais saudáveis, os dois grupos analisados apresentaram piores índices reprodutivos. Um outro estudo, realizado por Lavon *et al.* (2011a), relatou que os animais com CCS elevadas numa só contagem, datada 10 dias antes da IA, apresentaram uma diminuição da taxa de concepção, relativamente aos animais saudáveis.

O impacto que as mastites têm nos indicadores reprodutivos, deve-se ao facto de estes animais apresentarem alterações em várias fases do ciclo reprodutivo, tais como: alterações no perfil hormonal e na competência do oócito, falhas na fertilização e ambiente uterino desfavorável ao desenvolvimento embrionário (Kumar *et al.*, 2017). Alguns autores observaram que as mastites estão geneticamente associadas a reduções da fertilidade. A correlação genética entre as mastites clínicas e o intervalo entre partos é de 0,31 e entre as mesmas e o número de dias ao primeiro serviço é de 0,28. Tais valores, demonstram uma correlação favorável entre as mastites e a fertilidade, o que indica que a seleção genética contrária a esta doença tende a alcançar melhorias ao nível dos indicadores reprodutivos acima referidos (Pritchard, Coffey, Mrode & Wall, 2013).

### **3.2. Impacto etiológico**

Relativamente ao impacto etiológico da infeção, no desempenho reprodutivo dos animais, os dados apresentados por diferentes estudos nem sempre estão de acordo. Moore *et al.* (1991), observaram que as mastites por agentes Gram-negativos têm um maior impacto na eficiência reprodutiva dos bovinos leiteiros, relativamente às infeções por Gram-positivos. No entanto, outros autores apontam que tanto as mastites por agentes Gram-positivos como Gram-negativos influenciam o desempenho reprodutivo dos animais (Barker *et al.*, 1998; Schrick *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2004; Roth & Wolfenson, 2016). Tendo em conta que no estudo de Barker *et al.* (1998), as principais bactérias Gram-positivas eram do género *Streptococcus* e no estudo de Moore *et al.* (1991) *Staphylococcus*, é possível que alguns géneros de bactérias Gram-positivas tenham um maior impacto do que outros no desempenho reprodutivo (Barker *et al.*, 1991).

Schukken *et al.* (2011) afirmaram que, as diferenças observadas no desempenho reprodutivo, estão relacionadas com a ocorrência de diferentes tipos de respostas imunes nas infeções de diferentes etiologias. De facto, a resposta imune é diferente consoante a etiologia da infeção:

- i. Agentes Gram-negativos, são reconhecidos pelo organismo através do recetor *toll like receptor* (TLR) 4. Este, identifica as endotoxinas, que são o componente lipopolissacarídeo da parede celular das bactérias Gram-negativas. Segue-se uma resposta imune, que resulta, entre outros acontecimentos, na ativação de leucócitos e produção de quimoquinas e citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina (IL)-1, IL-6 e IL-8. Nestas infeções, a libertação de citocinas pró-inflamatórias é mais rápida e intensa do que nas de etiologia Gram-positiva (Schukken *et al.*, 2011; Analkip *et al.*, 2014).
- ii. Agentes Gram-positivos, são reconhecidos pelo organismo através do recetor TLR 2. Este, identifica o peptidoglicano e o ácido lipoteicoico das bactérias Gram-positivas. O peptidoglicano é um mucopéptido constituinte da parede celular dos dois tipos de bactérias, embora no caso das Gram-positivas esteja presente em maior quantidade, efetuando um revestimento de múltiplas camadas. O ácido lipoteicoico é um outro constituinte da parede celular dos agentes Gram-positivos. Após o reconhecimento da bactéria, a resposta imune que se segue, conduz também à ativação de leucócitos e produção de quimoquinas e citocinas pró-inflamatórias. Neste caso, a expressão do TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-8 é menos intensa, havendo um importante papel da IL-6 (Schukken *et al.*, 2011; Analkip *et al.*, 2014).

Tendo em conta os diversos mecanismos pelos quais as mastites, de diferentes etiologias e gravidade, se relacionam com o desempenho reprodutivo dos bovinos leiteiros, de seguida, serão revistas as consequências de cada tipo principal de infeção, anteriormente descrito no capítulo 1.

### **3.3. Consequências reprodutivas de acordo com a etiologia e gravidade da infeção**

#### **3.3.1. Mastites clínicas por agentes Gram-negativos**

Ao longo dos últimos anos, vários autores estudaram a relação das mastites com a fertilidade, tendo sido reportadas alterações ao longo de diversas fases do ciclo reprodutivo: alterações no ciclo éstrico (Moore *et al.*, 1991), alterações no desenvolvimento folicular (Barker *et al.*, 1998; Lavon *et al.*, 2008) e alterações na maturação do óócito e no desenvolvimento embrionário precoce (Soto, Natzke & Hansenet, 2003).

Quando um animal é alvo de uma mastite por agentes Gram-negativos, inicia-se uma resposta imune que se relaciona com a influência que estas infeções têm no desempenho reprodutivo dos animais. De seguida, serão revistos os principais mediadores envolvidos na relação das mastites com a fertilidade.

a) Prostaglandina F2 $\alpha$

Num animal saudável, após a ovulação, dá-se o desenvolvimento e maturação do corpo lúteo, com consequente produção de progesterona. Entre o dia 16 e 18 do ciclo éstrico, o endométrio produz e liberta prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ), que conduz à regressão do corpo lúteo passados 3 a 5 dias. Este é responsivo à PGF2 $\alpha$  entre os dias 6 e 17 do ciclo (Moore *et al.*, 1991). Deste modo, a PGF2 $\alpha$  está relacionada com a regressão luteínica e com a estimulação das contrações uterinas, que despertam o início do parto. Assim, na vaca gestante, a síntese de PGF2 $\alpha$  é suprimida, o que favorece a manutenção da gestação (Giri *et al.*, 1990).

Piotrowska-Tomala *et al.* (2015), observaram que a indução de mastites por agentes Gram-negativos estimula a libertação de PGF2 $\alpha$ . Também Giri *et al.* (1990), observaram um aumento na concentração de PGF2 $\alpha$ , nos animais que sofreram infusões endovenosas de endotoxinas de *E. coli*.

Os episódios de mastites clínicas, ao estimularem a produção de PGF2 $\alpha$ , conduzem à luteólise prematura, com consequente alteração do intervalo inter-éstrico. Ao estudar o efeito das mastites clínicas no intervalo inter-éstrico de vacas leiteiras, observou-se que os episódios cujos agentes etiológicos foram Gram-negativos, apresentaram uma probabilidade do intervalo inter-éstrico se apresentar alterado (intervalo inferior a 18 dias ou superior a 24 dias), aproximadamente duas vezes superior, à dos animais que permaneceram saudáveis. A regressão luteínica, consequente do aumento da concentração de PGF2 $\alpha$ , pode conduzir a alterações na taxa de concepção, bem como aumentar a taxa de mortalidade embrionária precoce (Moore *et al.*, 1991).

Quando ocorre antes da IA, a lise do corpo lúteo conduz a baixas concentrações de progesterona, levando ao desenvolvimento de folículos e oócitos aberrantes (Austin, Mihm, Ryan, Williams & Roche, 1999) o que resulta numa menor taxa de concepção (Ahmad, Schrick, Butcher & Inskeep, 1995).

Após a IA, a luteólise conduz também a uma diminuição dos níveis de progesterona, comprometendo a habilidade do concepto na secreção de moléculas necessárias para o funcionamento do corpo lúteo e manutenção da gestação (Mann & Lamming, 2001), verificando-se uma maior mortalidade embrionária. De acordo com estes resultados, está o estudo de Soto *et al.* (2003), no qual se observou que os oócitos aos quais se adicionou PGF2 $\alpha$  ao meio de cultura, durante a fase de maturação, registaram uma menor percentagem de blastocistos desenvolvidos no dia 8. Também no estudo realizado por Schrick, Inskeep e Butcher (1993), foi reportada uma correlação negativa entre a qualidade embrionária e a concentração uterina de PGF2 $\alpha$ . A administração de PGF2 $\alpha$ , 5 a 8 dias após a data de concepção, em animais suplementados com progesterona, resultou em menores taxas

de prenhez (Seals, Lemaster, Hopkins & Schrick, 1998), menores percentagens de embriões que se desenvolveram para lá do estadio de mórula e menores pontuações de qualidade embrionária (Hockett, Rohrbach & Schrick, 1998, citado por Schrick *et al.*, 2001). Giri *et al.* (1990) observaram que as endotoxinas, ao aumentarem as concentrações de PGF2 $\alpha$  e diminuírem as concentrações de progesterona, conduzem a um aumento da percentagem de abortos durante o primeiro trimestre da gestação. Também Cullor (1990) citado por Barker *et al.* (1998), registou um aumento da taxa de aborto no primeiro trimestre, em animais com mastites por agentes Gram-negativos. O mesmo não se verificou no segundo e terceiro trimestre. Tais dados sugerem que a luteólise induzida pelas endotoxinas, tem um efeito mais pronunciado quando a progesterona placentária ainda não está disponível. Um outro estudo, realizado por Risco, Donovan e Hernandez (1999), reportou que animais com mastites clínicas nos primeiros 45 dias de gestação, aumentam o risco de aborto em 2,7 vezes, nos seguintes 90 dias, relativamente aos animais saudáveis. Importa referir que estes autores não tiveram em conta a etiologia da infeção, mas sim a gravidade da mesma.

#### b) Eixo hipotálamo-hipofisário

O pior desempenho reprodutivo observado em animais com mastites, pode estar relacionado com alterações na secreção hormonal do eixo hipotálamo-hipofisário. Estas hormonas, GnRH, FSH e LH, são responsáveis pela maturação do oócito e ovulação (Kumar *et al.*, 2017). A infusão da glândula mamária com *E. coli* conduz a endotoxémia (Barker *et al.*, 1998) e diminui a libertação da GnRH. Herman e Tomaszewska-Zaremba (2010) reportaram uma diminuição na expressão de genes associados à regulação da GnRH e uma conseqüente diminuição da sua concentração, após a infusão endovenosa de endotoxinas em ovelhas. Tais alterações na secreção da GnRH, conduzem a um desenvolvimento folicular deficiente, com diminuição dos níveis de estrogénios e conseqüente anovulação (Barker *et al.*, 1998). Tal como foi explicado anteriormente, os estrogénios exercem um *feedback* positivo no eixo hipotálamo-hipofisário, aumentando a frequência e pulso da GnRH, o que por sua vez conduz ao pico da LH e ovulação (Hartigan, 2004). Assim, quando ocorrem alterações nos níveis hormonais que asseguram este processo, verifica-se um comprometimento da ovulação.

Animais com mastites, registam um aumento da concentração da IL-1 o que por sua vez reduz os recetores da LH (Barker *et al.*, 1998). Também MacCan, Kimura, Karanth, Yu e Rettori (1997) reportaram uma diminuição nos níveis da LH nestes animais. Tendo em conta que a LH é responsável pelo início da maturação do oócito (Wise, Suss, Strazinger, Wuthrich & Maurer, 1994), a baixa concentração observada em animais com mastites pode estar relacionada com alterações ao nível da maturação dos oócitos (Schrick *et al.*, 2001). Tais resultados, poderão estar relacionados com o trabalho de Roth *et al.* (2013), que ao estudarem o efeito das mastites no desenvolvimento de oócitos

*in vitro*, observaram que os animais cujas CCS foram superiores a aproximadamente, 300.000 células/ml, apresentaram uma menor percentagem formação de blastocistos. Estes oócitos, demonstraram uma probabilidade de alcançar o estadio de blastocisto de 7 dias, 4 vezes inferior à dos animais saudáveis. Tais resultados, no entanto, não variaram consoante a etiologia (Gram-positivos *versus* Gram-negativos) ou gravidade da infeção (mastites clínicas *versus* subclínicas). Resultados semelhantes foram encontrados por Soto *et al.* (2003), tendo observado que os oócitos nos quais se adicionaram endotoxinas ao meio de cultura, durante a fase de maturação e após a fertilização, alcançaram uma menor proporção de oócitos no estadio de blastocisto de 8 dias e taxa de clivagem, respetivamente.

#### c) Citoquinas pró inflamatórias

Lavon *et al.* (2008) e Williams *et al.* (2008), observaram alterações imediatas no desenvolvimento folicular, após a infusão intra-mamária ou a inoculação *in vitro* de endotoxinas de *E. coli*. Tais resultados, poderão estar relacionados com a libertação de citoquinas pró-inflamatórias, tais como o TNF- $\alpha$ , interferão  $\gamma$ , IL-1 e IL-6.

O TNF- $\alpha$  está envolvido na diminuição da produção de estradiol e androstediona, pelas células da granulosa e da teca, respetivamente (Williams *et al.*, 2008). Foi também associado a efeitos prejudiciais ao desenvolvimento embrionário, tendo-se registado uma menor taxa de desenvolvimento de blastocistos e um aumento da apoptose em oócitos expostos ao TNF $\alpha$  (Deb *et al.*, 2011). A produção de estradiol é também atenuada pelo interferão  $\gamma$  (Spicer & Alpizar, 1994). O aumento da concentração da IL-1, reduz os recetores de LH, estimula a libertação da hormona adrenocorticotrópica, aumenta a esteroidogénese adrenal (Barker *et al.*, 1998) e diminui a produção de estrogénios em folículos de grande tamanho (Baratta, Basini, Bussolati & Tamanini, 1996). A IL-6 reduz a atividade da aromatase (Roth & Wolfenson, 2016), que por sua vez é responsável por catalisar os últimos passos da biossíntese de estrogénios a partir de androgénios (Meidan, 2017).

Deste modo, a libertação de citoquinas pró-inflamatórias, como consequência de mastites por agentes Gram-negativos, conduz a uma diminuição nos níveis de estrogénios. Esta diminuição, está relacionada, tal como vimos anteriormente, com um comprometimento da ovulação.

#### d) Óxido nítrico

A inflamação observada nas mastites, aumenta também a concentração de óxido nítrico. Soto *et al.* (2003), adicionaram nitroprussiato de sódio dihidratado, uma molécula que liberta óxido nítrico após

o metabolismo, ao meio de cultura de oócitos após a fertilização, tendo observado um efeito deletério no desenvolvimento do estadio de blastocisto.

e) Cortisol

A administração intra-mamária ou endovenosa de endotoxinas de *E. coli*, acompanhou-se de um aumento dos níveis de cortisol (Lavon *et al.*, 2008). O cortisol, diminui a frequência dos pulsos da LH, o que por sua vez bloqueia a secreção de estradiol (Breen, Billings, Wagenmaker, Wessinger & Karsch, 2005). Como vimos anteriormente, a partir da fase de seleção folicular, este passa a ser dependente da LH para crescer e secretar estrogênio. O estrogênio, por sua vez, exerce *feedback* positivo no eixo hipotálamo-hipofisário, o que conduz ao pico da LH e consequente ovulação (Hartigan, 2004). Assim, o aumento dos níveis de cortisol, juntamente com a diminuição dos recetores da LH, provocada pela IL-1, bloqueia o aparecimento da LH, conduzindo ao aparecimento de quistos ováricos e à ausência da manifestação dos sinais de cio (Barker *et al.*, 1998).

### 3.3.2. Mastites clínicas por agentes Gram-positivos

Vários autores verificaram que tanto as mastites de etiologia Gram-positiva como Gram-negativa, influenciam o desempenho reprodutivo dos animais (Barker *et al.*, 1998; Schrick *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2004; Roth & Wolfenson, 2016).

Estudos recentes observaram um aumento imediato na CCS, na concentração de PGF2 $\alpha$  e cortisol plasmático, em animais com mastites clínicas induzidas por *S. uberis* (Hockett *et al.*, 2000). Tal como vimos anteriormente, o aumento da concentração de PGF2 $\alpha$  está relacionado com a regressão luteínica e, consequentemente, com uma menor taxa de concepção (Ahmad *et al.*, 1995) e menor qualidade embrionária (Schrick *et al.*, 1993; Soto *et al.*, 2003). Tais observações, vão de encontro aos resultados obtidos por Barker *et al.* (1998), ao registarem um maior número de serviços por concepção e IPC nas infeções por agentes Gram-positivos, o que provavelmente se deve à maior regressão luteínica e/ou mortalidade embrionária (Hockett *et al.*, 2000). O aumento do cortisol, por sua vez, suprime o aparecimento da LH (Breen, Billings, Wagenmaker, Wessinger & Karsch, 2005), o que compromete o sucesso da ovulação.

Rotta (1975) observou que a injeção de peptidoglicano em coelhos conduz a uma resposta pirética, que por sua vez desaparece com a administração de anti-soro para o mesmo. Também Joahnnsen *et al.* (1990) reportaram que o peptidoglicano aumenta a temperatura corporal. Hockett *et al.* (2000) ao induzirem mastites experimentais por *S. uberis* em bovinos leiteiros, registaram uma elevação da temperatura corporal. Os animais expostos a stress térmico são alvos de um menor desenvolvimento

embrionário (Roth, 2015) e maior mortalidade embrionária (Edwards & Hansen, 1997; Schrick *et al.*, 2001), sendo que as maiores ameaças ao desenvolvimento ocorrem no primeiro dia da gestação (Ealy, Drost & Hansen, 1993; Edwards & Hansen, 1997). Novilhas submetidas a stress térmico, registaram uma menor fertilidade e qualidade embrionária, tendo-se observado uma percentagem de embriões normais 30% inferior à do grupo de controlo (Putney, Drost & Thatcher, 1988). Oócitos sujeitos experimentalmente a temperaturas elevadas, viram o seu desenvolvimento comprometido, tendo diminuído o número de oócitos que alcançaram o estadio de 2, 4 e 8 células (Eddwards & Hansen, 1997). Deste modo, os peptidoglicanos de algumas bactérias Gram-positivas, tal como as do género *Streptococcus*, podem conduzir a respostas semelhantes às das mastites por Gram-negativos, influenciando assim o desempenho reprodutivo dos bovinos leiteiros (Barker *et al.*, 1998).

### **3.3.3. Mastites subclínicas**

As mastites subclínicas, pela sua natureza crónica, podem estar envolvidas na alteração de processos reprodutivos, tal como o desenvolvimento e crescimento folicular (Lavon *et al.*, 2011c). Schrick *et al.* (2001) ao estudarem o efeito destas infeções no desempenho reprodutivo de vacas leiteiras, observaram que episódios subclínicos no início da lactação, têm efeitos semelhantes aos provocados pelas mastites clínicas. Além disso, constataram que as infeções subclínicas que se seguem de infeções clínicas, são acompanhadas de efeitos ainda mais severos no desempenho reprodutivo. Fuenzalida *et al.* (2015) estudaram o efeito da gravidade das mastites (clínicas *versus* subclínicas), no desempenho reprodutivo de 3.277 animais. Considerou-se um período reprodutivo crítico compreendido entre os 3 dias anteriores à primeira IA e os 32 dias posteriores à mesma. Os animais foram avaliados consoante a gravidade e cronicidade da infeção (mastite clínica aguda ou crónica e mastite subclínica aguda ou crónica), antes ou durante o período reprodutivo crítico. A probabilidade de prenhez foi 25% inferior nas infeções subclínicas e 33% inferior nas infeções clínicas, relativamente aos animais saudáveis. Tais observações, evidenciam a existência de uma relação entre as mastites subclínicas e a eficiência reprodutiva.

Vimos anteriormente que são vários os mediadores inflamatórios que se relacionam com a baixa esteroidogénese folicular, observada nas mastites clínicas. No caso das infeções subclínicas, não se sabe em concreto quais são os mediadores envolvidos (Lavon *et al.*, 2011c). No entanto, vários autores demonstraram haver uma redução das hormonas esteroides e uma atenuação do crescimento folicular em animais com mastites subclínicas, o que por sua vez conduz à menor eficiência reprodutiva observada.

#### a) Hormonas esteroides

Lavon *et al.* (2011c) estudaram a influência das mastites subclínicas nos níveis de hormonas esteroides, estradiol e androstediona, e na expressão de alguns genes, em folículos pré-ovulatórios. Um terço dos animais com mastites subclínicas, registou baixos níveis de estradiol e androstediona foliculares, nos folículos pré-ovulatórios. Foi também observada uma reduzida expressão da aromatase, nas células da granulosa. A aromatase catalisa os últimos passos da biossíntese de estrogénios, a partir de androgénios (Meidan, 2017), pelo que a sua reduzida expressão está diretamente relacionada com o baixo nível de estradiol observado. Nas células da teca, a expressão das enzimas CYP11A1 e CYP17A1 demonstrou-se diminuída (Lavon *et al.*, 2011c). A CYP11A1 é responsável pela conversão do colesterol numa hormona esteroide de nome pregnenolona, que por sua vez será convertida em androgénios através da CYP17A1 (Meidan, 2017). Deste modo, a fraca expressão destas enzimas está relacionada com os baixos níveis de androstediona encontrados. No mesmo grupo de animais, os recetores da LH apresentaram níveis inferiores ao normal. A LH regula a expressão das enzimas esteroidogénicas, tanto nas células da teca como da granulosa. Assim, a inferior concentração de estradiol folicular observada, está provavelmente relacionada com a menor expressão dos recetores da LH e dos genes esteroidogénicos. Pelos resultados observados, os autores concluem que os animais com mastites subclínicas, apresentam reduzidos níveis pré-ovulatórios da LH, o que conduz a um atraso da ovulação. Tais resultados, têm consequências ao nível do desempenho reprodutivo dos animais, o que se traduz em baixas taxas de fertilização e de conceção (Lavon *et al.*, 2011c). De acordo com este estudo, estão Furman *et al.* (2014), que observaram uma diminuição dos níveis de estradiol e androstediona foliculares em animais com mastites subclínicas experimentais, induzidas por agentes Gram-negativos e Gram-positivos.

#### b) Crescimento folicular

Rahman *et al.* (2012) observaram que as mastites subclínicas estão relacionadas com uma menor função ovárica, nomeadamente ao nível da foliculogénese. Animais com mastites subclínicas, registaram um menor número de folículos secundários, menor densidade de vasos sanguíneos e maior quantidade de tecido fibroso no córtex ovárico. Além do mais, obtiveram menores concentrações do fator de diferenciação e de crescimento 9 (GDF-9). Este, tem um papel essencial na foliculogénese, promovendo a progressão de folículos primários a terciários, regulando assim o desenvolvimento folicular durante esta etapa. Também Roth *et al.* (2015), reportaram uma menor expressão do GDF-9, em oócitos cujo meio de crescimento foi o fluido folicular de animais com mastites subclínicas. Além do mais, estes oócitos foram acompanhados de uma menor taxa de clivagem, maior apoptose e menor percentagem de formação de blastocistos. De acordo com estes resultados, está o estudo de

Furman *et al.* (2014), no qual se registou uma atenuação do crescimento folicular, nomeadamente nos folículos de tamanho médio, nos animais com mastites subclínicas por agentes Gram-positivos.

### **3.4. Períodos críticos no qual as mastites afetam o desempenho reprodutivo**

O período de ocorrência das mastites, parece ter influência no efeito que estas têm no desempenho reprodutivo dos bovinos leiteiros (Kumar *et al.*, 2017). A localização da infeção no tempo, determina o seu potencial de impacto na reprodução (Roth & Wolfenson, 2016). A data do episódio, relativamente à data de inseminação, está relacionada com a influência das mastites no sucesso da gestação (Fuenzalida *et al.*, 2015). Esta relação tem sido estudada por diversos autores, essencialmente em três períodos de tempo: antes da data de IA; entre a data de IA e o diagnóstico de gestação; após o diagnóstico de gestação (Ruegg *et al.*, 2015).

#### **3.4.1. Mastites antes da IA**

Animais cujas mastites ocorreram antes da IA, apresentaram um aumento dos dias ao primeiro serviço (Barker *et al.*, 1998; Schrick *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2004; Gunay & Gunay, 2008; Pinedo *et al.*, 2009; Nava-Trujillo *et al.*, 2010), IPC (Barker *et al.*, 1998; Gunay & Gunay, 2008; Pinedo *et al.*, 2009; Nava-Trujillo *et al.*, 2010), dias abertos (Schrick *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2004) e número de serviços por concepção (Schrick *et al.*, 2001; Pinedo *et al.*, 2009). Infeções neste período de tempo, foram também acompanhadas de uma menor taxa de concepção à primeira IA, menor taxa de prenhez aos 320 dias em leite, maior incidência de abortos e maior taxa de refugo (Santos *et al.*, 2004). Loeffler, Vries e Schukken (1999) observaram que quanto maior o intervalo entre o episódio de mastite e a data de IA, maior a probabilidade de prenhez.

#### **3.4.2. Mastites entre IA e diagnóstico de gestação**

Barker *et al.* (1998), observaram que os episódios de mastites imediatamente antes ou após a IA, são aqueles que têm um maior impacto na reprodução. Posteriormente, outros autores confirmaram que este seria o período de maior risco, quando se estuda a relação das mastites com a fertilidade (Ruegg *et al.*, 2015). Nos animais nos quais as mastites ocorreram entre a IA e o diagnóstico de gestação, observou-se um aumento número de serviços por concepção (Barker *et al.*, 1998; Schrick *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2004; Ahmadzadeh *et al.*, 2008; Gunay & Gunay, 2008), dias abertos (Schrick *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2004) e IPC (Barker *et al.*, 1998; Ahmadzadeh *et al.*, 2008; Gunay & Gunay, 2008). Foi também registado um aumento do número de dias ao primeiro serviço (Schrick *et al.*, 2001), menor probabilidade de prenhez ao primeiro serviço (Fuenzalida *et al.*, 2015), menor

probabilidade de concepção (Pinedo *et al.*, 2009), menor taxa de prenhez aos 320 dias em leite (Santos *et al.*, 2004) e maior incidência de abortos (Chebel *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2004).

### **3.4.3. Mastites após diagnóstico de gestação**

Embora o impacto das mastites na fertilidade seja menor à medida que a gestação avança, a ocorrência de episódios clínicos após o diagnóstico de gestação tem sido associada a um aumento das perdas de gestação (Ruegg *et al.*, 2015). Alguns autores verificaram que os animais com mastites após o diagnóstico de gestação têm uma maior incidência de abortos, relativamente àqueles que permaneceram saudáveis (Santos *et al.*, 2004; Pinedo *et al.*, 2009). Um outro estudo relatou que animais com mastites entre a data de IA e os 105 dias em leite, são acompanhados de um maior IPC e número de serviços por concepção (Ahmadzadeh *et al.*, 2008).

### **3.5. Efeito das mastites a longo-prazo**

O impacto que as mastites têm, a longo-prazo, na função folicular, tem sido estudado por diversos autores. Lavon *et al.* (2011b), analisaram esta relação através da observação de três grupos de animais: mastites experimentais induzidas por *E. coli*, *S. aureus* e grupo de controlo. O efeito das mastites na função folicular foi estudado quer a nível imediato quer a longo-prazo. Furman *et al.* (2014), dedicaram-se ao estudo do crescimento folicular e da concentração de esteroides a curto e a longo-prazo, em mastites experimentais induzidas do mesmo modo do estudo de Lavon *et al.* (2011b).

A diferença entre os dois autores, está relacionada com o facto de no estudo de Lavon *et al.* (2011b), as doses utilizadas terem visado a indução de mastites clínicas por agentes Gram-negativos e mastites subclínicas por agentes Gram-positivos, enquanto que no estudo de Furman *et al.* (2014), se utilizaram baixas doses em ambos os grupos, de modo a que daí resultassem mastites subclínicas.

#### **3.5.1. Mastites clínicas por bactérias Gram-negativas**

Os animais deste grupo apresentaram, durante a fase aguda da infeção, um grande aumento na CCS, sinais de inflamação local, aumento do cortisol e da temperatura corporal. Os níveis de estradiol e androstediona foliculares, na fase aguda, registaram níveis 50% inferiores aos do grupo de controlo. Foi demonstrada uma correlação significativa entre a CCS e temperatura corporal, relativamente à concentração de esteroides foliculares, durante a fase aguda. Com este resultado, os autores pressupõem que o nível de severidade da infeção é inversamente proporcional ao nível de esteroides foliculares. Passadas duas semanas, a concentração de esteroides foliculares voltou ao normal, não se verificando efeitos a longo-prazo (Lavon *et al.*, 2011b).

### **3.5.2. Mastites subclínicas por bactérias Gram-negativas**

No estudo realizado por Furman *et al.* (2014), os animais com mastites por agentes Gram-negativos, apresentaram um grande aumento da CCS, não tendo registado aumento da temperatura nem aumento do cortisol. A concentração de estradiol e androstediona foliculares, apresentaram-se diminuídas a longo-prazo. Neste estudo, ao contrário dos resultados obtidos por Lavon *et al.* (2011b) nos animais com mastites por agentes Gram-negativos, não se registou diminuição imediata das hormonas esteroides foliculares. Provavelmente, esta situação deve-se ao facto de no estudo de Lavon *et al.* (2011b) se ter administrado uma alta dose de agentes Gram-negativos, com a qual se induziram mastites clínicas, ao passo que Furman *et al.* (2014) realizaram uma exposição múltipla de baixas doses de agentes Gram-negativos, com a qual se pretendeu induzir mastites subclínicas (Furman *et al.*, 2014).

### **3.5.3. Mastites por subclínicas por bactérias Gram-positivas**

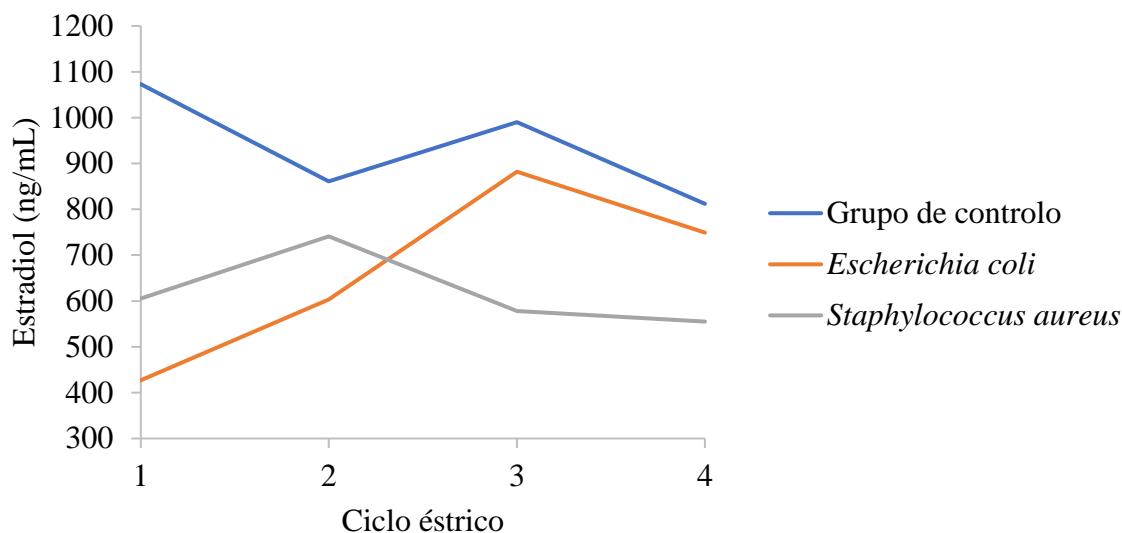
Nestes animais, não se identificaram sinais de inflamação local, nem aumento da temperatura corporal. A elevação da CCS foi inferior à do grupo de mastites por agentes Gram-negativos, mas superior ao grupo de controlo. A concentração de cortisol foi semelhante à do grupo controlo. A concentração de estradiol folicular registou uma diminuição imediata na fase aguda, que se prolongou por duas a três semanas, durante a fase crónica. Relativamente à androstediona folicular, os seus níveis também se mostraram diminuídos tanto na fase aguda como na fase crónica (Lavon *et al.*, 2011b).

No estudo realizado por Furman *et al.* (2014), os animais cujas mastites foram induzidas através de baixas doses de *S. aureus*, apresentaram um aumento da CCS, não tendo registado elevação do cortisol nem da temperatura corporal. Estes animais apresentaram um menor número de folículos de tamanho médio, o que indica haver uma diminuição imediata do crescimento folicular. Além do mais, a concentração de estradiol e androstediona foliculares, apresentaram-se diminuídas a longo-prazo.

Os autores põem a hipótese de haver afeção de pequenos folículos antrais na fase aguda da infeção. Estes, nos ciclos mais tardios, quando se tornam folículos pré-ovulatórios, apresentam esteroidogénese deficiente (Lavon *et al.*, 2011b).

Assim, a indução de mastites subclínicas por *S. aureus*, origina uma resposta menos aguda e mais crónica do que as mastites por *E. coli*, tendo influência nos folículos dos ciclos mais tardios (gráfico 1). Na infeção por agentes Gram-positivos, observa-se uma resposta tanto imediata como tardia, ao passo que no caso de infeção por agentes Gram-negativos, a resposta é unicamente imediata.

Figura 1. Evolução do estradiol ao longo do tempo em animais com mastites por *E. coli*, *S. aureus* e grupo de controlo (Lavon et al., 2011b, adaptado).



### 3.6. Estratégias para diminuir o impacto das mastites na reprodução

A eficiência reprodutiva é um dos fatores que mais se relaciona com a rentabilidade económica de uma exploração. Vimos até agora que as mastites têm um impacto negativo no desempenho reprodutivo dos bovinos leiteiros. Assim, em prol de melhorar a eficiência reprodutiva de uma vacaria, é importante que os produtores reconheçam a relação das mastites com a fertilidade, para que posteriormente sejam implementadas medidas que diminuam o impacto que as infeções intramamárias têm na reprodução.

#### 3.6.1. Prevenção das mastites

Numa estratégia de medicina preventiva deverão ser adotadas medidas que evitem a ocorrência de problemas como as mastites (Fuenzalida *et al.*, 2015). Tais medidas devem estar presentes no dia-a-dia das explorações de bovinos leiteiros, não devendo ser encaradas como medidas excecionais (Nava-Trujillo *et al.*, 2010). A prevenção das mastites é particularmente importante no período seco e após o parto, pois esta é a fase de maior suscetibilidade da glândula mamária (Bramley *et al.*, 2003). De seguida, será feita uma breve revisão relativa a medidas preventivas a adotar para a redução da prevalência das mastites.

O controlo das mastites envolve dois tipos principais de medidas: a redução da exposição aos agentes patogénicos e o aumento da resistência da vaca às infeções intra-mamárias. Uma correta preparação do úbere anteriormente à ordenha, estimula a descida do leite e reduz a contaminação bacteriana da pele. Os tetos deverão ser limpos com recurso a toalhas ou papéis individuais, não devendo estes ser

utilizados em mais do que um animal. A desinfecção dos tetos anterior à ordenha (*predipping*), permite uma redução das infecções intra-mamárias por agentes ambientais, durante a lactação. A desinfecção dos tetos após a ordenha (*postdipping*), é a medida mais eficaz para a redução da contaminação entre animais, tendo um importante papel na prevenção de infecções por agentes contagiosos. O *backflush* é uma medida que consiste na lavagem automática das unidades de ordenha, com água e desinfetante, após cada utilização. A concretização desta medida visa diminuir a disseminação dos agentes contagiosos. A realização de uma correta terapia de secagem, influencia a prevalência de mastites no momento do parto, ao alcançar curas bacteriológicas de infecções presentes no momento da secagem. Além do mais, reduz a incidência de novos casos durante o período seco, altura em que o úbere está particularmente suscetível a novas infecções. Uma outra medida importante para a prevenção e controlo das mastites, essencialmente por agentes contagiosos, é a ordenha dos animais infetados em último lugar ou numa sala separada. As camas são uma fonte primária de agentes ambientais passíveis de infetar o úbere, devendo ser mantidas limpas e secas. O material a utilizar nas camas tem importância no que diz respeito à prevenção das mastites, devendo-se em geral optar por materiais secos, pois estão associados a um menor número de agentes patogénicos. A nutrição dos animais tem também um importante papel no que diz respeito à prevenção das mastites. Deficiências em vitaminas e minerais aumentam a suscetibilidade dos animais às infecções intra-mamárias. A vitamina A, E, os  $\beta$ -carotenos, o selénio e o cobre mostraram ter influência na resistência às mastites. Medidas de manejo alimentar são também relevantes, devendo ser fornecido alimento fresco após a ordenha. Isto porque nesta fase, o canal do teto permanece relaxado durante um certo período de tempo, pelo que há uma maior suscetibilidade à entrada de agentes patogénicos. Assim, o fornecimento de alimento fresco encoraja os animais a permanecerem de pé, diminuindo a exposição a agentes ambientais (Bramley *et al.*, 2003).

Com a implementação destas medidas, espera-se diminuir a prevalência das mastites e consequentemente melhorar a taxa de conceção e diminuir a mortalidade embrionária (Santos *et al.*, 2004).

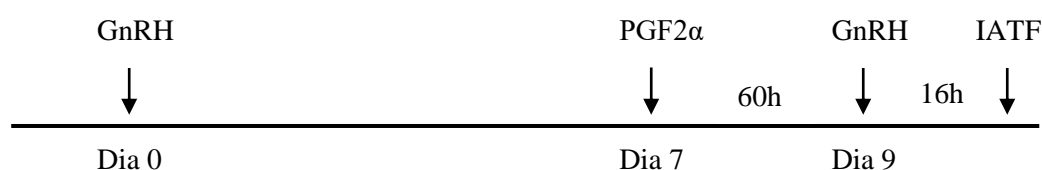
### **3.6.2. Prevenção do menor desempenho reprodutivo**

#### **a) Utilização de protocolos reprodutivos**

Lavon *et al.* (2016) estudaram estratégias de melhoria da fertilidade em animais com mastites. A primeira experiência realizada, teve como objetivo melhorar a taxa de conceção dos animais com infecções subclínicas, através do uso do protocolo de sincronização *ovsynch*. Este protocolo consiste na administração de uma injeção da GnRH no dia 0, seguida de uma injeção da PGF2 $\alpha$  7 dias depois

e uma última dose da GnRH passadas 60 horas. De seguida, é feita uma IA a tempo fixo, 16 horas após a última administração do protocolo (Figura 1). Tal como vimos anteriormente, as mastites subclínicas conduzem a um atraso na ovulação, devido ao baixo e tardio aparecimento pré-ovulatório da LH. A ovulação destes animais ocorre 56 horas após o cio, ao passo que nos animais saudáveis o intervalo entre o cio e a ovulação é de apenas 28 horas (Lavon *et al.*, 2011c). No seu estudo, Lavon *et al.* (2016) observaram que os animais com mastites subclínicas, sujeitos ao protocolo *ovsynch*, apresentam taxas de conceção semelhantes às dos animais saudáveis.

Figura 2: Representação esquemática do protocolo *ovsynch*.



Legenda: GnRH: Hormona libertadora de gonadotropina; PGF2α: Prostaglandina F2α; IATF: inseminação artificial a tempo fixo.

Tais resultados, provavelmente dever-se-ão à segunda dose da GnRH, que induz um normal aparecimento pré-ovulatório da LH, seguindo-se uma ovulação a tempo normal. No mesmo estudo, animais com patologias uterinas pós-parto (endometrite e retenção placentária), sujeitos ao mesmo protocolo, não apresentaram melhorias na taxa de conceção, o que sugere que os mecanismos pelos quais as mastites e as patologias uterinas afetam a reprodução são distintos. Assim, este protocolo deverá ser aplicado a grupos de animais sujeitos alterações patogénicas específicas, tais como as mastites subclínicas, constituindo nesse caso, uma interessante estratégia para a melhoria da fertilidade.

No segundo estudo realizado por Lavon *et al.* (2016), pretendeu-se avaliar o impacto da utilização de duas IAs nos animais sujeitos a mastites subclínicas, relativamente a uma só IA. A primeira (ou única) IA realizou-se 4 a 24 horas pós-cio, ao passo que a segunda, 28 a 44 horas após a primeira. Nesta experiência, a abordagem das duas IAs não obteve melhorias ao nível da fertilidade dos animais. Previa-se que a segunda IA iria de encontro à ovulação atrasada, característica dos animais com mastites subclínicas. No entanto, não foram registadas melhorias ao nível da eficiência reprodutiva destes animais.

#### b) Tratamento com anti-inflamatório não esteroide (AINES)

As mastites, tanto por agentes Gram-positivos como Gram-negativos, aumentam a concentração de IL-1 e TNF- $\alpha$  que, por sua vez, induzem a produção de cicloxigenase (COX) (Schmitz, Pfaffl, Meyer & Bruckmier, 2004). A COX é uma enzima que converte o ácido araquidônico em eicosanóides, tais como prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos. Estes atuam como mediadores inflamatórios. A COX tem duas isoformas: COX-1, é constitutiva, mantém a integridade da mucosa intestinal, ajuda na agregação plaquetária e melhora o fluxo sanguíneo renal; COX-2, é induzida após certos estímulos, como em resposta aos mediadores inflamatórios. Os AINES podem ser não seletivos, seletivos para COX-1 ou para COX-2 (McDougall *et al.*, 2016).

McDougall *et al.* (2016) estudaram o efeito do tratamento de mastites clínicas, com um AINES seletivo para COX-2 (meloxicam), na melhoria do desempenho reprodutivo de bovinos leiteiros. Para tal, analisaram-se 506 animais, de 61 explorações europeias. Realizaram-se dois grupos de estudo, sendo que no primeiro constavam os animais tratados com meloxicam e no segundo, que funcionou como grupo de controlo, os tratados com um placebo. Além deste tratamento, todos os animais receberam infusões intra-mamárias de antibiótico. Os animais que foram medicados com meloxicam, demonstraram, além de uma maior percentagem de cura bacteriológica, melhorias ao nível de alguns parâmetros reprodutivos, entre os quais uma maior probabilidade de concepção à primeira IA, menos serviços por concepção e maior número de vacas gestantes aos 120 dias em leite. Tal como foi visto anteriormente, as mastites têm um efeito a longo-prazo na dinâmica folicular. Assim, ao melhorar os efeitos iniciais das mastites, o meloxicam reduz também os efeitos que estas têm nos ciclos éstricos seguintes.

#### **4. Fatores confundidores na relação mastites-fertilidade**

Um dos grandes problemas no estudo da influência das mastites na reprodução, prende-se com a dificuldade em compreender alguns fatores que podem interferir com esta relação. O baixo desempenho reprodutivo dos bovinos leiteiros está relacionado com vários fatores, dentro dos quais se encontram as altas produções de leite e as mastites. Estudos anteriores, cujo objetivo consistiu em verificar a influência das mastites na reprodução, analisaram animais com diferentes níveis de produção e diferentes sistemas de manejo. Apesar da variabilidade das condições a que os animais estavam sujeitos, o impacto das mastites no desempenho reprodutivo de bovinos leiteiros mostrou ser significativo, independentemente das variáveis (Kumar *et al.*, 2017).

#### **4.1. Outras doenças**

Ahmadzadeh *et al.* (2009) estudaram o efeito das mastites clínicas no desempenho reprodutivo de vacas Holstein. Neste estudo, comparou-se a ocorrência de mastites por si só, ou acompanhadas de outras doenças tais como: quistos ováricos, retenção placentária, deslocamento do abomaso, cetose, hipocalcemia ou piómetra. Tanto os animais nos quais apenas se registou a ocorrência de mastites, como aqueles em que as mastites foram acompanhadas de outras doenças, verificou-se haver um pior desempenho reprodutivo. Este, traduziu-se num aumento do IPC e do número de serviços por concepção. Em ambos os grupos, observou-se haver um maior número de vacas que não ficaram gestantes até ao final do estudo, relativamente às do grupo de controlo. O efeito das mastites no desempenho reprodutivo dos animais, mostrou ser aditivo à ocorrência de outras doenças por si só. Tais resultados são fundamentados por estudos anteriores, nos quais animais com mastites clínicas registaram uma maior incidência de aborto e mortalidade embrionária (Santos *et al.*, 2004).

#### **4.2. Número de partos**

Nava-Trujillo *et al.* (2010) estudaram o impacto das mastites clínicas, no desempenho reprodutivo de vacas de dupla aptidão. Neste estudo, os animais com mastites clínicas apresentaram um maior número de dias ao primeiro serviço e IPC, relativamente aos que permaneceram saudáveis. A diferença mais significativa foi observada nos animais de primeira lactação. Neste grupo, o número de dias ao primeiro serviço e à concepção, aumentou independentemente do tempo de ocorrência das mastites. O mesmo não se verificou nos animais com mais de uma lactação. O autor refere que o número de multíparas utilizadas no estudo foi superior ao de primíparas, o que poderá explicar os resultados observados. Ainda assim, este estudo sugere que o efeito das mastites na reprodução é mais pronunciado na primeira lactação. Tais resultados poderão estar relacionados com características das vacas primíparas, que incluem maior balanço energético negativo (BEN) e perda de condição corporal, menor ingestão de matéria seca (Lucy *et al.*, 1992), menor concentração de glucose, insulina e do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1(IGF-1) (Taylor, Beever, Bryant & Wathes, 2003).

De acordo com estes resultados, estão Chegini *et al.* (2016) que analisaram os registos de uma exploração de vacas Holstein desde 2002 a 2014, estudando um total de 18.990 partos. Os resultados obtidos demonstraram que, dentro dos animais com mastites clínicas, a eficiência reprodutiva foi mais afetada nas primíparas do que nas multíparas. Esta conclusão foi retirada do facto de dentro dos animais com mastites clínicas, os de primeira lactação terem registado mais 49 dias de IPC e intervalo

entre partos, 19 dias ao primeiro serviço e 0,45 inseminações por concepção, do que os de duas ou mais lactações. Tais resultados sugerem que as primíparas necessitam de um maior período de tempo para recuperar após um episódio de mastites. Note-se que, apesar das mastites terem um maior impacto no desempenho dos bovinos leiteiros de primeira lactação, a sua incidência aumenta com o avanço das lactações. Segundo Ohtsuka *et al.* (2010) as vacas primíparas têm, no momento do parto, uma menor quantidade de células imunitárias na glândula mamária, embora tenham uma função celular imunitária mais elevada.

Contrariamente a estes resultados, no estudo de Ahmadzadeh *et al.* (2009) o número de serviços por concepção, IPC e número de dias ao primeiro serviço, não foram afetados pela paridade, nos animais com mastites clínicas.

### **4.3. Produção de leite**

Alguns autores observaram que animais com maiores produções de leite, têm um maior risco de contrair mastites (Windig, Calus & Veerkamp, 2005) e também uma menor fertilidade (Dobson *et al.*, 2007). Ao estudar a probabilidade de concepção dos animais com mastites subclínicas, Pinedo *et al.* (2004) verificaram que esta é 44% inferior, relativamente à registada pelos animais saudáveis. Este parâmetro mostrou ser ainda mais afetado nos animais que além de uma elevada CCS, registavam altas produções de leite. Estudos recentes demonstram que apesar desta relação, o impacto que as mastites têm no desempenho reprodutivo não é devido à produção de leite (Hudson, 2012).

### **4.4. Imunossupressão e balanço energético negativo**

Durante o período de transição, que ocorre 3 semanas antes e após o parto (Drackley, 1999), a vaca leiteira atravessa um grande desafio metabólico devido ao aumento das necessidades nutricionais para garantir a produção leiteira e à diminuição da ingestão de matéria seca (Drackley, 1999; Esposito, Irons, Webb & Chapwanya, 2013). Durante este período, a função imunitária está diminuída, havendo uma menor concentração das imunoglobulinas G e M (Herr, Bosted & Failing, 2011) e alteração da função neutrofílica (Rinaldi, Moroni, Paape & Bannerman, 2008) e linfocítica (Lacetera *et al.*, 2005). A menor competência imunitária do animal após o parto, aumenta a suscetibilidade para infeções, nomeadamente para as mastites (Leslie, Duffied, Schukken & LeBlanc, 2000; Trevisi, Amadori, Archetti, Lacetera & Bertoni, 2011).

O aumento da produção leiteira está relacionado com um incremento das necessidades energéticas por animal, que se elevam abruptamente após o parto, conduzindo à entrada numa fase de BEN. Assim, no início da lactação, a ingestão de matéria seca não satisfaz as necessidades energéticas da

vaca em produção, entrando em BEN poucos dias antes do parto e alcançando o nadir 2 semanas mais tarde (Butler, 2003).

A primeira ovulação ocorre, em média, 30 dias após o parto, sendo que este tempo é influenciado pelo BEN (Butler & Smith, 1998). Durante esta fase, aumentam as concentrações de ácidos gordos não esterificados (Butler, 2003; Fenwick *et al.*, 2008) e do ácido beta-hidroxibutírico (Leroy, Vanholder, Opsomer, Van Soom & de Kruif, 2006; Fenwick *et al.*, 2008), diminuem os níveis de insulina, de glucose (Butler, 2000) e do IGF-1 (Butler, 2000; Fenwick *et al.*, 2008). Os ácidos gordos não esterificados reduzem o desenvolvimento do oócito (Van Hoeck, Bols, Binelli & Leroy, 2014). O IGF-1, por sua vez, estimula o crescimento folicular e a produção de estradiol (Yoshimura *et al.*, 1996; Butler, 2003), pelo que quando há uma redução da sua concentração, verifica-se um comprometimento no desenvolvimento folicular e um atraso do tempo à primeira ovulação, consequente da diminuição da produção de estrogénios foliculares (Butler, 2000). A utilização de meios com elevadas concentrações de ácido beta-hidroxibutírico e baixas concentrações de glucose, para o crescimento de oócitos *in vitro*, teve efeitos adversos na sua maturação (Leroy *et al.*, 2006). Animais com BEN, veem suprimida a secreção pulsátil da LH e uma redução da resposta ovárica à mesma, o que por sua vez afeta o sucesso da ovulação (Butler & Smith, 1998; Butler, 2003). Assim, o aumento do período de défice energético, relaciona-se com um atraso na maturação dos folículos e no retorno ao ciclo éstrico (Butler, 2000), o que conduz a um menor desempenho reprodutivo (Roche, Macdonald, Burke, Lee & Berry, 2007).

O período de maior incidência de mastites ocorre durante o período seco e o início da lactação. Sepúlveda-Varas, Proudfoot, Weary e Keyserlingk (2016) estudaram alterações comportamentais em animais com mastites clínicas num quarto da glândula mamária, tendo registado uma menor ingestão de matéria seca, menor competitividade pelo alimento e menor consumo de matéria seca após a distribuição de alimento. Os parâmetros analisados voltaram ao normal após o tratamento da infeção. Assim, ao diminuírem a ingestão de matéria seca, as mastites agravam o BEN a que os animais estão sujeitos e consequentemente reduzem o seu desempenho reprodutivo (Abbeloos, n.d.). Esta situação pode explicar o atraso nos dias à primeira IA, observado nos animais cujas mastites ocorreram antes do primeiro serviço (Schrick *et al.*, 2001).

A imunossupressão aumenta a suscetibilidade para infeções, tais como as mastites e metrites (Trevisi *et al.*, 2011). As mastites, por sua vez, agravam o BEN pós-parto, que por si só está relacionado com uma diminuição da fertilidade (Butler, 2003). Assim, tendo em conta este conjunto de fatores, nem sempre é possível atribuir de forma completa e inequívoca um efeito, a uma causa metabólica ou infecciosa.

#### **IV. Objetivos**

O presente estudo teve como principal objetivo analisar a influência das mastites subclínicas no desempenho reprodutivo dos bovinos leiteiros. Pretendeu também averiguar a existência de uma relação entre a cronicidade dos episódios de mastites subclínicas e a eficiência reprodutiva. Através do acesso a uma base de dados de dimensão alargada, foi investigada a relação entre a contagem de células somáticas e o intervalo parto-concepção, em animais de 9 explorações leiteiras.

## V. Materiais e métodos

### 1. Amostragem

O presente estudo foi realizado com recurso à base de dados BOVINFOR 2016, na qual são compilados dados do contraste leiteiro bovino nacional. O contraste leiteiro é uma ferramenta de apoio à análise da qualidade do leite, registando informações relativas à quantidade de proteína, gordura e CCS de cada animal do efetivo de uma exploração, ao longo das sucessivas lactações (Pacheco, 2013).

A amostra utilizada foi selecionada pelo método de amostragem não aleatório intencional. Foram estudadas 9 explorações nacionais, pertencentes às regiões do Entre Douro e Minho, Beira Litoral e Alentejo, sendo que cada uma contribuiu para a base de dados com 3 vacarias, tendo sido selecionadas com base na sua dimensão. Os registos presentes na base de dados, continham informações relativas aos três primeiros partos, que por sua vez se encontravam divididas em duas categorias: dados reprodutivos (data de parto, data da última IA e respetivo número da lactação) e dados do contraste leiteiro (CCS e correspondente data de realização do contraste). No total foi analisado um intervalo de 20 anos, respeitante ao período compreendido entre 1996 e 2016.

O número de animais por lactação, existente em a cada uma das explorações analisadas, encontra-se apresentado na tabela 3. Importa ter em conta que, para a realização desta tabela, não foram considerados os limites das CCS, apenas os do IPC. Tais limites, que serão explicados em seguida nos pontos 1.1 e 1.2, têm que ver o facto de, no presente estudo, terem sido excluídos os animais cujo contraste leiteiro e/ou IPC não se enquadrasse dentro dos valores estabelecidos. No caso do contraste leiteiro, apenas se estudaram os registos com CCS entre 12.000 células/ml a 12.800.000 células/ml. Quanto ao IPC, foram incluídos no estudo todos os registos entre 35 dias a 700 dias. Uma vez filtrados os dados originais, foram estudadas 28.540 ocorrências, das quais 17.263 eram relativas ao primeiro IPC e 11.277 ao segundo.

Tabela 3: Número de animais por lactação, em cada uma das explorações estudadas.

Região	Exploração	Nº animais	
		1ª Lactação	2ª Lactação
A	1	4.722	2.751
	2	2.765	1.853
	3	3.485	2.548
B	4	1.214	754
	5	901	642
	6	999	568
C	7	1.659	1.087
	8	953	694
	9	1.029	633

### 1.1. Dados reprodutivos

Relativamente aos dados reprodutivos, a data da última IA não foi utilizada, visto que, nalguns casos, esta não estava correta. Tendo em conta que o período de gestação de uma vaca dura 278 a 293 dias (Hartigan, 2004), assumiu-se um tempo de gestação de 282 dias. Assim, através da data do último parto, estimou-se a data de conceção do segundo e terceiro parto:

$$\text{Data conceção} = \text{data último parto} - 282 \text{ dias}$$

O indicador reprodutivo utilizado para estudar a influência das mastites subclínicas no desempenho reprodutivo dos animais, foi o IPC:

$$\text{Intervalo parto-conceção} = \text{data conceção último parto} - \text{data parto anterior}$$

Este parâmetro corresponde ao período de tempo compreendido entre o parto e a nova conceção, tendo sido calculado para os dados relativos ao primeiro e segundo parto (figura 2).

Figura 3: Dados reprodutivos, originais e calculados, por animal (exemplo).



Legenda: IPC 1 e IPC 2: 1º e 2º intervalo parto-conceção, respetivamente.

Após o parto, a vaca necessita de algum tempo, até que se complete a involução uterina e possa ser novamente inseminada. O período voluntário de espera (PVE), corresponde à fase inicial da lactação, durante a qual a vaca não é inseminada, ainda que possa demonstrar sinais de cio. Assim, é-lhe permitida uma ótima involução uterina e recuperação da fase de BEN. A média do PVE situa-se entre os 50 e 60 dias pós-parto (Chebel, 2008). No presente estudo considerou-se um PVE de 35 dias, pelo que todos os animais cujo IPC fosse inferior a este valor, foram excluídos. De igual forma, foram eliminados todos os animais com IPC superior a 700 dias, visto que se assumiu que uma vaca que não fique gestante ao fim deste período, é eliminada por motivos reprodutivos.

A caracterização das explorações estudadas, relativamente ao primeiro e segundo IPC, registados desde 1996 a 2016, encontra-se apresentada na tabela 4. Para a sua realização, apenas se consideraram os limites relativos ao IPC.

Tabela 4: Média do primeiro e segundo intervalo parto-conceção, em cada exploração estudada.

Região	Exploração	Intervalo parto-conceção (dias)	
		1ª Lactação	2ª Lactação
A	1	151	151
	2	137	143
	3	127	134
B	4	153	158
	5	130	137
	6	154	155
C	7	153	148
	8	141	146
	9	127	131

## 1.2. Dados relativos ao contraste leiteiro

Relativamente aos dados do contraste leiteiro, eram conhecidas as CCS e a respetiva data de realização do contraste. As CCS foram convertidas em LS, através da fórmula abaixo apresentada:

$$Linear\ score = \log_2 (CCS \div 100.000) + 3$$

Quando a CCS duplica o seu valor, o LS aumenta um ponto (tabela 5). Assim, este valor pode ser utilizado para analisar a saúde do úbere, quer a nível individual, quer a nível da exploração. Além do mais, o LS é também utilizado para estudar a relação das células somáticas com a perda de produção de leite (Dairy Herd Improvement [DHI], n.d.) A probabilidade de infeção é inferior a 10% quando

o LS é inferior a 4, aumentando para mais de 90% quando o LS é superior a 5 (Peek, 2008). De modo a simplificar a análise dos resultados, os valores de LS foram agrupados em classes (tabela 6).

Tabela 5: Relação entre *linear score* e contagem de células somáticas (DHI, n.d., adaptado).

<i>Linear score</i>	Contagem de células somáticas (células/ml)
0	12.000
1	25.000
2	50.000
3	100.000
4	200.000
5	400.000
6	800.000

Tabela 6: Agrupamento dos valores de *linear score* em classes.

<i>Linear score (LS)</i>	Classe
$0 \geq LS \leq 4$	1
$4 > LS \leq 5$	2
$5 > LS \leq 6$	3
$6 > LS \leq 10$	4

A caracterização das explorações analisadas, relativamente aos registos obtidos nos contrastes leiteiros efetuados entre 1996 e 2016, encontra-se apresentada na tabela 7. Para a sua realização, apenas se consideraram os limites relativos à CCS.

Tabela 7: Média do *linear score* e classe de *linear score*, em cada exploração estudada.

Região	Exploração	<i>Linear score</i>	Classe <i>linear score</i>
A	1	2,5	1
	2	4,4	2
	3	2,7	1
B	4	3,0	1
	5	2,8	1
	6	3,6	1
C	7	2,9	1
	8	3,3	1
	9	2,9	1

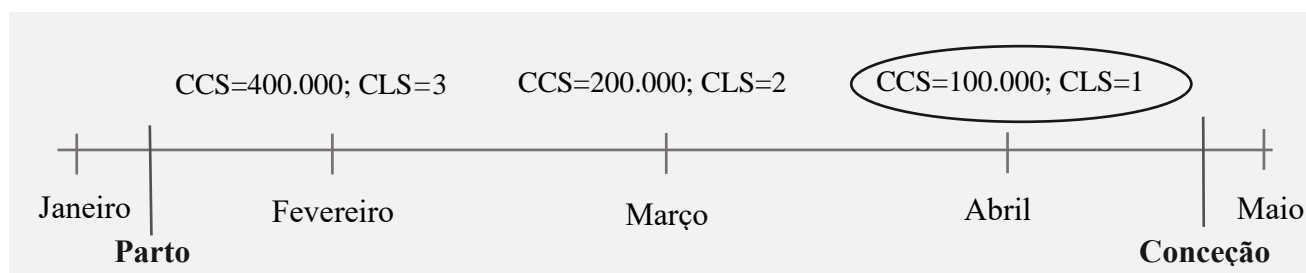
## 2. Processamento dos dados

Os dados utilizados no presente estudo, foram analisados com recurso ao modelo estatístico *HPMIXED Procedure*, do programa informático SAS. Este modelo foi desenhado para a análise estatística de problemas que envolvam um grande número de efeitos fixos, um grande número de efeitos variáveis ou um grande número de observações (SAS Institute Inc., 2008). Foi considerado existir significância estatística dos resultados quando  $p < 0,05$ .

## 3. Análise de Dados

Com o objetivo de analisar o impacto das mastites subclínicas no desempenho reprodutivo, foram estudados dois episódios distintos, que serão descritos em seguida. O primeiro, diz respeito à classe de LS obtida no contraste leiteiro realizado anteriormente à data de concepção (figura 3). Ao longo do trabalho, tal evento será descrito como “classe de *linear score* A”.

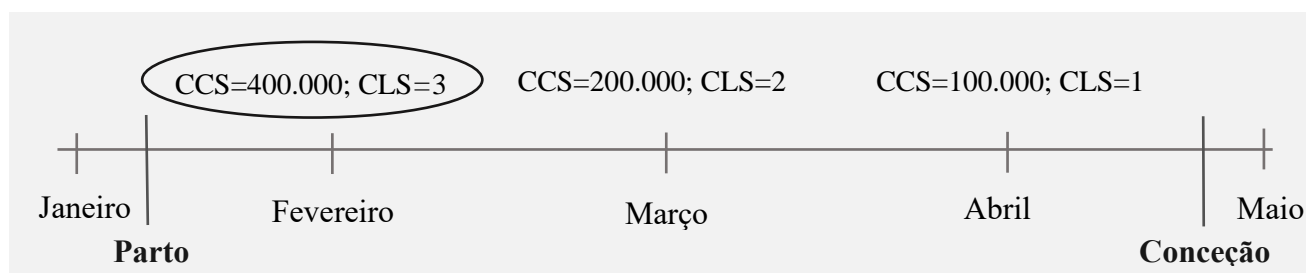
Figura 4: Contraste leiteiro anterior à data de concepção (classe *linear score* A).



Legenda: CCS: contagem de células somáticas; CLS: classe de *linear score*.

O segundo episódio analisado, é referente ao contraste leiteiro que obteve a maior classe de LS dos dias abertos (figura 4), que ao longo do trabalho será descrito como “Classe de *linear score* B”.

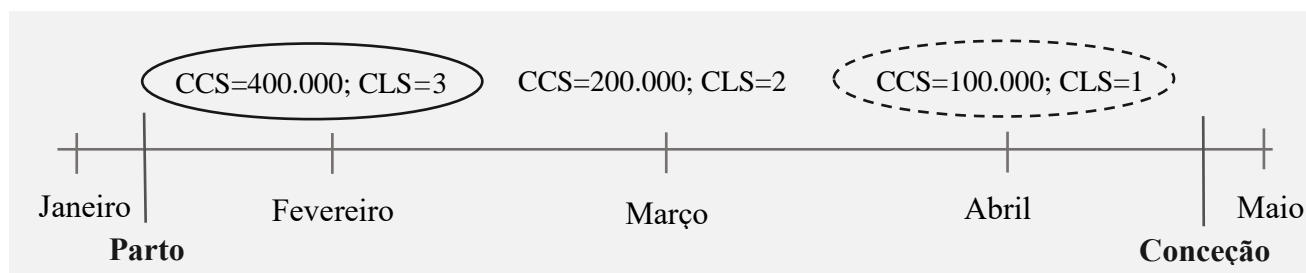
Figura 5: Contraste leiteiro anterior à data de concepção (classe *linear score* B).



Legenda: CCS: contagem de células somáticas; CLS: classe de *linear score*.

De modo a investigar a influência do LS no IPC, os dois eventos acima descritos foram estudados em conjunto. Assim, os dados relativos contraste leiteiro com a maior classe de LS dos dias abertos (classe de *linear score* B), foram agrupados de acordo com a classe de LS obtida no contraste leiteiro anterior à concepção (classe de *linear score* A) (figura 5). Posteriormente, foi analisada a relação entre a classe de LS obtida nos dois eventos e o IPC médio registado, tendo-se estudado os dados relativos ao primeiro e ao segundo IPC. Importa referir que, uma vez que os dois eventos foram analisados em conjunto, a sua interpretação deverá ser realizada simultaneamente.

Figura 6: Estudo do evento com a maior classe de *linear score* dos dias abertos (classe de *linear score* B) relativamente à classe de *linear score* anterior à concepção (classe de *linear score* A).



Legenda: CCS: contagem de células somáticas; CLS: classe de *linear score*.

De seguida, analisou-se para cada lactação, a distribuição dos animais em cada um dos eventos anteriormente descritos (classe de LS anterior à data de concepção e classe de LS mais alta dos dias abertos). Estudou-se também a dispersão do IPC, tendo-se determinado os seus valores extremos e médio para cada lactação. Foram calculadas duas medidas de dispersão relativas ao IPC, nomeadamente o desvio padrão e o coeficiente de variação.

Na segunda fase do estudo, investigou-se a influência da cronicidade da elevação da CCS, no IPC. Assim, analisou-se o número e a grandeza de episódios, dentro dos dias abertos, cuja classe de LS foi superior a 1 (CCS>200.000 células/ml; LS>4). Foi também investigada a evolução do IPC médio, à medida que aumentava o número de eventos com classe de LS superior a 1. Para tal, os animais foram agrupados em quatro grupos, de acordo com a classe de LS registada no evento anterior à concepção, tendo-se calculado, para cada grupo, o IPC médio à medida que aumentava o número de eventos com classe de LS superior a 1. Por fim, realizou-se uma análise de regressão linear, através da qual se estudou a relação entre o IPC e o número de episódios, dentro dos dias abertos, cuja classe de LS foi superior a 1. Foram analisados os dados da primeira e da segunda lactação.

## VI. Resultados

### 1. Impacto do episódio anterior à data de concepção e do episódio com o maior *linear score* dos dias abertos, no intervalo parto-concepção.

Na tabela 8 encontram-se apresentados os resultados obtidos relativamente à dispersão do IPC. Para a sua realização foram analisados todos os animais, independentemente dos registos das CCS. A média do IPC foi de 144 dias para os dados referentes à primeira lactação e de 146 dias para a segunda.

Tabela 8: Dispersão do intervalo parto-concepção na primeira e segunda lactação.

Lactação	Variável	Mín (dias)	Máx (dias)	Média (dias)	DP (dias)	CV (%)
1 <sup>a</sup>	IPC	35	678	144	96	66
2 <sup>a</sup>	IPC	35	697	146	91	63

Legenda: IPC: intervalo parto-concepção; DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

As tabelas 9 e 10 representam a influência da classe de LS registada anteriormente à data de concepção (classe de *linear score* A) e da classe de LS mais elevada dos dias abertos (classe de *linear score* B), no IPC. A tabela 9, diz respeito aos dados da primeira lactação, na qual foram analisados 17.263 animais e a tabela 10 é relativa à segunda lactação, na qual foram analisadas 11.277 vacas leiteiras. Os animais nos quais os dois eventos analisados têm classe de LS igual a 1, ao terem as CCS inferiores a 200.000 células/ml, são considerados saudáveis. Estes animais, obtiveram um IPC médio de 117 dias na primeira lactação e de 136 dias na segunda. Uma vez que os dois eventos foram analisados de forma dependente, as colunas “classe *linear score* A” e “classe *linear score* B” deverão ser lidas em conjunto.

Os resultados obtidos nas tabelas 9 e 10, apontam para a existência de uma relação positiva entre o LS e o IPC. Comparando o IPC, quando a classe de LS é igual nos dois eventos estudados, com o aumento do LS, verifica-se um aumento do IPC. O mesmo ocorre quando a classe de LS do evento anterior à concepção se mantém constante e aumenta a classe de LS do evento mais alto dos dias abertos. Em ambos os casos, os valores encontrados foram estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ).

Tabela 9: Impacto do *linear score* anterior à data de concepção e do maior *linear score* dos dias abertos, no intervalo parto-concepção, para a primeira lactação.

<b>1ª Lactação</b>				
<b>Classe <i>linear score</i> A</b>	<b>Classe <i>linear score</i> B</b>	<b>IPC (dias)</b>	<b>p value</b>	
1	1	117	<0,0001	
1	2	162	<0,0001	
1	3	178	<0,0001	
1	4	179	<0,0001	
2	2	130	<0,0001	
2	3	189	<0,0001	
2	4	190	<0,0001	
3	3	136	<0,0001	
3	4	195	<0,0001	
4	4	150	<0,0001	

Legenda: IPC: intervalo parto-concepção; A: episódio CCS anterior à data de concepção; B: episódio mais alto de CCS nos dias abertos.

Tabela 10: Impacto do *linear score* imediatamente anterior à data de concepção e do maior *linear score* dos dias abertos, no intervalo parto-concepção, para a segunda lactação.

<b>2ª Lactação</b>				
<b>Classe <i>linear score</i> A</b>	<b>Classe <i>linear score</i> B</b>	<b>IPC (dias)</b>	<b>p value</b>	
1	1	136	<0,0001	
1	2	185	<0,0001	
1	3	195	<0,0001	
1	4	203	<0,0001	
2	2	154	<0,0001	
2	3	197	<0,0001	
2	4	215	<0,0001	
3	3	156	<0,0001	
3	4	204	<0,0001	
4	4	172	<0,0001	

Legenda: IPC: intervalo parto-concepção; A: episódio CCS anterior à data de concepção; B: episódio mais alto de CCS nos dias abertos.

A tabela 11 apresenta uma análise comparativa, relativa aos resultados apresentados nas tabelas 9 e 10. Também neste caso, as colunas “classe *linear score* A” e “classe *linear score* B” deverão ser lidas

em conjunto. Os resultados obtidos, demonstram que o aumento do IPC associado ao aumento da classe de LS, é constante nas duas lactações e mais pronunciado na segunda. O diferencial entre a primeira e a segunda lactação, encontra-se expresso na coluna “ $\Delta$  lactações”.

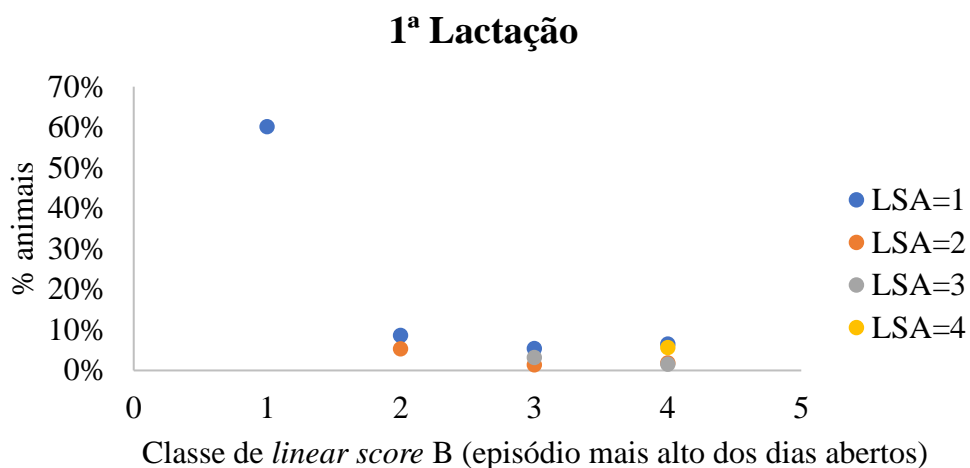
Tabela 11: Comparação dos resultados obtidos para a primeira e segunda lactação.

Classe <i>linear score</i> A	Classe <i>linear score</i> B	Intervalo parto-concepção (dias)		
		1 <sup>a</sup> lactação	2 <sup>a</sup> lactação	$\Delta$ lactações
1	1	117	136	+19
1	2	162	185	+23
1	3	178	195	+17
1	4	179	203	+24
2	2	130	154	+26
2	3	189	197	+8
2	4	190	215	+25
3	3	136	156	+20
3	4	195	204	+9
4	4	150	172	+22

Legenda: A: episódio CCS anterior à data de concepção; B: episódio mais alto de CCS nos dias abertos.

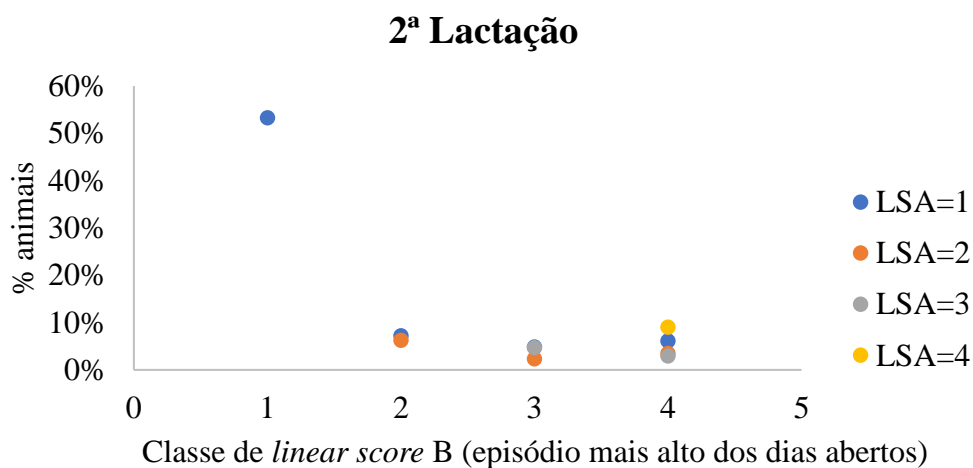
A distribuição dos animais por classes de LS, em cada um dos eventos analisados, encontra-se representada nos gráficos 2, 3 e 4, dependendo da lactação em questão. Os resultados demonstram que a maioria das vacas analisadas (60% na 1<sup>a</sup> lactação e 53% na segunda) se encontravam saudáveis. Assim sendo, a percentagem de animais que registaram pelo menos um evento com classe de LS superior a 1, foi de 40% para os animais da primeira lactação e de 47% para os da segunda. Neste caso, os valores percentuais variaram entre 1% e 10%, dependendo das classes de LS obtidas.

Figura 7. Distribuição dos animais da primeira lactação, por classe de linear score em cada um dos eventos analisados.



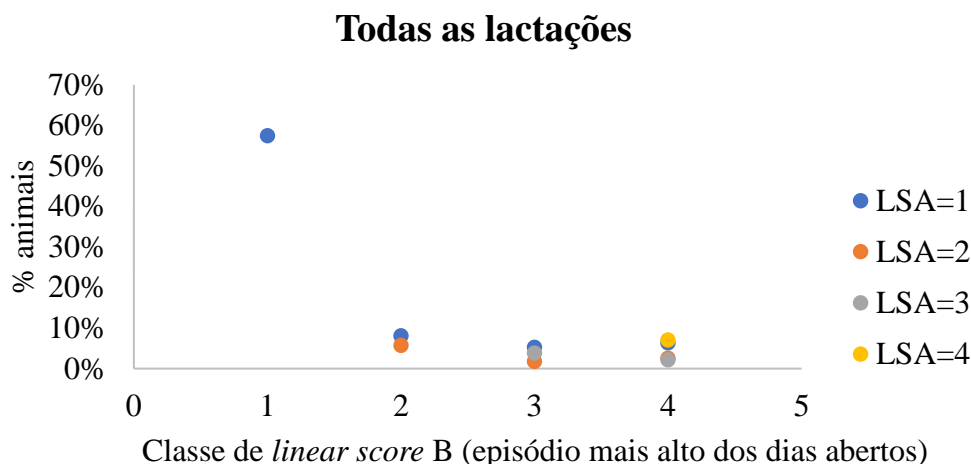
Legenda: LSA: classe de *linear score* A, correspondente ao episódio anterior à concepção.

Figura 8. Distribuição dos animais da segunda lactação, por classe de linear score em cada um dos eventos analisados.



Legenda: LSA: classe de *linear score* A, correspondente ao episódio anterior à concepção.

Figura 9. Distribuição dos animais analisados, por classe de linear score em cada um dos eventos analisados.



Legenda: LSA: classe de *linear score* A, correspondente ao episódio anterior à concepção

## 2. Impacto da cronicidade dos eventos no intervalo parto-concepção

Um dos objetivos do presente estudo, consistiu na avaliação do impacto da cronicidade das mastites subclínicas no IPC. Nesta fase do trabalho, apenas foram analisados os animais que registaram pelo menos um episódio com classe de LS superior a 1. O número e a grandeza destes eventos, relativos a todos os animais presentes no estudo, encontra-se apresentado na tabela 12.

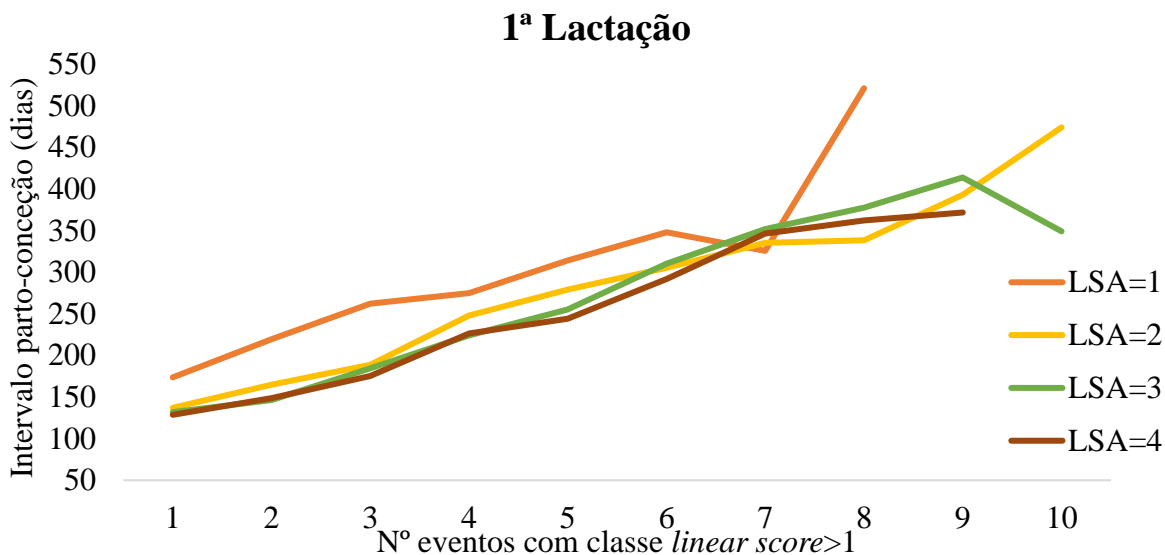
Tabela 12: Valores extremo e médio de eventos com classe de *linear score* superior a 1, por animal.

Nº animais	Nº eventos (classe <i>linear score</i> > 1)		
	Mínimo	Médio	Máximo
28.540	0	0,9	10

A evolução do IPC, à medida que aumenta o número de eventos com classe de LS superior a 1, está demonstrada nos gráficos 5 e 6, dependendo da lactação em questão. Os animais foram agrupados em quatro grupos, de acordo com a classe de LS anterior à concepção, tendo-se investigado para cada grupo a evolução do IPC médio, à medida que aumenta o número de eventos com classe de LS superior a 1. Os resultados demonstraram-se estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ), apontando para a existência de uma relação positiva entre a evolução do número de eventos e o aumento do IPC. Tal relação, parece ser independente da classe de LS registada no evento anterior à concepção. Nos dois gráficos, em geral, o maior IPC é registado nos casos em que a classe de LS do evento anterior à

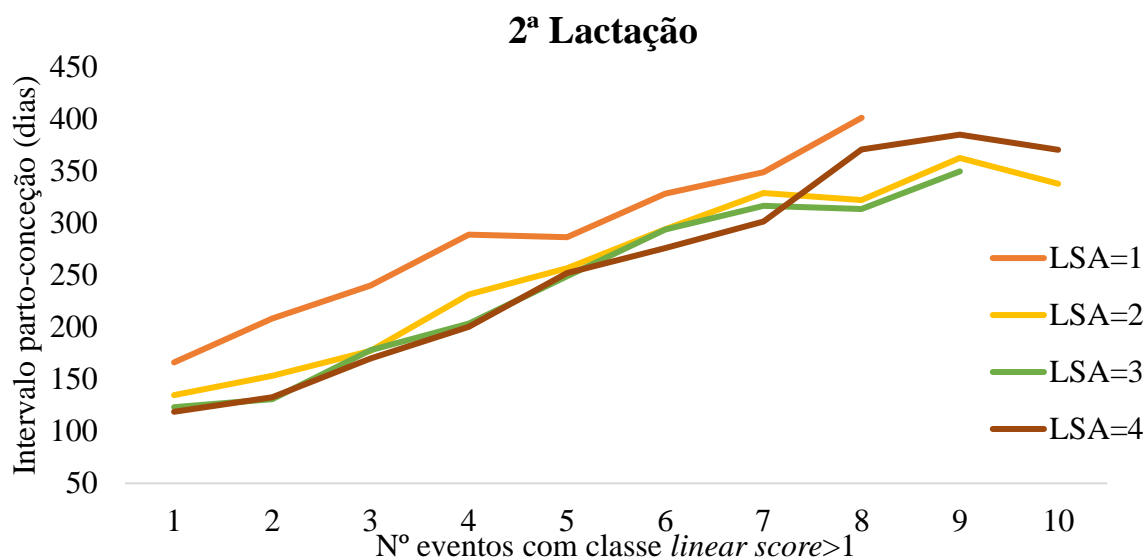
conceção foi igual a 1, o que está representado pela linha cor-de-laranja. Em alguns pontos, o aumento do número de eventos, não acompanha o aumento do IPC.

Figura 10. Evolução do intervalo parto-conceção para a primeira lactação, de acordo com o número de eventos cujo *linear score* é superior à classe 1.



Legenda: LSA: classe de *linear score* A, correspondente ao episódio anterior à concepção.

Figura 11. Evolução do intervalo parto-conceção para a segunda lactação, de acordo com o número de eventos cujo *linear score* é superior à classe 1.



Legenda: LSA: classe de *linear score* A, correspondente ao episódio anterior à concepção.

Com o objetivo de investigar qual o aumento do IPC, por cada incremento no número de eventos com LS de classe superior a 1, foi realizado um estudo de regressão linear. Este é utilizado para as situações nas quais se supõe uma relação causa-efeito (Callegari-Jacques, 2005). A equação de regressão obtida para os dados da primeira lactação, foi:

$$\text{Intervalo parto-conceção} = 130,52 + 28,7370 * \text{n}^\circ \text{ eventos com classe de } \textit{linear score} > 1$$

Relativamente à segunda lactação, obteve-se a seguinte equação de regressão linear:

$$\text{Intervalo parto-conceção} = 129,98 + 27,9284 * \text{n}^\circ \text{ eventos com classe de } \textit{linear score} > 1$$

Os valores relativos à ordenada na origem (130,52 na primeira lactação e 129,98 na segunda lactação) e ao declive (28,7370 na primeira lactação e 27,9284 na segunda lactação) foram estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ). O declive obtido representa o aumento do IPC quando o número de eventos analisados aumenta uma vez.

As estatísticas descritivas para as duas variáveis estudadas, IPC e número de eventos, encontram-se apresentadas na tabela 13. Na primeira e na segunda lactação foram analisados, respetivamente, 6.873 e 5.266 animais. Tais valores são relativos aos animais que registaram pelo menos um contraste leiteiro com classe de LS superior a 1.

Tabela 13: Dispersão das variáveis relativas ao estudo de regressão linear.

Lactação	Variável	Mín (dias)	Máx (dias)	Média (dias)	DP (dias)	CV (%)
1 <sup>a</sup>	IPC	35	678	169	104	61
	Nº eventos CLS>1	1	10	1,9	1,4	74
2 <sup>a</sup>	IPC	35	668	169	98	59
	Nº eventos CLS>1	1	10	2,3	1,7	73

Legenda: CLS: classe de *linear score*; IPC: intervalo parto-conceção; DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

## VII. Discussão

### 1. Discussão dos resultados

#### 1.1. Impacto do episódio imediatamente anterior à data de concepção e do episódio com maior *linear score* dos dias abertos, no intervalo parto-concepção

Os resultados obtidos, apontam para a existência de uma relação positiva entre o *linear score* e o intervalo parto-concepção, nas duas lactações estudadas. De facto, quando a classe de *linear score* A (evento anterior à concepção) e B (evento com o maior LS dos dias abertos) foram iguais, o seu aumento mostrou ser acompanhado pelo aumento do IPC. O mesmo foi observado nos casos em que a classe de LS anterior à concepção (classe de *linear score* A) se manteve constante e aumentou a classe do evento com o maior LS dos dias abertos (classe de *linear score* B). Tais resultados vão de encontro aos reportados por estudos anteriores, nos quais se observou um aumento do IPC em animais com mastites clínicas (Barker *et al.*, 1998; Ahmadzadeh *et al.*, 2009; Nava-Trujillo *et al.*, 2010; Gunay & Gunay, 2010; Chegini *et al.*, 2016) e subclínicas (Pinedo *et al.*, 2009). No presente estudo o desempenho reprodutivo foi avaliado através do IPC. No entanto, autores anteriores verificaram haver alteração de outros parâmetros reprodutivos, descritos na tabela 2, tanto nos animais com mastites clínicas (Barker *et al.*, 1998; Schrick *et al.*, 2001; Chebel *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2004; Ahmadzadeh *et al.*, 2009; Nava-Trujillo *et al.*, 2010; Gunay & Gunay, 2010; Lavon *et al.*, 2011a; Fuenzalida *et al.*, 2015; Chegini *et al.*, 2016) como subclínicas (Pinedo *et al.*, 2009; Schrick *et al.*, 2011; Lavon *et al.*, 2011a; Fuenzalida *et al.*, 2015).

Os dois episódios analisados, LS anterior à concepção e maior LS dos dias abertos, mostraram ter influência no IPC, o que pode ser explicado pelo efeito imediato e a longo-prazo das mastites subclínicas na função folicular (Lavon *et al.*, 2011b; Furman *et al.*, 2014).

Os animais da segunda lactação, em geral, sofreram um aumento mais pronunciado do IPC, resultados que não estão em conformidade com a bibliografia relativa a este tema. De facto, autores anteriores reportaram haver uma maior influência das mastites no desempenho reprodutivo dos bovinos leiteiros da primeira lactação (Nava-Trujillo *et al.*, 2010; Chegini *et al.*, 2016) e outros, não observaram haver efeito da paridade na relação mastites-fertilidade (Ahmadzadeh *et al.*, 2009; Lavon *et al.*, 2011a).

O maior impacto das mastites subclínicas na eficiência reprodutiva dos animais da segunda lactação, observado no presente estudo, poderá estar relacionado com o facto de, dentro dos animais saudáveis, o IPC médio das múltiparas (136 dias), ter sido superior ao registado pelas primíparas (117 dias). Tais

resultados, são consistentes com os publicados por Coleman, Thayne & Dailey (1985), Balendran *et al.* (2008) e Lavon *et al.* (2011a) ao constatarem que dentro das vacas saudáveis, as multíparas apresentam piores indicadores reprodutivos. Os dados apresentados na tabela 4, na qual estão expostas as médias do IPC por exploração, permitem também observar que, em geral, o IPC aumenta na segunda lactação, ainda que neste caso estejam contemplados todos os animais, independentemente dos registos das CCS.

Nakov, Hristov, Andorov & Trajchov (2014) e Chegini *et al.* (2016) reportaram que a probabilidade de contrair mastites é inferior nas primíparas, aumentando sucessivamente à medida que avança o número da lactação. Tais resultados poderão também estar relacionados com o menor desempenho reprodutivo observado nas mastites subclínicas da segunda lactação. De facto, no presente estudo, a média de eventos com classe de LS superior a 1, registada na primeira lactação (1,9 eventos) foi inferior à da segunda lactação (2,3 eventos). Além do mais, a percentagem de animais com pelo menos um episódio com classe de LS superior a 1 foi superior nas multíparas (47%), relativamente às primíparas (40%).

Deste modo, os piores indicadores reprodutivos observados nos animais saudáveis da segunda lactação e a maior incidência de mastites registada nas vacas multíparas, poderão explicar o maior aumento do IPC observado nos animais com mastites subclínicas da segunda lactação. Tendo em conta que neste trabalho, as vacas multíparas apenas foram representadas pelos animais da segunda lactação, seria pertinente a observação de um número mais alargado de lactações para estudar o efeito da paridade na relação mastites-fertilidade. Tal não foi possível, devido às limitações relacionadas com o facto do presente estudo consistir na análise de uma base de dados, dependendo desta forma dos registos presentes na mesma.

O período de tempo analisado no presente estudo foram os dias abertos, ou seja, contagens de células somáticas anteriores à concepção. Os resultados obtidos, indicam a existência de uma relação positiva entre a ocorrência de mastites subclínicas neste período de tempo e o aumento do IPC. Estudos anteriores, reportaram igualmente um aumento do IPC (Barker *et al.*, 1998; Nava-Trujillo *et al.*, 2010) e pior desempenho de outros indicadores reprodutivos (Schrick *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2004), em animais com mastites anteriores à IA. Tais resultados são fundamentados pelo menor nível de esteroides foliculares (Lavon *et al.*, 2011c; Furman *et al.*, 2014) e menor crescimento folicular (Rahman *et al.*, 2012; Furman *et al.*, 2014), reportados em animais com mastites subclínicas.

A percentagem de animais analisados com pelo menos um evento com classe de LS superior a 1, limite a partir do qual é provável a existência de infeção, foi de 43%. Este valor encontra-se dentro

da prevalência de 20% a 50% referida por Lavon *et al.* (2011c) para as mastites subclínicas nos países desenvolvidos.

O IPC médio registado por todos os animais presentes no estudo, foi de 144 dias para a 1ª lactação e 146 dias para a segunda. Assumindo um tempo de gestação médio de 282 dias, o IPC obtido corresponde a um intervalo entre partos de, aproximadamente, 427 dias. Tais valores, encontram-se acima do objetivo de 85 a 95 dias para o IPC, de forma a ser alcançado um intervalo entre partos ótimo de 1 ano, mas estão enquadrados com o IPC médio de 85 a 150 dias descrito por AHDB (2012), relativamente às explorações do Reino Unido. Também as médias do IPC por exploração se encontram, em geral, dentro destes valores, tendo em alguns casos sido até 8 dias superiores. Uma vez que, os valores médios do IPC observados no presente estudo, se enquadram no IPC médio registado por outros autores, os resultados obtidos relativamente à relação mastites-fertilidade em princípio não terão sido influenciados por explorações com baixo desempenho reprodutivo. Tendo em conta que, o número de animais analisado por exploração apresentou uma grande variabilidade (tabela 3), seria interessante o cálculo do IPC médio de todos os animais através de uma média ponderada, de maneira a que cada exploração contribuísse para a média total de acordo com o número de animais presente.

O coeficiente de variação e o desvio padrão obtidos, tanto para todos os animais analisados como para aqueles que registaram pelo menos um episódio com classe de LS superior a 1, foi elevado, o que demonstra uma elevada variabilidade dos dados relativamente à média (Callegari-Jacques, 2005).

## **1.2. Impacto da cronicidade dos eventos no intervalo parto-concepção**

A média do IPC dos animais que registaram pelo menos um evento com classe de LS superior a 1 (169 dias para ambas as lactações), foi superior à média do IPC obtida por todos os animais presentes no estudo (144 dias para a primeira lactação e 146 dias para a segunda). Deste modo, ao juntar os animais saudáveis àqueles que registaram pelo menos uma CCS acima do limiar infeção, a média do IPC diminui, o que evidencia o impacto das mastites subclínicas no IPC. De acordo com estes resultados, estão Lavon *et al.* (2011a) ao constatarem que os animais com LS superior a 4,5 registaram uma diminuição de aproximadamente 14% na probabilidade de concepção.

Ao observar os resultados obtidos nos gráficos 5 e 6 é perceptível que, em geral, à medida que aumenta o número de eventos com classe de LS superior a 1, aumenta a média do IPC. Tal evidência, aponta para a existência de uma relação entre a cronicidade dos eventos e o desempenho reprodutivo dos animais, sendo este tanto pior, quanto maior o número de eventos com classe de LS superior a 1. A existência de uma relação entre a cronicidade dos episódios e a fertilidade, é reforçada pelo estudo de

regressão linear, no qual se obteve um declive da equação positivo para ambas as lactações, indicando que à medida que aumenta o número de eventos cujo LS é superior ao limiar de infeção, aumenta o IPC. De cada vez que ocorreu mais um episódio com classe de LS superior a 1, o IPC aumentou 28,7 dias nos animais a primeira lactação e 27,9 dias na segunda. De maneira a estimar qual a percentagem do IPC que é explicada pelo número de eventos com classe de LS superior a 1, teria sido interessante o cálculo do coeficiente de determinação, parâmetro que informa qual a percentagem da variabilidade de uma característica que é estatisticamente explicada pela outra variável (Callegari-Jacques, 2005).

Os resultados do presente estudo, relativamente à relação entre a cronicidade dos episódios e a fertilidade, vão de encontro aos encontrados por Moussavi, Mesgoran e Gilbert (2012), que reportaram haver um maior impacto em alguns parâmetros reprodutivos à medida que aumenta o número de episódios de mastites. Tendo em conta o impacto das infeções subclínicas nos níveis de esteroides foliculares (Lavon *et al.*, 2011c; Furman *et al.*, 2014), no crescimento folicular (Rahman *et al.*, 2012; Furman *et al.*, 2014) e o seu efeito a curto e a longo-prazo na função folicular (Lavon *et al.*, 2011c; Furman *et al.*, 2014), faz sentido que o aumento do número de eventos seja refletido num pior desempenho reprodutivo. Para além do estudo de Moussavi *et al.* (2012), não foram encontrados outros relativos a este tema, pelo que parece pertinente a elaboração de trabalhos futuros sobre esta hipótese.

Importa ter em conta a possibilidade da existência de um efeito circular na relação entre a cronicidade dos episódios e a fertilidade. Os resultados obtidos indicam que, à medida que aumenta o número de eventos com classe de LS superior a 1, aumenta o IPC. No entanto, tendo em conta que o contraste leiteiro se realiza uma vez por mês, o facto de aumentar o número de episódios, implica necessariamente o aumento do IPC. O mesmo ocorre quando aumenta o IPC, havendo inevitavelmente um maior número de contrastes realizados, e por isso uma maior probabilidade de aumentar o número de eventos com classe de LS superior a 1. Deste modo, a solução para combater este efeito passaria por fixar o número de contrastes analisados para todos os animais. Assim, seria possível investigar se o aumento no número de eventos com classe de LS superior a 1 conduz, de facto, a um aumento do IPC.

Em geral, nas duas lactações estudadas, o maior IPC foi registado nos casos em que a classe de LS do evento anterior à conceção foi igual a 1. Assim sendo, o episódio que mais influência tem na relação mastites-fertilidade não parece ser o imediatamente anterior à data de conceção, mas sim o historial de eventos que ocorrem ao longo dos dias abertos. Tal situação, pode ser explicada pelo efeito das mastites subclínicas a curto e a longo-prazo na função folicular, reportado por Lavon *et al.* (2011c) e Furman *et al.* (2014). No entanto, é importante considerar que, caso o episódio anterior à

concepção (classe *linear score* A), fosse simultaneamente o evento com o maior LS dos dias abertos (classe *linear score* B), poderia ocorrer uma diminuição da taxa de concepção consequente da menor concentração de hormonas esteroides, observada em animais com mastites subclínicas (Lavon *et al.*, 2011c; Furman *et al.*, 2014). Assim, ao ver-se afetada a taxa de concepção, haveria um aumento dos dias abertos e, conseqüentemente, o evento anteriormente descrito como anterior à concepção seria substituído pelos registos obtidos nos contrastes leiteiros seguintes.

## **2. Discussão dos materiais e métodos**

No presente estudo foram estudadas 9 explorações nacionais de três regiões distintas, o que contribuiu para a diluição de efeitos que poderiam ter influência nos resultados, tais como o manejo e a alimentação. As explorações foram selecionadas pelo tamanho, pretendendo-se estudar um número alargado de animais de modo a aumentar a precisão dos resultados (Graça Martins, 2009). Em trabalhos futuros, sugere-se a seleção de um método de amostragem aleatório que seja representativo da população. Assim, evitar-se-á o enviesamento que ocorre quando se utilizam critérios subjetivos para a seleção de amostras não aleatórias.

Ao consistir no estudo de uma base de dados, as análises realizadas ao longo do trabalho dependiam dos registos presentes na mesma. Assim sendo, não foi possível investigar um número mais alargado de lactações, bem como a analisar outros indicadores reprodutivos, para além do IPC.

Os dados apresentados na tabela 7, demonstram que a média da classe de *linear score*, registada nos contrastes leiteiros realizados entre 1996 e 2016, foi igual a 1 em todas as explorações estudadas, à exceção de uma, que obteve classe de LS igual a 2. Uma vez que a média da classe de LS desta exploração foi superior às demais, os seus dados poderão ter tido uma maior influência nos resultados obtidos. No entanto, a média do IPC registada pela mesma exploração, não se demonstrou mais elevada, quando comparada com as restantes.

Para a determinação do IPC, foi necessário estimar a data de concepção, tendo-se determinado um tempo de gestação de 282 dias. No entanto, na maioria dos casos, este não será exatamente correspondente ao tempo de gestação verificado, pelo que seria interessante a utilização da data de IA real, de modo a alcançar uma maior precisão dos resultados. O indicador reprodutivo utilizado (IPC) foi limitado no seu valor mínimo aos 35 dias, valor relacionado com o PVE. Em trabalhos futuros, seria interessante a utilização de um PVE mais adequado ao referenciado pela bibliografia.

O presente estudo, ao consistir na análise de uma base de dados já existente, carece de uma validação dos registos presentes na mesma.

### **3. Considerações finais**

Os resultados obtidos apontam a existência de uma relação entre as mastites subclínicas e o desempenho reprodutivo dos bovinos leiteiros. Autores anteriores observaram um menor impacto das mastites clínicas na fertilidade, associado ao tratamento dos animais afetados com anti-inflamatórios não esteroides seletivos para COX-2 (McDougall *et al.*, 2016). Outros autores demonstraram que a utilização de protocolos de sincronização reprodutiva em animais com mastites subclínicas conduz a melhorias na fertilidade (Lavon *et al.*, 2016). Deste modo, a implementação destas práticas nas mastites subclínicas, poderá ser uma estratégia interessante para diminuir a influência que estas têm na eficiência reprodutiva dos bovinos leiteiros.

## VIII. Conclusão

O presente estudo teve como principal objetivo investigar a existência de uma relação causal entre as mastites subclínicas e o desempenho reprodutivo dos bovinos leiteiros. Os resultados obtidos, indicam a existência de uma relação positiva entre a contagem de células somáticas e o intervalo parto-concepção, o que é consistente com a bibliografia publicada até à data.

A influência da cronicidade dos episódios de mastites subclínicas na eficiência reprodutiva foi também um tema explorado. Os resultados obtidos, apontam para a existência de um impacto da cronicidade dos episódios na fertilidade, sendo que quanto maior o número de contagens de células somáticas acima das 200.000 células/ml registadas, maior o intervalo parto-concepção, o que está de acordo com a bibliografia publicada até à data.

A relação mastites-fertilidade é um tema importante e com implicações práticas no dia-a-dia de uma exploração de bovinos leiteiros. As mastites, por si só, têm um impacto económico elevado numa vacaria, que por sua vez se vê aumentado quando se tem em conta a consequente diminuição do desempenho reprodutivo, devido às mastites. A consciencialização deste problema por parte dos produtores, poderá reforçar a importância das medidas preventivas para as mastites, resultando num maior empenho e dedicação na sua implementação. Além do mais, a compreensão dos mecanismos pelos quais as mastites diminuem a fertilidade poderá auxiliar na elaboração de estratégias que visem a diminuição deste impacto.

## IX. Bibliografía

- Abbeeloos E. (n.d.). Mastitis y baja fertilidad. Mecanismos que explican esta relación. Mastitis y Fertilidad, 4ª Parte.
- Agriculture and Horticulture Development Board. (2012). *Improvement Through Fertility: defining your terms*. Warwickshire: AHDB, acedido em Dez. 12, 2017, disponível em, <https://dairy.ahdb.org.uk/resources-library/technical-information/fertility/pdplus-section-2-defining-your-terms/#.WlzBWqhl IW>
- Ahmad N., Schrick F.N., Butcher R.L., Inskoop E.K. (1995). Effect of Persistent Follicles on Early Embryonic Losses in Beef Cows. *Biology of Reproduction*, 52, 1129-1135.
- Ahmadzadeh A., Frago F., Shafii B., Dalton J.C., Price W.J., McGuire M.A. (2009). Effect of clinical mastitis and other diseases on reproductive performance of Holstein cows. *Animal Reproduction Science*, 112, 273-282.
- Analkip M.E., Quintela-Baluja M., Böhme K., Fernández-No I., Caamaño-Antelo S., Calo-Mata P., Barros-Velásquez J. (2014). The Immunology of Mammary Gland of Dairy Ruminants between Healthy and Inflammatory Conditions. *Journal of Veterinary Medicine*, 1-31.
- Austin E.J., Mihm M., Ryan M.P., Williams D.H., Roche J.F. (1999). Effect of Duration of Dominance of the Ovulatory Follicle on Onset of Estrus and Fertility in Heifers. *Journal of Animal Science*, 77, 2219-2226.
- Balendran A., Gordon M., Pretheeban T., Singh R., Perera R., Rajamahedran R. (2008). Decreased fertility with increasing parity in lactating dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science*, 425 – 428.
- Baratta, Basini, Bussolati, Tamanini. (1996). Effects of interleukin-1b fragment (163–171) on progesterone and estradiol-17b release by bovine granulosa cells from different size follicles. *Regulatory peptides*, 67, 187-194.
- Barker A.R., Schrick F.N., Lewis M.J., Dowlen H.H., Oliver S.P. (1998). Influence of Clinical Mastitis During Early Lactation on Reproductive Performance of Jersey Cows. *Journal of Dairy Science*, 81, 1285-1290.
- Bradley A. J. (2002). Bovine Mastitis: An Evolving Disease. *The veterinary journal*, 164, 116-128.
- Bradley A., Green M. (2005). Use and interpretation of somatic cell count data in dairy cows. *Farm Animal Practice*, 27, 310-315.
- Bradley A.J., Leach K.A., Breen J.E., Green L.E., Green M.J. (2007). Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *Veterinary Record*, 160, 253-258.
- Bramley A. J., Cullor J.S., Erskine R.J., Fox L.K., Harmon R.J., Hogan J.S., Nickerson S.C., Oliver S.P., Smith K.L., Sordillo L.M. (2003). *Current Concepts of Bovine Mastitis*. (4<sup>th</sup> ed.). Madison: National Mastitis Council.
- Breen K.M., Billings H.J., Wagenmaker E.R., Wessinger E.W., Karsch F.J. (2005). Endocrine Basis for Disruptive Effects of Cortisol on Preovulatory Events. *Endocrinology*, 146 (4), 2107-2115.
- Brunton L.A., Duncan D., Coldham N.G., Snow L.C., Jones J.R. (2012). A survey of antimicrobial usage on dairy farms and waste milk feeding practices in England and Wales. *Veterinary Record*, 171(12), 296–296.

- Butler W.E., Smith R.D. (1998). Interrelationships Between Energy Balance and Postpartum Reproductive Function in Dairy Cattle. *Journal of dairy science*, 72, 767-783.
- Butler W.R. (2000). Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 449-457.
- Butler W.R. (2003). Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livestock Production Science*, 83, 211-218.
- Chebel R.C., Santos J.E.P., Reynolds J.P., Cerri R.L.A., Juchem S.O., Overton M. (2004). Factors affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 84, 239-255.
- Chebel R.C. (2008). Voluntary waiting period: How soon is too soon, and how late is too late? *Western Dairy News*, 8 (3), 89-90.
- Chegini A., Hossein-Zadeh G.N., Hosseini-Moghadam, H., Shadparvar A.A. (2016). Factors affecting clinical mastitis and effects of clinical mastitis on reproductive performance of Holstein cows *Revue de Médecine Vétérinaire*, 167 (5-6), 145-153.
- Coleman D.A., Thayne W.V., Dailey R.A. (1985). Factors Affecting Reproductive Performance of Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 68, 1793-1803.
- Cook J. (2009). Understanding Conception rates in dairy herds. *Farm Animal Practice*, 31, 262-266.
- Dairy Herd Improvement. (n.d.). *Somatic Cell Counts*. Western Canada: DHI.
- Dayyani N., Karkudi K., Bakhtiari H. (2013). Reproductive performance definition in dairy cattle: affective factors. *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research* 1 (11), 1392-1396.
- De Haas Y., Barkema H.W., Veerkamp R.F. (2002). The Effect of Pathogen-Specific Clinical Mastitis on the Lactation Curve for Somatic Cell Count. *Journal of Dairy Science*, 85, 1314-1323.
- De Vries, A. (2004). Trends In Reproductive Performance In Dairy Cows: What Do The Numbers Tell Us? In B. Broaddus, P. Hansen, A. De Vries, S. Coop, A. Andreasen, P. Miller, R. Giesy (Eds.), *Proceedings of the Florida Reproduction Road Show*, pp: 1-8. Florida.
- Deb G.K., Dey S.R., Bang J.I., Cho S.J., Park H.C., Lee J.G., Kon I.K. (2011). 9-eis retinoic acid improves developmental competence and embryo quality during in vitro maturation of bovine oocytes through the inhibition of oocyte tumor necrosis factor-ct gene expression. *Journal of Animal Science*, 89, 2759-2767.
- DeGraves F.J., Fetrow J. (1993). Economics of mastitis and mastitis control. *The Veterinary Clinics of North America: Update on Bovine Mastitis*, 9 (3), 421-434.
- Dobson H., Smith R.F, Royal M.D., Knight C.H & Sheldon I.M. (2007). The High-producing Dairy Cow and its Reproductive Performance. *Reproduction Domestic Animals*, 42 (2), 17-23.
- Drackley J.K. (1999). Biology of Dairy Cows During the Transition Period: the Final Frontier? *Journal of Dairy Science*, 82, 2259-2273.
- Ealy, A.D., Drost M., Hansen P.J. (1993). Developmental Changes In Embryonic Resistance to Adverse Effects of Maternal Heat Stress In Cows. *Journal of Dairy Science*, 76, 2899-2905.

- Edmonson P.W., Bramley A.J. (2004). Mastitis. In A.H. Andrews, R.W. Blowey, H.Boyd & R.G. Eddy. *Bovine Medicine: Diseases and Husbandry of Cattle*. (2nd ed). (pp. 326-335). Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Edwards J., Hansen P.J. (1997). Differential Responses of Bovine Oocytes and Preimplantation Embryos to Heat Shock. *Molecular Reproduction And Development*, 46, 138-145.
- Eurostat (2013). *Archive: Milk and dairy production statistics. Portrait of the EU milk production sector*. Luxembourg: Eurostat.
- Eurostat (2016). *Milk and milk product statistics*. Luxembourg: Eurostat.
- Esposito G., Irons P.C., Webb E.C., Chapwanya A. (2013). Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. *Animal Reproduction Science*, acedido em Out. 9, 2017, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037843201300328X?via%3Dihub>
- Fenwick M.A., Llewellyn S., Fitzpatrick R., Kenny D.A., Murphy J.J., Patton J., Wathes D.C. (2008). Negative energy balance in dairy cows is associated with specific changes in IGF-binding protein expression in the oviduct. *Reproduction*, 135, 63-75.
- Fox L.K., Gay J.M. (1993). Contagious mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 9 (3), 475-487.
- Fuenzalida M.J., Fricke P.M., Ruegg P.L. (2015). The association between occurrence and severity of subclinical and clinical mastitis on pregnancies per artificial insemination at first service of Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 98 (6), 3791-3805.
- Furman O., Leitner G., Roth Z., Lavon Y., Jacoby S., Wolfenson D. (2014). Experimental model of toxin-induced subclinical mastitis and its effect on disruption of follicular function in cows. *Theriogenology*, 82, 1-8.
- Giri S.N., Emau P., Cullor J.S., Stabenfeldt G.H., Bruss M.L., Bondurant R.H., Osburn B.I. (1990). Effects of endotoxin infusion on circulating levels of eicosanoids, progesterone, cortisol, glucose and lactic acid, and abortion in pregnant cows. *Veterinary Microbiology*, 21, 211-31.
- Graça Martins, E. (2009). Introdução às técnicas de amostragem. In Martins G., *Análise de Dados*. (pp:1-40).
- Gröhn Y.T., Eicker S.W., Durcroq V., Hertl J.A. (1998). Effect of Diseases on the Culling of Holstein Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 81, 966-978.
- Gunay A., Gunay U. (2008). Effects of Clinical Mastitis on Reproductive Performance in Holstein Cows. *Acta Veterinaria Brunensis*, 77, 555-560.
- Halasa T, Huijps K., Østerås O., Hogeveen H. (2007). Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Veterinary Quarterly*, 29 (1), 18-31.
- Hartigan P.J. (2004). Reproductive Physiology in Cattle. In A.H. Andrews, R.W. Blowey, H.Boyd & R.G. Eddy. *Bovine Medicine: Diseases and Husbandry of Cattle*. (2nd ed). (pp. 471-505). Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Herman A.P., Tomaszewska-Zaremba D. (2010). Effect of endotoxin on the expression of GnRH and GnRHR genes in the hypothalamus and anterior pituitary gland of anestrous ewes. *Animal Reproduction Science*, 120, 105-111.

- Herr M., Bosted H., Failing K. (2011). IgG and IgM levels in dairy cows during the periparturient period. *Theriogenology*, 75, 377-385.
- Hockett M.E., Hopkins F.M., Lewis M.J., Saxton A.M., Dowlen H.H., Oliver S.P., Schrick F.N. (2000). Endocrine profiles of dairy cows following experimentally induced clinical mastitis during early lactation. *Animal Reproduction Science*, 58, 241–51.
- Hudson C.D., Bradley A.J., Breen J.E., Green M.J. (2012). Associations between udder health and reproductive performance in United Kingdom dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 95 (7), 3683-3697.
- Huijps K., Lam T., Hogeveen H. (2008). Costs of mastitis: facts and perception. *Journal of Dairy Research*, 75 (1), 113-120.
- Instituto Nacional de Estatística (2016). *Estatísticas da produção e consumo de leite – 2015*. Lisboa: INE.
- Kojima F.N. (2003). Symposium paper: The estrous cycle in cattle: physiology, endocrinology, and follicular waves. *The Professional Animal Scientist*, 19, 83-95.
- Kumar N., Manimaran A., Kumaresan A., Jeyakumar S., Sreela L., Mooventhan P., Sivaram M. (2017). Comparing the effects of heat stress and mastitis on ovarian function in lactating cows: basic and applied aspects. *Tropical Animal Health and Production*.
- Lacetera N., Scalia D., Bernabucci U., Ronchi B., Pirazzi D., Nardone A. (2005). Lymphocyte Functions in Overconditioned Cows Around Parturition. *Journal of Dairy Science*, 88, 2010-2016.
- Lavon Y., Leitner G., Goshen T., Braw-Tal R., Jacoby S., Wolfenson D. (2008). Exposure to endotoxin during estrus alters the timing of ovulation and hormonal concentrations in cows. *Theriogenology*, 70, 956-967.
- Lavon Y., Ezra E., Leitner G., Wolfenson D. (2011a). Association of conception rate with pattern and level of somatic cell count elevation relative to time of insemination in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 94, 4538-4545.
- Lavon Y., Leitner G., Moallem U., Klipper E., Voet H., Jacoby S., Glick G., Meidan R., Wolfenson D. (2011b). Immediate and carryover effects of Gram-negative and Gram-positive toxin-induced mastitis on follicular function in dairy cows. *Domestic Animal Endocrinology*, 76, 942-95.
- Lavon Y., Leitner G., Klipper E., Moallem U., Meidan R., Wolfenson D. (2011c). Subclinical, chronic intramammary infection lowers steroid concentrations and gene expression in bovine pre-ovulatory follicles. *Domestic Animal Endocrinology*, 40, 98-109.
- Lavon Y., Kaim M., Leitner G., Biran D., Ezra E., Wolfenson D. (2016). Two approaches to improve fertility of subclinical mastitic dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 99, 2268-2275.
- LeBlanc S. (2007). Economics of Improving Reproductive Performance in Dairy Herds. *West Canadian Dairy Seminar: Advances in Dairy Technology*, 19, 201-214.
- Leroy J., Vanholder T., Opsomer O., Van Soom A., de Kruif A. (2006). The In Vitro Development of Bovine Oocytes after Maturation in Glucose and b-Hydroxybutyrate Concentrations Associated with Negative Energy Balance in Dairy Cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 41, 119-123.

- Leslie K.E., Duffied T.F., Schukken Y.H. & LeBlanc S.J. (2000). The influence of negative energy balance on udder health. In *National Mastitis Council Regional Meeting Proceedings*, pp: 25-33.
- Loeffler S., Vries M., Schukken Y. (1999). The effects of time of disease occurrence, milk yield and body conditions on fertility of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 82 (12), 2589-2604.
- Lucy M.C., Staples C.R., Thatcher W.W., Erickson P.S, Cleale R.M., Firkins J.L., Clark J.H., Murphy M.R., Brodie B.O. (1992). Influence of diet composition, dry-matter intake, milk production and energy balance on time of post-partum ovulation and fertility in dairy cows. *Animal Production*, 54, 323-331.
- Lucy M.C. (2001). Reproductive Loss in High-Producing Dairy Cattle: Where Will It End? *Journal of Dairy Science*, 84 (E. Suppl.), 1277-1293.
- Maizon D.O., Oltenacu P.A., Gröhn Y.T., Strawderman R.L, Emanuelson U. (2004). Effects of diseases on reproductive performance in Swedish Red and White dairy cattle. *Preventive Veterinary Medicine*, 66, 113-126.
- Mann G.E., Lamming G.E. (2001). Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction*, 121, 175-180.
- McDougall S., Abbeloos E., Piepers S., Rao A.S., Astiz S., Werven T.van., Statham.J., Pérez-Villalobos N. (2016). Addition of meloxicam to the treatment of clinical mastitis improves subsequent reproductive performance. *Journal of Dairy Science*, 99, 1-17.
- Meidan R. (2017). *The life cycle of the corpus luteum*. Switzerland: Springer. Acedido em Nov. 06, 2017 from Springer International Publishing website: <http://www.springer.com/gp/book/9783319432366>
- Moore D.A., Cullor J.S., Bondurant R.H., Sisco W.M. (1991). Preliminary field evidence for the association of clinical mastitis with altered interestrus intervals in dairy cattle. *Theriogenology*, 36 (2), 257-265.
- Moussavi A.H., Mesgaran M.D., Gilbert R.O. (2012). Effect of mastitis during the first lactation on production and reproduction performance of Holstein cows. *Tropical Animal Health Production*, 44, 1567-1573.
- Nakov D., Hristvo S., Andonov S., Trajchev M. (2014). Udder-related risk factors for clinical mastitis in dairy cows. *Veterinarski Arhiv*, 84, 111-127.
- Nava-Trujillo H., Soto-Belloso E., Hoet A.E. (2010). Effects of clinical mastitis from calving to first service on reproductive performance in dual-purpose cows. *Animal Reproduction Science*, 121, 12-16.
- Ohtsuka H., Terasawa S., Watanabe C., Kohirumaki M., Mukai M., Ando T., Petrovski K.R., Morris S. (2010). Effect of parity on lymphocytes in peripheral blood and colostrum of healthy Holstein dairy cows. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 74, 130–135.
- Oltenacu P.A., Broom D.M. (2010). The impact of genetic selection for increased milk yield on the welfare of dairy cows. *Animal Welfare*, 19(S), 39-49.
- Pacheco, S.M.F. (2013). Dissertação de Mestrado em Produção Animal. Estudo de alguns índices reprodutivos em vacaria de bovinos leiteiros. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa.

- Peek S.F. (2008). *Rebhun's diseases of dairy cattle*. Missouri: Saunders Elsevier.
- Petrovski K.R., Trajcevic M., Buneski G. (2006). A review of the factors affecting the costs of bovine mastitis. *The Journal of the South African Veterinary Association*, 77(2), 52-60.
- Pinedo P.J., Melendez P., Villagomez-Cortes J.A., Risco C.A. (2009). Effect of high somatic cell counts on reproductive performance of Chilean dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 92, 1575-1580.
- Piotrowska-Tomala K.K., Bah M.M., Jankowska K., Lukasik K., Warmowski P., Galvao A.M., Skarzynski D.J. (2015). Lipopolysaccharides, cytokines, and nitric oxide affect secretion of prostaglandins and leukotrienes by bovine mammary gland during experimentally induced mastitis in vivo and in vitro. *Domestic Animal Endocrinology*, 52, 90-99.
- Pritchard T., Coffey M., Mrode R., Wall E. (2013). Genetic parameters for production, health, fertility and longevity traits in dairy cows. *Animal*, 7 (1), 34-46.
- Putney D.J., Drost M., Thatcher W.W. (1988). Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between days 1 to 7 post insemination. *Theriogenology*, 30 (2), 195-209.
- Rahman M.M., Mazzilli M., Pennarossa G., Brevini T.A.L., Zecconi A., Gandolfi F. (2012). Chronic mastitis is associated with altered ovarian follicle development in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 95, 1885-1893.
- Rinaldi M., Moroni P., Paape M.J., Bannerman D.D. (2008). Differential alterations in the ability of bovine neutrophils to generate extracellular and intracellular reactive oxygen species during the periparturient period. *The Veterinary Journal*, 178, 208-213.
- Risco C.A., Donovan G.A., Hernandez J. (1999). Clinical Mastitis Associated with Abortion in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 82, 1684-1689.
- Risco C. A., Melendez P. (2011). *Dairy Production Medicine*. United Kingdom: Wiley. Acedido em Nov.7, 2017, disponível em: [https://books.google.pt/books/about/Dairy\\_Production\\_Medicine.html?id=L3rna3b97cC&printsec=frontcover&source=kp\\_read\\_button&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.pt/books/about/Dairy_Production_Medicine.html?id=L3rna3b97cC&printsec=frontcover&source=kp_read_button&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)
- Rocha A., Martins A., Carvalheira J. (2010). Fertility time trends in dairy herds in Northern Portugal. *Reproduction in Domestic Animals*, 45, 896-899.
- Roche J.R., Macdonald K.A., Burke C.R., Lee J.M., Berry D.P. (2007). Associations Among Body Condition Score, Body Weight, and Reproductive Performance in Seasonal-Calving Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, 90, 376-391.
- Roth Z., Dvir A., Kalo D., Lavon Y., Krifucks O., Wolfenson D. and Leitner G. (2013). Naturally occurring mastitis disrupts developmental competence of bovine oocytes. *Journal of Dairy Science*, 96 (10), 6499–6505.
- Roth Z. (2015). Physiology and Endocrinology Symposium: Cellular and molecular mechanisms of heat stress related to bovine ovarian function. *Journal of Animal Science*, 93, 2034-2044.
- Roth Z., Asaf S., Furman O., Lavon Y., Kalo D., Wolfenson D., Leitner G. (2015). Subclinical mastitis disrupts oocyte cytoplasmic maturation in association with reduced developmental competence and impaired gene expression in preimplantation bovine embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, A-J.

- Roth Z., Wolfenson D. (2016). Comparing the effects of heat stress and mastitis on ovarian function in lactating cows: basic and applied aspects. *Domestic Animal Endocrinology*, 56, S208-S227.
- Rotta, J. (1975). Endotoxin-like properties of the peptidoglycan. *Z. Immunitaetsforsch.* 149, 230–244.
- Ruegg P.L., Fricke P., Fuenzalida M.J. (2015). Impact of mastitis on reproductive performance. *UW Milk Quality Monthly Minutes*. Acedido em Dez. 7, 2017, disponível em <http://milkquality.wisc.edu/wp-content/uploads/2015/04/Impact-of-mastitis-on-reproductive-performance-RUEGG-Brazil-2015.pdf>
- Santos J.E.P, Cerri R.L.A, Ballou M.A, Higginbotham G.E, Kirk J.H. (2004). Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. *Animal Reproduction Science* 80, 31-45.
- SAS Institute Inc. (2008). SAS/STAT® 9.2 User’s Guide. Cary, North Carolina: SAS Institute Inc.
- Schmitz S., Pfaffl M.W., Meyer H.H.D., Bruckmaier R.M. (2004). Short-term changes of mRNA expression of various inflammatory factors and milk proteins in mammary tissue during LPS induced mastitis. *Domestic Animals Endocrinology*, 26,111–126.
- Schrick F.N., Inskip E.K., Butcher R.L. (1993) Pregnancy rates for embryos transferred from early postpartum beef cows into recipients with normal estrous cycles. *Biology of Reproduction*, 49, 617–621.
- Schrick F.N., Hockett M.E., Saxton A.M., Lewis M.J., Dowlen H.H., Oliver S.P. (2001). Influence of Subclinical Mastitis During Early Lactation on Reproductive Parameters. *Journal of Dairy Science*, 84, 1407-1414.
- Schukken Y.H., Günther J., Fitzpatrick J., Fontaine M.C., Goetze L., Holst O., Leigh J., Petzl W., Schuberth H.J., Sipka A., Smith D.G., Quesnell R., Watts J., Yancey R., Zerbe H., Gurjar A., Zadoks R.N., Seyfert H.M.; members of the Pfizer mastitis research consortium. (2011). Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Vet. Immunol. Immunopathol*, 144, 270–289.
- Seals R. C., Lemaster J.W., Hopkins F.M., Schrick F.N. (1998). Effects of elevated concentrations of prostaglandin F2a on early embryonic survival in progesterone supplemented cattle. *Prostaglandins* 56, 377–389.
- Sepúlveda-Varas P., Proudfoot K.L., Weary D.M., Keyserlingk M.A.G. Changes in behaviour of dairy cows with clinical mastitis. *Applied Animal Behaviour Science*, 175, 8–13.
- Smith K.L., Hogan J.S. (1993). Environmental mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 9 (3), 489-498.
- Soto P., Natzke R.P, Hansen P.J. (2003). Identification of Possible Mediators of Embryonic Mortality Caused by Mastitis: Actions of Lipopolysaccharide, Prostaglandin F2a, and the Nitric Oxide Generator, Sodium Nitroprusside Dihydrate, on Oocyte Maturation and Embryonic Development in Cattle. *American Journal of Reproductive Immunology*, 50, 263-272.
- Spicer L.J., Alpizar E. (1994). Effects of cytokines on fsh-induced estradiol production by bovine granulosa cells in vitro: dependence on size of follicle. *Domestic Animal Endocrinology*, 11 (1), 25-34.
- Taylor V.J., Beever D.E., Bryant M.J., Wathes D.C. (2003). Metabolic profiles and progesterone cycles in first lactation dairy cows. *Theriogenology*, 59, 1661-1677.

- Trevisi E., Amadori M., Archetti I., Lacetera N., Bertoni G. (2011). Inflammatory Response and Acute Phase Proteins in the Transition Period of High-Yielding Dairy Cows. *Acute Phase Proteins as Early Non-Specific Biomarkers of Human and Veterinary Diseases*. Prof. Francisco Veas (Ed.), ISBN: 978-953-307-873-1, InTech, Disponível em: <http://cdn.intechweb.org/pdfs/21681.pdf>
- United States Department of Agriculture. (2002). *The Changing Landscape of U.S. Milk Production*. Washington: USDA.
- Vacek M., Stádník L., Štípková M. (2007). Relationships between the incidence of health disorders and the reproduction traits of Holstein cows in the Czech Republic. *Czech Journal of Animal Science*, 52 (8), 227-235.
- Van Hoeck V., Bols P.E.J., Binelli M., Leroy L.M.R. (2014). Reduced oocyte and embryo quality in response to elevated non-esterified fatty acid concentrations: A possible pathway to subfertility? *Animal Reproduction Science*, disponível em, <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.07.015>
- Williams E.J., Sibley K., Miller A.N., Lane E.A., Fishwick J., Nash D.M., Herath S., England G.C.W., Dobson H., Sheldon I.M. (2008). The Effect of Escherichia coli Lipopolysaccharide and Tumour Necrosis Factor Alpha on Ovarian Function. *American Journal of Reproductive Immunology*, 60, 426-473.
- Windig J.J., Calus M.P.L., Veerkamp R.F. (2005). Influence of Herd Environment on Health and Fertility and Their Relationship with Milk Production. *Journal of Dairy Science*, 88, 335-347.
- Wise T., Suss U., Stranzinger G., Wuthrich K., Maurer R.R. (1994). Cumulus and oocyte maturation and in vitro and in vivo fertilization of oocytes in relation to follicular steroids, prolactin, and glycosaminoglycans throughout the estrous period in superovulated heifers with a normal LH surge, no detectable LH surge, and progestin inhibition of LH surge. *Domestic Animal Endocrinology*, 11 (1), 59–86.
- Yoshimura Y., Ando M., Nagamatsu S., Iwashita M., Adachi T., Sueoka K., Miyazaki T., Kuji N., Tanaka M. (1996). Effects of Insulin-Like Growth Factor-I on Follicle Growth, Oocyte Maturation, and Ovarian Steroidogenesis and Plasminogen Activator Activity in the Rabbit. *Biology of Reproduction*, 55, 152-160.

## X. Anexos

### Anexo 1: Poster científico. Jornadas da Associação Portuguesa de Buiatria 2017, 1º classificado.

## INFLUÊNCIA DAS MASTITES SUBCLÍNICAS NO DESEMPENHO REPRODUTIVO DE BOVINOS DE LEITE

Fraga, C.

### INTRODUÇÃO


As mastites e o insucesso reprodutivo, são dois dos problemas mais comuns que se encontram nas explorações de bovinos de leite (Ruegg et al., 2015). As mastites são uma infeção bacteriana da glândula mamária (Bradley et al., 2002), representando uma ameaça para a saúde do útero, produção de leite e também para a performance reprodutiva dos animais (Lavon et al., 2010). Ao longo da última década tem sido demonstrada uma relação entre as mastites, sejam clínicas ou subclínicas, e uma diminuição do desempenho reprodutivo (Lavon et al., 2016).

### MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste estudo, foi utilizada a base de dados Bovinfor 2016.

#### DADOS ANALISADOS (1996 – 2016)

- ✓ 9 Explorações Nacionais
- ✓ 3 Regiões (Entre Douro e Minho; Beira Litoral; Alentejo)
- ✓ 3 Partos
- ✓ Intervalo Parto-Conceção 1 (17763 animais)
- ✓ Intervalo Parto-Conceção 2 (11277 animais)



Para cada exploração, eram conhecidos os dados abaixo apresentados. A data de inseminação artificial (IA) não foi utilizada, pois verificou-se que em alguns casos não estava correta. De modo a solucionar este problema foi calculada a data de concepção.

#### DADOS POR EXPLORAÇÃO

- ✓ Animal
- ✓ Número de lactação
- X Data IA (Último Parto – Tempo de gestação (282 dias) = Data Concepção)
- ✓ Data de Parto (Data Concepção – Parto Anterior = Intervalo parto concepção (IPC))
- ✓ Data do contraste leiteiro
- ✓ Contagem de células somáticas (CCS) (CCS → Linear Score (LS), Agrupamento dos dados por classes de linear score (tabela 1))

CCS (células/ml)	Linear score	Classe linear score
< 200.000	<4	1
200.000 a 400.000	4 a 5	2
400.000 a 800.000	5 a 6	3
> 800.000	>6	4

Nota 1.

Através destes dados, foi analisada a influência das células somáticas no intervalo parto concepção, por classes de linear score, para cada lactação. Numa primeira fase estudou-se, dentro dos dias abertos, o impacto do episódio cuja CCS fosse anterior à data de concepção (figura 1).




Figura 1.

Numa segunda fase, estudou-se a influência do episódio com a mais alta CCS, dentro dos dias abertos, relativamente aos resultados obtidos anteriormente.

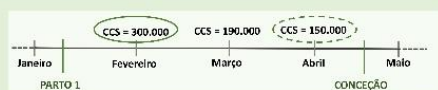


Figura 2.

Por fim, avaliou-se a influência da cronicidade dos episódios. Neste caso, contou-se o número de vezes em que cada animal apresentava linear score superior à classe 1 (CCS>200.000 células/ml; linear score>4), durante os dias abertos. Estes dados foram agrupados de acordo com a classe de linear score do contraste leiteiro anterior à data de concepção. Assim, estudou-se a evolução do intervalo parto-concepção, à medida que aumenta o número de eventos com linear score superior à classe 1.

### RESULTADOS

Após a análise dos dados, verificou-se que o intervalo parto-concepção aumenta à medida que aumenta a classe de linear score (tabela 2 e tabela 3). Os resultados mostraram-se sempre estatisticamente significativos. Este aumento ocorreu, tanto para a primeira como para a segunda lactação, sendo que nesta demonstrou ser ainda mais pronunciado.

#### 1ª Lactação

Classe Linear score A	Classe Linear score B	IPC (dias)	p value
1	1	117	<0,001
1	2	162	<0,001
1	3	178	<0,001
1	4	179	<0,001
2	2	130	<0,001
2	3	189	<0,001
2	4	190	<0,001
3	3	138	<0,001
3	4	195	<0,001
4	4	150	<0,001

A: episódio CCS anterior à data de concepção B: episódio mais alto de CCS nos dias abertos

Nota 2.

#### 2ª Lactação

Classe Linear score A	Classe Linear score B	IPC (dias)	p value
1	1	136	<0,001
1	2	185	<0,001
1	3	195	<0,001
1	4	203	<0,001
2	2	154	<0,001
2	3	197	<0,001
2	4	215	<0,001
3	3	156	<0,001
3	4	204	<0,001
4	4	172	<0,001

A: episódio CCS anterior à data de concepção B: episódio mais alto de CCS nos dias abertos

Nota 3.

Relativamente ao impacto da cronicidade dos episódios do mastite, no intervalo parto concepção, verificou-se que, à medida que aumenta o número de episódios com linear score de classe superior a 1 (CCS>200.000 células/ml; linear score>4), aumenta o intervalo parto-concepção (gráfico 1 e gráfico 2). Estes resultados ocorreram tanto para a primeira como para a segunda lactação.

#### 1ª Lactação

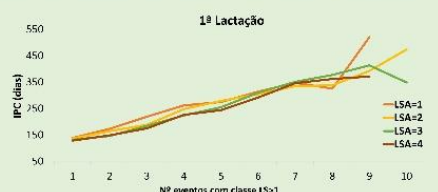


Figura 3.

LSA: Classe LS do episódio anterior à concepção.

#### 2ª Lactação




Figura 4.

LSA: Classe LS do episódio anterior à concepção.

### CONCLUSÃO

Os resultados obtidos apontam a existência de uma influência das mastites na performance reprodutiva dos bovinos de leite. Quanto maior a contagem de células somáticas e quanto maior o número de eventos cuja contagem de células somáticas é superior a 200.000 células/ml, maior o intervalo parto-concepção. Para cada aumento do número de eventos, cuja contagem de células somáticas é superior a 200.000 células/ml, o intervalo parto concepção aumenta, em média, 28,7 dias para a primeira lactação e 27,9 dias para a segunda lactação.

### BIBLIOGRAFIA

Bradley RL, Rossdale PM, Ruegg P. (2002). The control of bacterial mastitis and mastitis-free dairy herds in the modern dairy farm. In: The control of mastitis. (Eds. Rossdale PM, Bradley RL). London: Elsevier, 1-10.

Lavon S, Rossdale PM, Bradley RL, Rossdale PM, Ruegg P. (2010). The impact of mastitis on the reproductive performance of dairy cows. In: The control of mastitis. (Eds. Rossdale PM, Bradley RL). London: Elsevier, 11-20.

Ruegg P, Rossdale PM, Bradley RL, Rossdale PM, Rossdale PM, Rossdale PM. (2015). The impact of mastitis on the reproductive performance of dairy cows. In: The control of mastitis. (Eds. Rossdale PM, Bradley RL). London: Elsevier, 21-30.

### AGRADECIMENTOS

