

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



TESE

**Efeito do butafosfan no metabolismo de
vacas leiteiras saudáveis ou com mastite
clínica**

Vinicius Coitinho Tabeleão

Pelotas, 2014.

Vinicius Coitinho Tabeleão

Efeito do butafosfan no metabolismo de vacas leiteiras saudáveis ou com mastite clínica

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Marcio Nunes Corrêa

Pelotas, 2014.

Dados de catalogação na fonte:

Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

T113e Tabeleão, Vinicius Coitinho

**Efeito do butafosfan no metabolismo de vacas
leiteiras saudáveis ou com mastite clínica / Vinicius
Coitinho Tabeleão. – 82f. – Tese (Doutorado). Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade
Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento
Tecnológico. Pelotas, 2014. – Orientador Marcio Nunes
Corrêa ; coorientador Rubens Alves Pereira... [et al.]**

Banca examinadora

Marcio Nunes Corrêa, Dr., Universidade Federal de Pelotas (orientador)

Eduardo Schmitt, Dr., Embrapa – Centro de Pesquisa Agroflorestal

Fernanda Medeiros Gonçalves, Dr^a., Universidade Federal de Pelotas

Raquel Fraga e Silva Raimondo, Dr^a., Universidade Federal de Pelotas

Rubens Alves Pereira, Dr., Universidade Federal de Pelotas (suplente)

Agradecimentos

Agradeço a DEUS pela vida.

A CAPES por ter concedido uma bolsa de doutorado podendo assim contribuir para a viabilização desta tese.

Ao professor Dr. Marcio Nunes Corrêa, orientador e parceiro de tantas jornadas, pela dedicação e por ter confiado que era possível desenvolver um trabalho, mesmo com tantos desafios que se avizinhavam. Sua confiança e orientação foram fundamentais. Juntamente, com o professor Francisco Augusto Burkert Del Pino e Eduardo Schmitt, sempre estimuladores e encorajadores na condução dos desafios diários do trabalho, além de ter compartilhado de seus conselhos com suas experiências de vida.

À Granja 4 Irmãos, por ter sido uma parceira fundamental colocando as equipes, estrutura, registros e os animais a nossa inteira disposição, permitindo assim que pudéssemos conduzir as atividades, em especial ao colega Médico Veterinário Eduardo Xavier, que nesse momento representa toda as pessoas que me auxiliaram. Meu muito obrigado de coração.

Aos colegas de trabalho do NUPEEC, pelas trocas de experiência que foram de grande valia para o aprendizado da minha vida profissional e pessoal, que sempre foram afáveis, compreensivos e parceiros, dividindo estudos expectativas e perspectivas pessoais e profissionais. Além de um auxílio fundamental na condução dos trabalhos de campo. Grato por mais esse aprendizado.

Às pessoas que trabalharam mais próximas a mim, dividindo atividades e se sacrificando pela condução perfeita do que planejamos. Vocês foram partes integrantes de mim, me auxiliaram a ser um profissional mais capacitado pela sua convivência, estilo de vida, compreensão de tudo e todos. Vocês foram meus braços quando não tinha mais força, e minhas pernas quando não mais chegava, sem vocês este trabalho não teria sido o que foi. Muito obrigado à Rubens Alves Pereira, Rafael da Fonsceca Prietsch, Josiane de Oliveira Feijó, Patricia Mattei, Tais Helena Kivel e Thais Casarin da Silva.

A Professora Leonor Almeida de Souza-Soares, por sempre ser uma pessoa presente e atuante, sendo a voz da consciência e sabedoria para conduzir os percalços da vida. Aos professores da UFPel que em diferentes momentos foram meus conselheiros e muito me auxiliaram nessa caminhada.

A meus irmãos de emaus, que mesmo a distância mantêm-se ligados a minha pela oração, obrigado por que elas são eficazes, e eu sou testemunha disso.

A meus pais Dilermando Lopes Tabeleão, Vera Lucia Coitinho Tabeleão e meu irmão Leandro Coitinho Tabeleão e minha cunhada Pricila Pilotto Tabeleão e ao mais novo integrante da nossa Cassio Pilotto Tabeleão, sem vocês nunca teria conseguido chegar até aqui. Vocês foram e sempre serão meus melhores amigos, conselheiros, parceiros, fonte de inspiração e fortaleza. Agradeço a DEUS por ELE ter concedido essa graça de ser parte dessa FAMILIA. Do mesmo modo aos meus tios Fernando Pizzaro Pilotto e Ana Maria Tabeleão Pilotto e seus filhos, que contribuíram e contribuem fortemente na vida. O mesmo agradecimento a Rejane Lazari, Eloir Lazari e Gabriella Lazari, que mesmo a distância sempre torceram e me auxiliaram.

A Lara Lazari e Ana Luiza Lazari Tabeleão, razões de minha existência, motivos de não desistência dessa caminha. Vocês sempre me fizeram sorrir, mesmo quando não exteriorizava. Vocês são responsáveis diretas por minha vontade de sair para trabalhar e pela ansiedade de retornar, sempre me esperando com um sorriso, um abraço e um beijo acolhedor e amoroso. Vocês me fizeram e fazem muito feliz, também foi de responsabilidade de vocês me dar força para suportar e superar os desafios dos últimos tempo que não foram poucos. Tenho certeza que seremos felizes muitas e muitas décadas...

Outro agradecimento especial para Nereida Larré Coitinho, minha avó e madrinha, que no silêncio de seus comentários me fizeram aprender muito. Obrigado pelo seu testemunho de carinho, amor e abnegação pessoal...

A todos dizer obrigado poderia ser pouco, mas quando se tem muito claro da veracidade deste agradecimento creio que não é. MUITO OBRIGADO.

Resumo

TABELEÃO, Vinicius Coitinho. **Efeito do butafosfan no metabolismo de vacas leiteiras saudáveis ou com mastite clínica.** 2014. 80f. Tese (doutorado) – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

As vacas leiteiras são desafiadas a desempenhar o máximo da sua capacidade produtiva, principalmente, durante o período de transição (três semanas anteriores e três semanas posteriores ao parto). Este período é caracterizado por intensas mudanças no metabolismo que causam um balanço energético negativo. Este fato gera uma perda de peso característica do período, que tem sido correlacionada com a resistência periférica à insulina, haja vista, que a glicose disponível esta sendo destinada para síntese de lactose, que por sua vez é responsável, parcialmente, pelo volume de leite produzido. Além disso, durante a lactação há vários manejos que podem oferecer risco à saúde dos animais, caso não sejam executados adequadamente, causando traumas e predispondo o animal a infecções, especialmente, da glândula mamária, já que ela é intensamente manipulada e tem contato com vários agentes potencialmente infecciosos. A partir de uma porta de entrada estes agentes podem infectar a glândula causando a mastite, que pode se apresentar na forma clínica (com presença de sinais clínicos), ou subclínica (sem sinais clínicos). Nas situações de desequilíbrio metabólico, ou em casos de mastite, a produção de leite pode ser prejudicada. Diante disso, há uma busca constante por tecnologias que possam minimizar estes transtornos e auxiliar os sistema de produção. Nosso objetivo foi verificar o efeito da associação de butafosfan e cianocobalamina sobre o metabolismo glicêmico de vacas leiteiras saudáveis no período pós-parto, além dos seus efeitos sobre a recuperação da glândula mamária em vacas leiteiras após o tratamento de mastite clínica. Para tanto, nosso estudo foi estratificado em dois trabalhos com as seguintes hipóteses: 1) a utilização da associação de butafosfan e cianocobalamina pode intensificar a resistência à insulina periférica, disponibilizando maior quantidade de glicose para a produção de leite em vacas leiteiras; 2) a suplementação da associação de butafosfan e cianocobalamina pode auxiliar na recuperação da glândula mamária de vacas leiteiras, após o tratamento da mastite clínica. No experimento 1, os animais que receberam sucessivas doses de butafosfan e cianocobalamina tiveram maior perda de peso e aumento ($P<0,05$) das atividades das enzimas aspartato amino transferase e creatinoquinase. Além disso, ao final do tratamento houve aumento ($P<0,05$) dos níveis glicêmicos nos animais tratados, quando comparados ao início. No experimento 2, as análises comparativas entre as mastites, leve e moderada, não diferiram em nenhum dos parâmetros ($P>0,05$). Os animais tratados com butafosfan e cianocobalamina apresentaram menor ($P<0,05$) contagem de células somáticas após a terceira aplicação. Entretanto, os níveis de glicose, albumina, PPT, AGNES e os componentes químicos e físicos do leite não diferiram ($P>0,05$) entre os grupos. Nessas condições de estudo, podemos concluir que a associação de butafosfan e cianocobalamina apresenta resultados promissores como fonte de nutriente que permite intensificar as reações fisiológicas, principalmente, as dependentes de fosforilação.

Palavras-chave: fósforo orgânico, vitamina B12, vacas de leite, período de transição.

Abstract

TABELEÃO, Vinicius Coitinho. **Effects the butaphosphan on the metabolism of healthy dairy cows with clinical mastitis**. 2014. 80F. Thesis (Ph.D.) - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Dairy cows are expected to perform maximum of their productive capacity, especially during the transition period (three weeks before and up to three weeks after calving). This period is characterized by intense changes in metabolism which cause a negative energy balance. This fact generates a period of typical weight loss, which has been correlated with insulin resistance, once the available glucose is destined for lactose synthesis, which in turn is responsible, in part, for milk production levels. Moreover, during lactation there are several managements that impairs animals health. If not executed properly, can cause trauma and predisposition for infections, especially of the mammary gland, because this gland is heavily manipulated and has contact with potentially infectious agents. From a entrance doorway, these agents can infect the gland and cause mastitis, which may be clinical (with clinical signs) or subclinical (without clinical signs). In situations of metabolic disorders or in cases of mastitis, the milk production may be affected. Therefore, there is a constant search for technologies that can minimize these disorders and assist the production systems. Our objective was to investigate the effects of combining butaphosphan and cyanocobalamin on the glycemic metabolism in healthy dairy cows in the postpartum period and their effects on the mammary gland recovery in dairy cows after clinical mastitis treatment. Thus, our study was stratified into two assumptions: 1) the use of the association of butaphosphan and cyanocobalamin enhances peripheral insulin resistance in dairy cows, providing greater amounts of glucose for milk production, 2) the supplementation with butaphosphan and cyanocobalamin facilitates mammary gland recovery in dairy cows affected by mastitis. In experiment 1, animals receiving repeated doses of butaphosphan and cyanocobalamin had greater weight loss and increased ($P<0.05$) of the activities of the enzymes aspartate aminotransferase and creatine kinase. Moreover, at end of treatment had an increase ($P<0.05$) in glucose concentration in treated animals when compared to the beginning of study. In experiment 2, the comparative analyzes between mild and moderate mastitis did not differ ($P>0.05$) in any parameters. The animals treated with butaphosphan and cyanocobalamin had lower ($P<0.05$) somatic cell count after the third application. However, the concentrations of glucose, albumin, TPP, NEFA and the chemical and physical components of milk did not differ ($P>0.05$) among groups. In conclusion, the combination of butaphosphan and cyanocobalamin shows promising results as a source of nutrient that allows intensify physiological reactions mainly dependent phosphorylation.

Keywords: organic phosphorus, vitamin B12, milk cows, transition period.

LISTA DE FIGURAS

Artigo 1 Combined effects of butaphosphan and cyanocobalamin on the metabolism of glucose and protein in dairy cows in the postpartum period

Figure 1: Mean plasma glucose levels (mg/dL) of milky cows submitted to successive applications of butaphosphan and cyanocobalamin. Mean glucose levels in the control group (CON n=11; NaCl 0.9%; 20 mL/animal) prior to insulin application (a); Mean plasma glucose levels (mg/dL) in the catosal group (ABC n=10; 20 mL Catosal® B12®/animal per application) prior to insulin application (b); Mean plasma glucose levels (mg/dL) in the control group (CON n=11; NaCl 0.9%; 20 mL/animal) after insulin application (c); Mean plasma glucose levels (mg/dL) in the catosal group (ABGC n=10; 20 mL Catosal® B12®/animal per application) after insulin application (d). 44

Figure 2: Animal body weight average (kg) on days 8 and 28 postpartum in the control group (CON n=11; NaCl 0.9%; 20 mL/animal) and Catosal group (ABC n=10; 20 mL Catosal® B12®/animal per application). Distinct letters show a P<0.05 difference..... 45

Artigo 2: Butafosfan e cianocobalamina: efeito na recuperação da glândula mamária de vacas leiteiras após o tratamento de mastite clínica.

Figura 1: CL = Coleta de Leite. CS = Coleta de Sangue. A) Protocolo de terapia antimicrobiana das vacas diagnosticadas com mastite leve, manejo experimental e suplementação dos grupos Grupo CON e Grupo BFC. B) Protocolo de terapia antimicrobiana das vacas 74

Figura 2: Contagem (Células/mL) de CCS (contagem de células somáticas) de vacas suplementadas com placebo (Grupo CON, n=15) ou com 10mg de butafosfan + 5µg de cianocobalamina/kg de PV (Grupo BFC, n=17) 75

LISTA DE TABELAS

Artigo 1 Combined effects of butaphosphan and cyanocobalamin on the metabolism of glucose and protein in dairy cows in the postpartum period

Table 1: Diet composition and daily feeding during postpartum period of the dairy cows.....	38
Table 2: Chemical composition (%) of feed.....	39
Table 3: Effects of the use of successive doses of a butaphosphan and cyanocobalamin combination on the glucose tolerance test (GTT0-60min), half life rate, metabolism rate and area under the curve (AUC) of dairy cows	40
Table 4: Effects of the use of successive doses of a butaphosphan and cyanocobalamin combination on average daily weight gain (ADG) (kg), milk production (kg), NEFA (mmol/L), phosphorus (mg/dL), glucose (mg/dL), albumin (g/L), AST (U/L) and CK (U/L) levels.....	41

Artigo 2: Butafosfan e cianocobalamina: efeito na recuperação da glândula mamária de vacas leiteiras após o tratamento de mastite clínica.

Tabela 1. Ingredientes e composição nutricional da dieta fornecida às vacas após cada ordenha.	69
Tabela 2: Concentração plasmática de glicose (mg/dL), albumina (g/L), PPT (mg/dL) e AGNES (mmol/L) de vacas suplementadas com placebo (Grupo CON, n=15) ou com 10mg de butafosfan+5µg de cianocobalamina/kg de PV (Grupo BFC, n=17).	70
Tabela 3: Média da concentração (%) de lactose, proteína, caseínas totais, ureia, sólidos totais e pH de vacas suplementadas com placebo (Grupo CON, n=15) ou com 10mg de butafosfan + 5µg de cianocobalamina/kg de PV (Grupo BFC, n=17)	71
Tabela 4: Parâmetros físicos do leite de crioscopia (°C) e densidade (g/mL) de vacas suplementadas com placebo (Grupo CON, n=15) ou com 10mg de butafosfan+5µg de cianocobalamina/kg de PV (Grupo BFC, n=17).	73

LISTA DE ABREVIATURAS

ADG	Daily Weight Gain
ADF	Acid Detergent Fibre
AGNE	Ácido Graxo Não Esterificado
AST	Aspartato Amino Transferase
AST	Aspartate Aminotransferase
ATP	Adenosina Trifosfato
AUC	Area under the curve
BW	Body Weight
CCS	Contagem de Células Somática
CK	Creatino quinase
CK	Creatine kinase
CL	Coleta de Leite
CS	Coleta de Sangue
DMI	Dry Matter intake
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracido
FDA	Fibra Detergente Ácido
FDN	Fibra Detergente Neutro
GTT	Glucose tolerance tests
KF	Fluoreto de potássio
NDF	Neutral Detergent Fiber
NEB	Negative Energy balance
NEFA	Non esterified Fatty acids
NF-KB	Fator Nuclear Kappa B
NRC	Nutrient Requirements Council
PPT	Proteínas Plasmáticas Totais

PV	Peso Vivo
SCC	Somatic Cell count
TPP	Total Plasma Proteins

Sumário

1. Introdução.....	15
2. Objetivos.....	18
3. Artigos.....	19
3.1. Artigo 1: Combined effects of butaphosphan and cyanocobalamin on the metabolism of glucose and protein in dairy cows in the postpartum period.....	19
3.2. Artigo 2: Butafosfan e cianocobalamina: efeito na recuperação da glândula mamária de vacas leiteiras após o tratamento de mastite clínica.....	46
4. Conclusão Geral	76
5. Referências.....	77

1. Introdução

A produção de leite é uma atividade altamente complexa, demandando cuidados que envolvem sanidade, nutrição, reprodução, máquinas, equipamentos e ambiente. Este sistema produz um alimento de alto valor biológico, que é composto por água (87 a 88%), proteínas (3,3 a 3,5%), gordura (3,3 a 3,8%), lactose (4,5 a 5%), além de minerais e vitaminas (0,5 a 1%) (Sgarbieri, 2005). Levando em conta esta composição química e uma produção de leite equivalente a 12.400 kg/vaca/ano (Santos *et al.*, 2010), estima-se que são drenados anualmente pela glândula mamária de uma vaca, aproximadamente, 400 kg de proteína e 434 kg de gordura.

Atingir um nível de produção leiteira anual similar a este e, ainda, manter a saúde dos animais, tem sido um grande desafio, principalmente, devido ao intenso metabolismo que é peculiar da fisiologia da vaca leiteira. Esta grande demanda está relacionada à síntese de colostro no pré-parto, passando pela produção de leite, que é crescente nas primeiras semanas (Castaneda-Gutierrez *et al.*, 2009). Durante este período de transição (3 semanas pré-parto a 3 semanas pós-parto), ocorre uma ingestão de energia através da dieta insuficiente para atender à demanda para a produção de leite, caracterizando assim um balanço energético negativo (Heuer *et al.*, 2000).

Esta produção das primeiras semanas demanda grandes quantidades de glicose pela glândula mamária para síntese de lactose (Kronfeld, 1982, Mattmiller *et al.*, 2011), que representa o principal regulador da pressão osmótica determinando, parcialmente, o volume de leite. A fim de atender essas necessidades de glicose, o organismo desenvolve um mecanismo de resistência à insulina nos tecidos periféricos para que a glicose seja direcionada para glândula mamária. Este fato tem uma correlação positiva com a produção de vacas leiteiras (Gutierrez *et al.*, 2006, Chagas *et al.*, 2009, Zhang *et al.*, 2013).

Esta resistência pode ser associada a uma diminuição da secreção de insulina pelo pâncreas (Ning *et al.*, 2011) ou, ainda, pela diminuição da expressão dos receptores de insulina nos tecidos periféricos (Tsuruzoe *et al.*, 2001). A partir disso, essas células aproveitam outros compostos doadores de carbono para manutenção do equilíbrio energético. Destes podem ser

utilizados os ácidos graxos não esterificados (AGNE), obtidos do tecido adiposo (Ning *et al.*, 2011), e aminoácidos advindos das proteínas plasmáticas e musculares (De Koster and Opsomer, 2013), que serão destinados a rotas neoglicogênicas para síntese de ATP (Ruan and Lodish, 2003, Lorenzo *et al.*, 2008, Pires *et al.*, 2013), permitindo atender as demanda energética celular..

Outro ponto crucial na saúde das vacas leiteiras são as doenças causadas por agentes infecciosos como bactérias, fungos e vírus (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007). Entre as mais importantes, a mastite tem demonstrado maior relevância por causar prejuízos ao sistema de produção e na indústria de laticínios (Mehrzaad *et al.*, 2004). A mastite pode ocorrer de duas formas: clínica ou subclínica, classificadas de acordo com a avaliação da glândula mamária (Shim *et al.*, 2004). A mastite clínica ainda é classificada conforme o grau de acometimento em leve (somente alterações físicas do leite), moderado (com alterações físicas do leite e sinais de clínicos locais de dor, edema, hiperemia) ou grave (alterações físicas do leite e sinais clínicos sistêmicos) (Parra *et al.*, 2009). Após a confirmação do diagnóstico e a classificação do grau de acometimento, é estabelecida a terapia de eleição, que é diferente em cada situação, optando-se por tratamento tópico e/ou sistêmico de antibiótico e, elementos de suporte para uma melhor resposta aos tratamentos. Para cada terapia tem sido testada varias combinações de princípios ativos, e com isso permitindo a montagem de protocolos de acordo com a capacidade de resolução de cada quadro clínico (Bradley and Green, 2009, Kleen *et al.*, 2009, Schukken *et al.*, 2011).

A contagem de células somáticas (CCS) é considerada como indicador de saúde da glândula mamária (Boutet *et al.*, 2004). Estas células somáticas são compostas por células epiteliais de descamação, linfócitos, macrófagos e neutrófilos, sendo que este último pode representar mais de 90% do total de células (Kehrli and Shuster, 1994, Sharif and Muhammad, 2008, Sharma *et al.*, 2011). No momento que a glândula é agredida são liberados citocinas pró-inflamatórias (prostaglandinas, interleucinas, fator de necrose tumoral, entre outras), que atraem células leucocitárias para o local, a fim de aumentar a capacidade fagocitária (Paape *et al.*, 2003, Boutet *et al.*, 2004, Oviedo-Boyso *et al.*, 2007).

Em animais debilitados a resposta imune celular pode ser insuficiente, seja por ocorrência de outras infecções, ou por alterações metabólicas (Moyes *et al.*, 2009, Parra *et al.*, 2009). Estas alterações cursam com diminuição da capacidade fagocitária (Hammon *et al.*, 2006) ou mitogênica, que por conseguinte disponibiliza um menor número de células com capacidade de resposta inflamatória. Outros estudos têm demonstrado que em altas concentrações de AGNE, os neutrófilos apresentam baixa capacidade fagocitária (Scalia *et al.*, 2006).

Diante desses desafios da produção leiteira, é crescente a demanda por tecnologias que permitam a manutenção da alta produtividade, além de preservar a saúde e a lucratividade do sistema. Dentre elas, a associação de butafosfan, que é uma fonte de fósforo orgânico com a cianocobalamina, que é uma vitamina do complexo B, tem demonstrado efeito sobre a cetose (Rollin *et al.*, 2010), oxidação dos ácidos graxos no fígado (Kreipe *et al.*, 2011), produção leiteira (Pereira *et al.*, 2013b), ingestão de matéria seca e sobre o balanço energético (Furll *et al.*, 2010).

Com base nisso, este estudo foi estratificado em dois experimentos com as seguintes hipóteses: *experimento 1*: a associação de butafosfan e cianocobalamina intensifica a resistência de tecidos periféricos a insulina, disponibilizando maior quantidade de glicose para a produção de leite em vacas leiteiras; *experimento 2*: a associação de butafosfan e cianocobalamina auxilia a recuperação da glândula mamária em vacas leiteiras após o tratamento da mastite clínica.

2. Objetivos

Objetivo geral

Verificar o efeito da associação butafosfan e cianocobalamina em processos metabólicos de vacas leiteiras saudáveis e acometidas por mastite clínica.

Objetivos específicos

- Verificar o efeito da associação de butafosfan e cianocobalamina sobre o metabolismo glicêmico e protéico de vacas leiteiras após o parto;
- Analisar o efeito da associação de butafosfan e cianocobalamina sobre a recuperação da glândula mamária de vacas acometidas por mastite clínica.
- Avaliar o efeito da associação de butafosfan e cianocobalamina sobre o metabolismo energético, proteínas plasmáticas, além das características físico-químicas do leite de vacas acometidas por mastite clínica;

3. Artigos

3.1. Artigo 1: Combined effects of butaphosphan and cyanocobalamin on the metabolism of glucose and protein in dairy cows in the postpartum period

Tabeleão, Vinicius Coitinho; Schwegler, Elizabeth; Weschenfelder, Marina Menocin; Krause, Ana Rita Tavares, Schneider, Augusto; Montagner, Paula; Schmitt, Eduardo; Pereira, Rubens Alves; Brauner, Cassio Cassal; Rabassa, Viviane Rohrig; Del Pino, Francisco Augusto Burkert; Corrêa, Marcio Nunes.

Submetido à revista: Animal Journal

Combined effects of butaphosphan and cyanocobalamin on the metabolism of glucose and protein in dairy cows in the postpartum period

Tabeleão, Vinicius Coitinho¹; Schwegler, Elizabeth¹; Weschenfelder, Marina Menocin¹; Krause, Ana Rita Tavares¹, Schneider, Augusto^{1,5}; Montagner, Paula¹; Schmitt, Eduardo^{1,2}; Pereira, Rubens Alves¹; Brauner, Cassio Cassal^{1,4}; Rabassa, Viviane Rohrig¹; Del Pino, Francisco Augusto Burkert^{1,3}; Corrêa, Marcio Nunes¹.

¹Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC), Departamento de Clínicas Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, CEP: 96010-900, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil;

²Centro de Pesquisa Agroflorestal de Rondônia – Embrapa CPAF, BR 364 - Km 5,5 - Zona Rural, Caixa Postal 127 - CEP 76815-800, Porto Velho, Rondônia, Brazil;

³ Departamento de Bioquímica, CCQFA, Universidade Federal de Pelotas, CEP: 96010-900, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil;

⁴ Departamento de Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, CEP: 96010-900, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil;

⁵ Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, CEP: 96010-610, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil.

Corresponding author: Vinicius Coitinho Tabeleão. E-mail:

vinicius.tabeleao@gmail.com

Effects of butaphosphan and vitamin B12 on the metabolism

Abstract

The aim of this study was to investigate the combined effects of butaphosphan and cyanocobalamin on the metabolism of glucose and protein in dairy cows in the postpartum period. Twenty one dairy cows which were divided into two groups were used: the Control Group (CON, n= 11), which was given a placebo (20 mL/animal 0.9 % NaCl), and the Treatment group (ABC, n= 10) which was administered a solution containing 2 g Butafosfan and 1000 µg Cyanocobalamin (20 mL/animal Catosal[®] B₁₂), both by intramuscular route, on days 7, 12, 17, 22 and 27 postpartum. Blood samples were taken on these days for the evaluation of plasma concentrations of phosphorus, glucose, NEFA, albumin, aspartate aminotransferase (AST) and creatine kinase (CK). On days 7 and 28 postpartum, the animals were weighted and subjected to the glucose tolerance and insulin challenge tests. The treatment promoted weight loss (ABC 40.4 kg, CON 10.73 kg, P<0.05) and increased AST (ABC 62.92 ±3.31U/L, CON 53.11 ±3.49U/L, P<0.05) and CK levels (ABC 134.09 ±19.08U/L, CON 79.43 ±18.27U/L). The groups did not differ as to glucose metabolism and half-life rates and area under the curve on days 8 and 28; the treated animals, however, showed higher mean serum glucose levels (P<0.05) after insulin administration on day 28 postpartum (97.54 ±8.54mg/dL) as compared to day 8 (83.01 ±8.54mg/dL). It could be concluded that the combined use of butaphosphan and cyanocobalamin interferes with the adaptation of glucose metabolism and promotes protein catabolism in dairy cows in early lactation.

Key words: Phosphorus, vitamin B12, glucose, insulin resistance

51 **Implications**

52 Previous studies involving the butaphosphan and cyanocobalamin combination
53 in dairy cows showed improvement in energy status and increase milk
54 production. However, the metabolic pathways that justify these results have not
55 been fully clarified. Thus, this study provides a possible action mechanism of
56 these combination, which can be justified by reduction of the glucose
57 metabolism by peripheries tissues and consequent increase their blood
58 availability. This dynamic provides greater availability of glucose to mammary
59 gland and increased milk production. Furthermore, increased of AST and CK
60 blood concentration, indicate possible catabolism of skeletal muscle due to
61 lower glucose supply, targeted to mammary gland.

62

63 **Introduction**

64 The use of different tools has contributed to the generation of dairy cows
65 with higher production capacity, and, consequently, higher metabolic demands
66 (Patton *et al.*, 2007). These demands are mainly due to the synthesis of
67 colostrum in the prepartum period as well as the synthesis of milk in the
68 postpartum, causing metabolic changes in homeostatic and adaptive processes
69 that characterize this transition period (Castaneda-Gutierrez *et al.*, 2009). In
70 addition, the low dry matter intake (DMI) in this period may further exacerbate
71 metabolic alterations and increase the negative energy balance (NEB) (Heuer
72 *et al.*, 2000).

73 Milk production, which increases in the first weeks postpartum, also
74 increases the demand for glucose by the mammary gland (Mattmiller *et al.*,

2011), which requires 72 g glucose per liter of milk produced (Kronfeld, 1982). Some studies have demonstrated that milk production is positively correlated with peripheral insulin resistance, therefore the greater the genetic merit of the herd, the higher the milk production and the higher the insulin resistance and, thus, the lower the glucose metabolism by peripheral tissues (Chagas *et al.*, 2009, Zhang *et al.*, 2013).

This peripheral insulin resistance is characterized by a decrease in the passage of glucose into the cell, which may be due to a lower expression of insulin receptors (Tsuruzoe *et al.*, 2001) or to the lower production of this hormone by the pancreas (Ning *et al.*, 2011). As a result, peripheral tissues make use of different compounds as energy sources, such as non-esterified fatty acids (NEFA), which are provided by adipose tissue (Ning *et al.*, 2011) or amino acids arising from plasma and / or muscle proteins (De Koster and Opsomer, 2013) which are primarily intended to hepatic gluconeogenesis metabolic routes (Pires *et al.*, 2013).

The combined use of butaphosphan, an organic source of phosphorus, and cyanocobalamin, which contributes to the gluconeogenesis process (Kreipe *et al.*, 2011) has proven to have an effect on milk production and the NEB of cows (Pereira *et al.*, 2013). Furthermore, this association decreases the expression of hepatic tissue enzymes, which act on the synthesis of fatty acids, and increases the expression of the β -oxidation enzyme route (Kreipe *et al.*, 2011).

It was hypothesized that the combined use of butaphosphan and cyanocobalamin enhances peripheral insulin resistance by providing a greater amount of glucose to milk production in dairy cows. Therefore, the aim of this

study was to investigate the combined effects of butaphosphan and cyanocobalamin on the metabolism of glucose and protein in dairy cows in the postpartum period.

Material and methods

Animals and treatments

The experiment was conducted on a farm in southern Brazil (32° 16 'S, 52 67° 32' E) in a pasture production system plus concentrate supplementation after milking. Twenty one cows between 2 and 4 lactations which did not show any clinical problems throughout the experimental period were selected. On days 7, 12, 17, 22 and 27 postpartum, the cows were assigned to the following treatments: The Control Group (CON, n=11) was administered saline (20 mL/animal 0.9 % NaCl) by intramuscular injection, and the Treatment Group (ABC, n= 10) was administered 2g butaphosphan + 100 µg cyanocobalamin (20 mL per animal per application Catosal® B12 Bayer Health Care, São Paulo, Brazil) by intramuscular injection. The average weight of the selected cows at the beginning of the experiment was 588.43 ±57.3 kg and their body condition score varied between 2 and 3.5 (7.14 % presented score 2; 35.71 % presented score 2.5; 35.71 % presented score 3, and 21.43 % presented score 3.5). Of these, being one very thin and five very fat (Wildman et al., 1982). The cows were milked twice a day (at 5 a.m. and at 5 p.m.) and were supplemented after milking. The diet (Tables 1 and 2) was formulated based on nutritional requirements (NRC, 2001). Between milkings, the animals had *ad libitum*

access to water and pasture, which consisted of forage sorghum. Milk production was recorded daily by the ALPRO® Windows software (DeLaval, Kansas City, Mo, USA).

Sampling and biochemical analyses

Blood samples were taken on the days of treatment administration (days 7, 12, 17, 22 and 27 postpartum), prior to its application. The samples were put into two tubes - tube 1, containing 10 % EDTA and glycolysis pathway inhibitor (12 % potassium fluoride), and tube 2, containing only blood. The samples were then centrifuged at 1800 X g for 15 min and frozen at -20° C for subsequent biochemical analyzes, except glucose determination, which was done immediately.

The metabolites evaluated were plasma glucose, phosphorus, albumin, aspartate aminotransferase (AST) and creatine kinase (CK) by using commercial kits (Labtest® Diagnóstica S.A., Brazil). The plasma concentration of non-esterified fatty acids (NEFA) was obtained by using a commercial kit (Wako NEFA-HR, Wako Chemicals, USA®) and was performed according to the micromethod(Ballou et al., 2009) by using a plate reader (Thermo Plate® TP-Reader, São Paulo, Brazil): All the other metabolites were analyzed by colorimetric reaction by Visible Light Spectrophotometer (CELM SB 190®, Companhia Equipadora de Laboratórios Modernos – CELM, Brazil).

Glucose tolerance tests (GTT) and insulin administration

On days 8 and 28 postpartum, the animals were weighed and subjected to jugular vein catheterization immediately after milking and before feed supplementation in order to perform the glucose tolerance (GTT) and insulin challenge tests. GTT was done by considering glucose infusion as time zero, and the glucose levels at -5, 0, 15, 30, 45 and 60 minutes after administration were measured to determine the area under the curve (AUC).

To calculate the AUC for glucose, the area of the trapezoid formed between two subsequent samplings was used (Regnault et al., 2004), taking into consideration changes in relation to the baseline level of each individual ($\text{Area} = (\text{Value Collection 1} - \text{Average of the two baseline collections} + \text{Value Collection 2} - \text{Average of the two baseline collections}) * \text{Interval between collections} / 2$).

The glucose metabolic rate (δ) was defined as the speed of its metabolization ($\text{natural log } iT_{(15 \text{ min})} - \text{natural log } fT_{(60 \text{ min})} / fT_{\text{difference}(60 \text{ min}) - iT_{(15 \text{ min})}} * 100$, where iT means initial time and fT means final time. The time required for glucose to reach half the initial concentration was defined as its half-life rate ($T_{1/2 \text{ min}} = 100 * (0,693/\delta)$) (Chagas et al., 2009).

Sixty minutes after glucose infusion, 0.1 UI/kg body weight insulin was applied, and the glucose disappearance rate was calculated by determining glycemia at 60, 65, 70, 75, 90, 120, 150 and 180 min after glucose infusion.

Statistical analysis

The data were analyzed by considering animals as experimental units. All variables were subjected to the test of normality by the Shapiro-Wilk test ($p > 0.90$) through the UNIVARIATE Procedure. The variables means was

compared was made using the MIXED MODEL procedure, and the approach to determine the degrees of freedom in the denominator was performed by Satterthwaite for tests of fixed effects. The analyses of glucose application and the pre and post insulin application periods, serum, mean serum glucose, phosphorus, AST, CK and NEFA levels, body weight and milk production were compared between treatments, as well as the time of collection and their interaction (Littell et al., 1998) by means of analysis of variance with repeated measures. The autoregressive covariance structure provided the best fit for the analyses according to Akaike's information criterion. However, the first collection was considered as a covariate to make up for initial differences between treatments, being thus included in blood metabolite profiles in the statistical model, except for CK activity, which showed non normal distribution and was consequently analyzed by the nonparametric test by the NPAR1WAY procedure and a one-way classification. In addition, the animals were considered as random effects within treatments. The analyses of the half-life and metabolism rates, area under the cover of glucose and daily weight gain of the animals were individually compared between treatments by means of analysis of variance. The results were presented as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). All statistical analyses were performed using the SAS software (Littell *et al.*, 1998. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Differences were considered significant when $P \leq 0.05$.

Results

The half-life, metabolism and AUC glucose rates which were determined between 0 and 60 minutes ($GTT_{0-60min}$, Table 3) on days 8 and 28 postpartum did not differ ($P>0.05$) between treatments. Nevertheless, the insulin challenge showed an interaction between group and collection ($P=0.02$) in mean plasma glucose levels after insulin administration (between 60 and 180 minutes) in the ABC (Figure 1); on day 8 postpartum, the mean glucose levels (83.01 ± 8.54 mg/dL) were lower than those on day 28 postpartum (97.54 ± 8.54 mg/dL). The same effect, however, was not observed in the CON ($P>0.05$) (Figure 1). In spite of this, mean plasma glucose levels did not differ between treatments and collections ($P>0.05$) on application days (Table 4). As to the period before insulin administration, no differences were observed between treatments, collections and their interactions ($P>0.05$) (Figure 1).

The body weight (Figure 2) of the animals in the ABC was lower ($P=0.0046$) on day 28, as compared to their weight on day 8. Also, differences between groups on day 28 were observed ($P=0.0433$). Thus, the average daily weight gain (kg) (Table 4) was lower ($P=0.0088$) for ABC animals when compared to the CON. As to milk production (Table 4), differences between collections were observed ($P=0.03$), though there were no significant differences between groups, or in the group - collection interaction.

Plasma concentrations of phosphorus, albumin and NEFA (Table 4) obtained during treatment did not differ ($P>0.05$) between groups, collections and their interactions. However, CK and AST activities were higher in the ABC ($P=0.04$ and $P=0.05$, respectively) as compared to the CON, but there were no

significant differences between the collections and the group - collection interaction ($P>0.05$).

Discussion

The higher CK ($P=0.04$) and AST ($P=0.05$) activities - the former muscle tissue specific and the latter found both in liver and muscle tissues (Shpigel *et al.*, 2003) – observed in the ABC suggests greater muscle catabolism in the treated animals (Table 4) as contrasted with the CON, which gained weight during the experimental period. Still, a previous study used a similar treatment, found no changes in the muscle and lipid deposition of the animals, once the evaluation method used was body condition score (Pereira *et al.*, 2013). This methodology shows low sensitivity to detect small body weight variations, besides being subjective and demanding many observations (Loker *et al.*, 2013, Pires *et al.*, 2013).

Furthermore, the weight loss may result from a reduction in the glucose supply to the skeletal muscle due to a reduced expression of insulin receptors, which are necessary for the internalization of insulin through glucose transporter type 4 (GLUT4) (Abe *et al.*, 1997, Duehlmeier *et al.*, 2013, Zhang *et al.*, 2013). This decrease in receptor expression has been demonstrated by other studies as being a physiological mechanism (Bell and Bauman, 1997, Kerestes *et al.*, 2009) which aims to decrease glucose use by peripheral tissues and increase its availability to the mammary gland (Bell, 1995, Mattmiller *et al.*, 2011). This also increases the availability of amino acids for gluconeogenesis (Roche *et al.*, 2009, De Koster and Opsomer, 2013), promoting the conversion of methyl malonyl-CoA into succinyl-CoA by methyl malonyl-CoA mutase, which is

246 cyanocobalamin-dependent. This is an important route for the entry of
247 propionate into the Krebs Cycle to synthesize energy (Furll *et al.*, 2010). This
248 adaptive mechanism (Roche *et al.*, 2009) could be observed in the treated
249 animals (Figure 1) which, after insulin administration, showed a decreased
250 glucose metabolism at the end of the treatment (28 days postpartum) as
251 compared to the beginning (8 days postpartum).

252 Therefore, the weight loss and muscle catabolism observed in the animals
253 treated may be related to the high energy demand generated by an increased
254 milk production (Roche *et al.*, 2006, Chagas *et al.*, 2009), which was 5.2 kg/day
255 higher for the ABC animals (Table 4). This may have resulted from the
256 synthesis of lactose, which occurs from glucose. The former is responsible for
257 50% of the osmotic pressure, partially determining the milk volume (Boutinaud
258 *et al.*, 2008). The fact that there were no differences in milk production is due to
259 the high dispersion of this variable; thus, a larger number of observations are
260 needed (El Faro and Albuquerque, 2003). Besides, this was not the central
261 hypothesis of this study, other authors have already demonstrated an increase
262 in the production of dairy cows supplemented with 5 doses of 1000 mg
263 butaphosphan and 0.5 mg cyanocobalamin (Pereira *et al.*, 2013), or 3 doses of
264 10 mg butaphosphan and 0.05 mg cyanocobalamin/kg body weight (Kreipe *et al.*, 2011).

266 As to GTT_{0-60min}, no differences in half life and glucose degradation rates and
267 area under the curve (Table 3) were found. These results suggest that the
268 homeostatic mechanisms of glucose metabolism which are mediated by
269 endogenous insulin (Balogh *et al.*, 2009) were not altered by the successive

associated doses of butaphosphan and cyanocobalamin, thus keeping a constant transport speed of plasma into the cells (Duehlmeier *et al.*, 2013).

Similarly, plasma levels of the other metabolites evaluated were not altered by supplementation,. This can be attributed to either the low butaphosphan plasma half life, once it can be detected in the urine flow 116 minutes after intravenous application (EMEA, 2000) or to its use in the phosphorylation of proteins that act on energy metabolism pathways (Grunberg *et al.*, 2009). The same was true for mean albumin levels, thus demonstrating that the hepatic conditions of protein anabolism and catabolism, as well as the supply of dietary protein (Raggio *et al.*, 2007), were similar for both groups, being suitable for the transition period but lower than those of cows over 100 days of lactation (Alberghina *et al.*, 2011). Likewise, NEFA, which measures the intensity of lipolysis in the adipose tissue (Patton *et al.*, 2007, Rocco and McNamara, 2013), showed molar equivalence between groups, signaling there were no lipolysis differences between treatments.

Therefore, this study suggests that the combined use of butaphosphan and cyanocobalamin has the ability to enhance the adaptive physiological processes of the glucose metabolism, as well as influence the rate of muscle protein metabolism in dairy cows, which integrate the transition period.

Conclusion

The combined methaphylacticuse of butaphosphan and cyanocobalamine interferes with the glucose metabolism and muscle protein catabolism in dairy cows during the negative energy balance period.

References

- Abe H, Morimatsu M, Nikami H, Miyashige T and Saito M 1997. Molecular cloning and mRNA expression of the bovine insulin-responsive glucose transporter (GLUT4). *Journal of Animal Science* 75, 182-188.
- Alberghina D, Giannetto C, Vazzana I, Ferrantelli V and Piccione G 2011. Reference intervals for total protein concentration, serum protein fractions, and albumin/globulin ratios in clinically healthy dairy cows. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23, 111-114.
- Ballou MA, Gomes RC, Juchem SO and DePeters EJ 2009. Effects of dietary supplemental fish oil during the peripartum period on blood metabolites and hepatic fatty acid compositions and total triacylglycerol concentrations of multiparous Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 92, 657-669.
- Balogh O, Kovacs K, Kulcsar M, Gaspardy A, Zsolnai A, Katai L, Pecsí A, Fesus L, Butler WR and Huszenicza G 2009. AluI polymorphism of the bovine growth hormone (GH) gene, resumption of ovarian cyclicity, milk production and loss of body condition at the onset of lactation in dairy cows. *Theriogenology* 71, 553-559.
- Bell AW 1995. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of Animal Science* 73, 2804-2819.
- Bell AW and Bauman DE 1997. Adaptations of Glucose Metabolism During Pregnancy and Lactation. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2, 265-278.

- 319 Boutinaud M, Ben Chedly MH, Delamaire E and Guinard-Flament J 2008.
320 Milking and feed restriction regulate transcripts of mammary epithelial cells
321 purified from milk. J Dairy Sci 91, 988-998.
- 322 Castaneda-Gutierrez E, Pelton SH, Gilbert RO and Butler WR 2009. Effect of
323 peripartum dietary energy supplementation of dairy cows on metabolites,
324 liver function and reproductive variables. Anim Reprod Sci 112, 301-315.
- 325 Chagas LM, Lucy MC, Back PJ, Blache D, Lee JM, Gore PJ, Sheahan AJ and
326 Roche JR 2009. Insulin resistance in divergent strains of Holstein-Friesian
327 dairy cows offered fresh pasture and increasing amounts of concentrate in
328 early lactation. J Dairy Sci 92, 216-222.
- 329 De Koster JD and Opsomer G 2013. Insulin resistance in dairy cows. Vet Clin
330 North Am Food Anim Pract 29, 299-322.
- 331 Duehlmeier R, Noldt S and Ganter M 2013. Pancreatic insulin release and
332 peripheral insulin sensitivity in German black headed mutton and Finish
333 Landrace ewes: evaluation of the role of insulin resistance in the
334 susceptibility to ovine pregnancy toxemia. Domest Anim Endocrinol 44,
335 213-221.
- 336 El Faro L and Albuquerque LG 2003. Estimaco de Parâmetros Genéticos para
337 Produção de Leite no Dia do Controle e Produção Acumulada até 305
338 dias, para as Primeiras Lactaçes de Vacas da Raça Caracu. R. Bras.
339 Zootec 32, 284-294.
- 340 EMEA 2000. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect (Butafosfan
341 - Extension to lactating cows). The European Agency for the Evaluation of
342 Medicinal Products Veterinary Medicines and Information Technology
343 Unuit.

- 344 Furll M, Deniz A, Westphal B, Illing C and Constable PD 2010. Effect of multiple
345 intravenous injections of butaphosphan and cyanocobalamin on the
346 metabolism of periparturient dairy cows. J Dairy Sci 93, 4155-4164.
- 347 Grunberg W, Staufienbiel R, Constable PD, Dann HM, Morin DE and Drackley
348 JK 2009. Liver phosphorus content in Holstein-Friesian cows during the
349 transition period. J Dairy Sci 92, 2106-2117.
- 350 Heuer C, Van Straalen WM, Schukken YH, Dirkzwager A and Noordhuizen
351 JPTM 2000. Prediction of energy balance in a high yielding dairy herd in
352 early lactation: model development and precision. Livestock Production
353 Science 65, 91-105.
- 354 Kerestes M, Faigl V, Kulcsar A, Balogh O, Foldi J, Febel H, Chilliard Y and
355 Huszenicza G 2009. Periparturient insulin secretion and whole-body
356 insulin responsiveness in dairy cows showing various forms of ketone
357 pattern with or without puerperal metritis. Domestic Animal Endocrinology
358 37, 250-261.
- 359 Kreipe L, Deniz A, Bruckmaier RM and van Dorland HA 2011. First report about
360 the mode of action of combined butafosfan and cyanocobalamin on
361 hepatic metabolism in nonketotic early lactating cows. Journal of Dairy
362 Science 94, 4904-4914.
- 363 Kronfeld DS 1982. Major metabolic determinants of milk volume, mammary
364 efficiency, and spontaneous ketosis in dairy cows. J Dairy Sci 65, 2204-
365 2212.
- 366 Littell RC, Henry PR and Ammerman CB 1998. Statistical analysis of repeated
367 measures data using SAS procedures. Journal of Animal Science 76,
368 1216-1231.

- 369 Loker S, Bastin C, Miglior F, Sewalem A, Schaeffer LR, Jamrozik J, Osborne V
370 and Ali A 2013. Development of a genetic evaluation for body condition
371 score for Canadian Holsteins. *Journal of Dairy Science* 96, 3994-4004.
- 372 Mattmiller SA, Corl CM, Gandy JC, Looor JJ and Sordillo LM 2011. Glucose
373 transporter and hypoxia-associated gene expression in the mammary
374 gland of transition dairy cattle. *J Dairy Sci* 94, 2912-2922.
- 375 Ning J, Hong T, Yang X, Mei S, Liu Z, Liu HY and Cao W 2011. Insulin and
376 insulin signaling play a critical role in fat induction of insulin resistance in
377 mouse. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301, E391-401.
- 378 Patton J, Kenny DA, McNamara S, Mee JF, O'Mara FP, Diskin MG and Murphy
379 JJ 2007. Relationships among milk production, energy balance, plasma
380 analytes, and reproduction in Holstein-Friesian cows. *J Dairy Sci* 90, 649-
381 658.
- 382 Pereira RA, Silveira PAS, Montagner P, Schneider A, Schmitt E, Rabassa VR,
383 Pfeifer LFM, Del Pino FAB, Pulga ME and Correa MN 2013. Effect of
384 butaphosphan and cyanocobalamin on postpartum metabolism and milk
385 production in dairy cows. *Animal* 7, 1143-1147.
- 386 Pires JAA, Delavaud C, Faulconnier Y, Pomiès D and Chilliard Y 2013. Effects
387 of body condition score at calving on indicators of fat and protein
388 mobilization of periparturient Holstein-Friesian cows. *Journal of dairy*
389 *science* 96, 6423-6439.
- 390 Raggio G, Lobley GE, Berthiaume R, Pellerin D, Allard G, Dubreuil P and
391 Lapierre H 2007. Effect of protein supply on hepatic synthesis of plasma
392 and constitutive proteins in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*
393 90, 352-359.

- 394 Regnault TR, Oddy HV, Nancarrow C, Sriskandarajah N and Scaramuzzi RJ
395 2004. Glucose-stimulated insulin response in pregnant sheep following
396 acute suppression of plasma non-esterified fatty acid concentrations.
397 Reprod Biol Endocrinol 2, 64.
- 398 Rocco SM and McNamara JR 2013. Regulation of bovine adipose tissue
399 metabolism during lactation. 7. Metabolism and gene expression as a
400 function of genetic merit and dietary energy intake. Journal of dairy
401 science 96, 3108-3119.
- 402 Roche JR, Berry DP and Kolver ES 2006. Holstein-Friesian strain and feed
403 effects on milk production, body weight, and body condition score profiles
404 in grazing dairy cows. Journal of Dairy Science 89, 3532-3543.
- 405 Roche JR, Friggens NC, Kay JK, Fisher MW, Stafford KJ and Berry DP 2009.
406 Invited review: Body condition score and its association with dairy cow
407 productivity, health, and welfare. Journal of Dairy Science 92, 5769-5801.
- 408 Shpigel NY, Avidar Y and Bogin E 2003. Value of measurements of the serum
409 activities of creatine phosphokinase, aspartate aminotransferase and
410 lactate dehydrogenase for predicting whether recumbent dairy cows will
411 recover. Veterinary Record 152, 773-776.
- 412 Tsuruzoe K, Emkey R, Kriauciunas KM, Ueki K and Kahn CR 2001. Insulin
413 receptor substrate 3 (IRS-3) and IRS-4 impair IRS-1- and IRS-2-mediated
414 signaling. Mol Cell Biol 21, 26-38.
- 415 Wildman EE, Jones GM, Wagner PE, Boman RL, Troutt HF and Lesch TN
416 1982. A Dairy-Cow Body Condition Scoring System and Its Relationship to
417 Selected Production Characteristics. Journal of dairy science 65, 495-501.

418 Zhang ZG, Wang JG, Gao RF, Zhang WQ, Li XW, Liu GW, Li XB, Wang Z and
419 Zhu XL 2013. High-Energy Diet at Antepartum Decreases Insulin Receptor
420 Gene Expression in Adipose Tissue of Postpartum Dairy Cows. Bulletin of
421 the Veterinary Institute in Pulawy 57, 203-207.

422 **Table 1:** Diet composition and daily feeding during postpartum period of
 423 the dairy cows.

Feed	Kg
Forage sorghum	<i>Ad libitum</i>
Haylages	15.000
Wheat bran	1.500
Soybean bran	2.400
Rice bran	2.880
Ground corn	3.000
Ground sorghum	2.130
Mineral Supplements	0.110
Urea	0.090
Sodium bicarbonate	0.190
Calcitic limestone	0.190
Salt	0.002

424

425

426

427

428

429

430

431

432 **Table 2:** Chemical composition (%) of feed

Analyses	Forage	Haylage	Concentrate
Dry Matter	27.40	52.94	87.31
NDF ¹	64.32	63.46	32.57
ADF ²	41.74	45.75	13.14
Protein	9.84	8.88	14.92
Ether extract	2.02	2.00	4.01
Total minerals	9.99	8.84	9.02

433 ¹**NDF** = Neutral Detergent Fiber.

434 ²**ADF** = Acid detergent Fiber.

435

436

437

438

Table 3: Effects of the use of successive doses of a butaphosphan and cyanocobalamin combination on the glucose tolerance test (GTT0-60min), half life rate, metabolism rate and area under the curve (AUC) of dairy cows

Parameters	CON ¹		ABC ²		P ³
	Mean	(±) SEM	Mean	(±) SEM	
GTT D8 ⁴					
Glucose half-life rate (%)	58.46	6.71	61.90	7.04	0.73
Metabolism rate (min)	1.31	0.14	1.30	0.15	0.95
Glucose AUC ⁶ 0 – 60 mg/dL	7225.18	284.03	6719.20	297.89	0.23
GTT D28 ⁵					
Glucose half-life rate (%)	61.26	7.98	64.96	8.37	0.75
Metabolism rate (min)	1.39	0.19	1.25	0.20	0.61
Glucose AUC ⁶ 0 – 60 mg/dL	7068.45	472.61	6973.40	495.67	0.89

¹CON = Control Group (n=11; NaCl 0.9%; 20 mL/animal);

²ABC = Catosal Group (n=10; 20 mL Catosal[®] B12[®]/animal per application)

³ Probability value

⁴ GTT D8 = Glucose Tolerance Test 8 days postpartum;

⁵ GTT D28 = Glucose Tolerance Test 28 days postpartum;

⁶ AUC = Area under the Curve;

451 **Table 4:** Effects of the use of successive doses of a butaphosphan and cyanocobalamin combination on average daily weight gain
 452 (ADG) (kg), milk production (kg), NEFA (mmol/L), phosphorus (mg/dL), glucose (mg/dL), albumin (g/L), AST (U/L) and CK (U/L)
 453 levels.

Parameters	CON ¹		ABC ²		Group	Collection	P ³	Cov ⁸
	Mean	(±) SEM	Mean	(±) SEM			Group *	
Productive								
ADG ⁴ (kg)	0.502 ^b	0.63	-2.007 ^a	0.576	<0.01	†	†	†
Milk production (kg)	24.52	1.99	29.67	2.42	0.13	0.03	0.54	†
Biochemical								
NEFA ⁵ (mmol/L)	0.245	0.04	0.338	0.04	0.16	0.15	0.51	0.06
Phosphorus (mg/dL)	8.86	1.52	7.55	2.14	0.63	0.48	0.85	0.31
Glucose (mg/dL)	68.14	6.10	80.55	5.10	0.14	0.27	0.43	0.13
Albumin (g/L)	21.00	1.41	20.99	1.47	0.33	0.13	0.44	<0.01

AST ⁶ (U/L)	53.11 ^b	3.49	62.92 ^a	3.31	0.05	0.16	0.97	<0.01
CK ⁷ (U/L)	79.43 ^b	18.27	134.09 ^a	19.08	0.04	†	†	†

454 ¹CON = Control Group (n=11; NaCl 0.9%; 20 mL/animal);

455 ²ABC = Catosal Group (n=10; 20 mL Catosal[®] B12[®]/animal per application)

456 ³Probability value

457 ⁴ADG = Average Daily Gain;

458 ⁵NEFA = Non-esterified Fatty Acid;

459 ⁶AST = Aspartate aminotransferase;

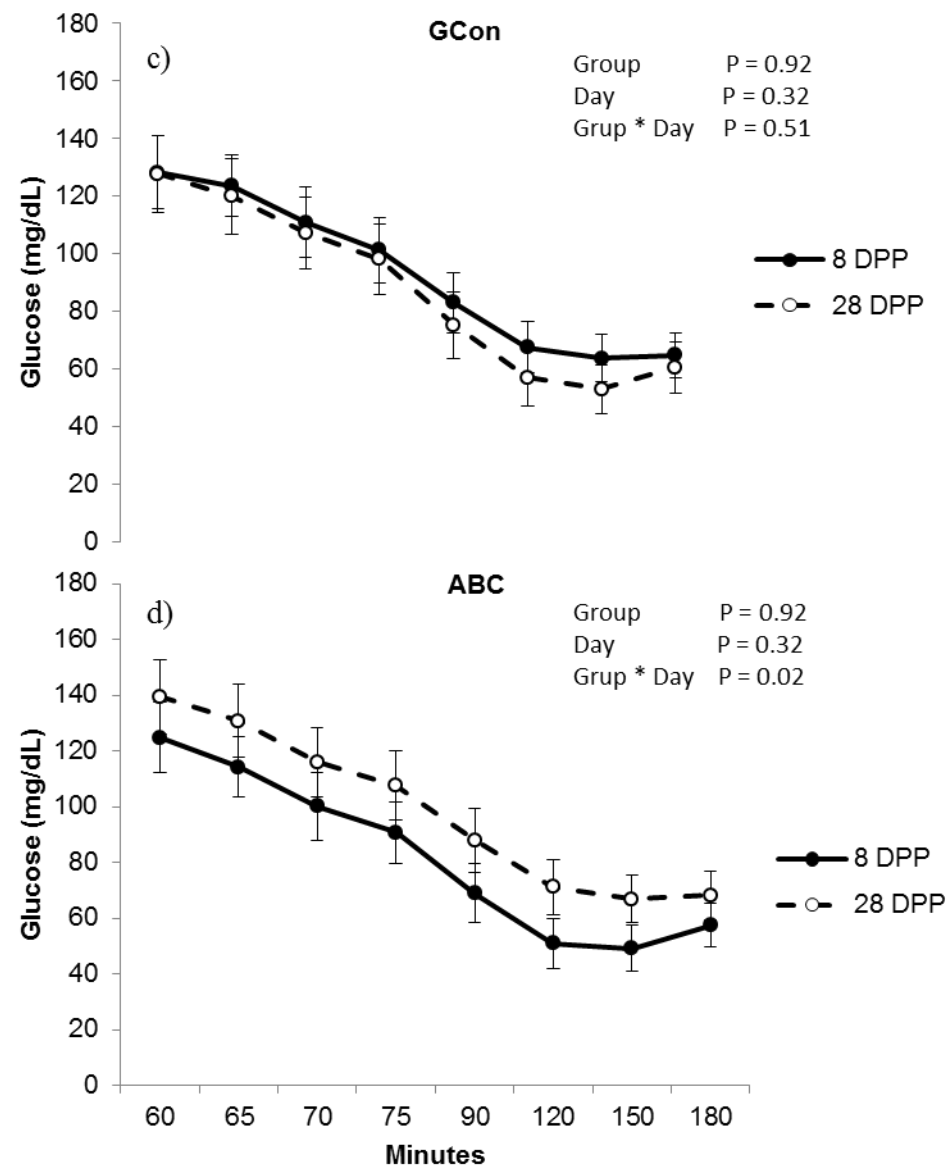
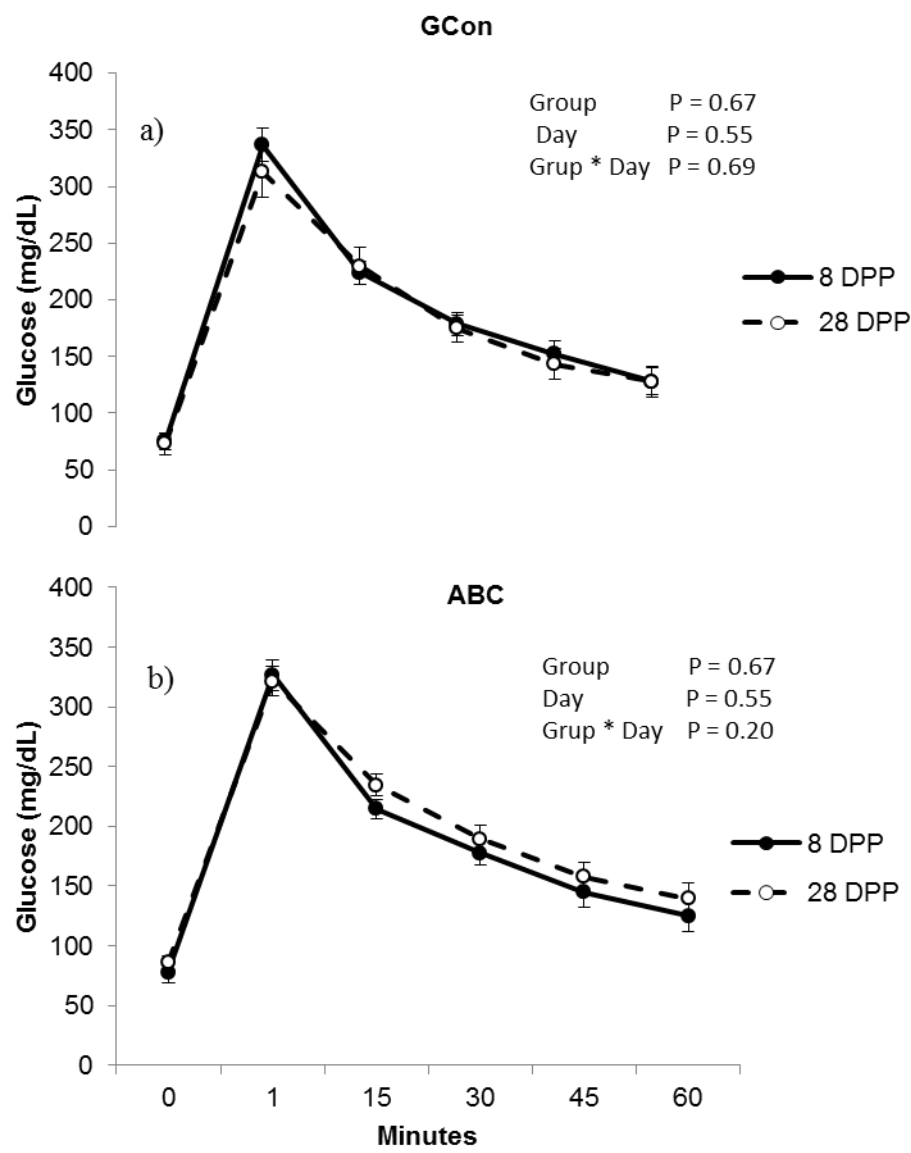
460 ⁷CK = Creatine kinase;

461 ⁸Cov = covariate;

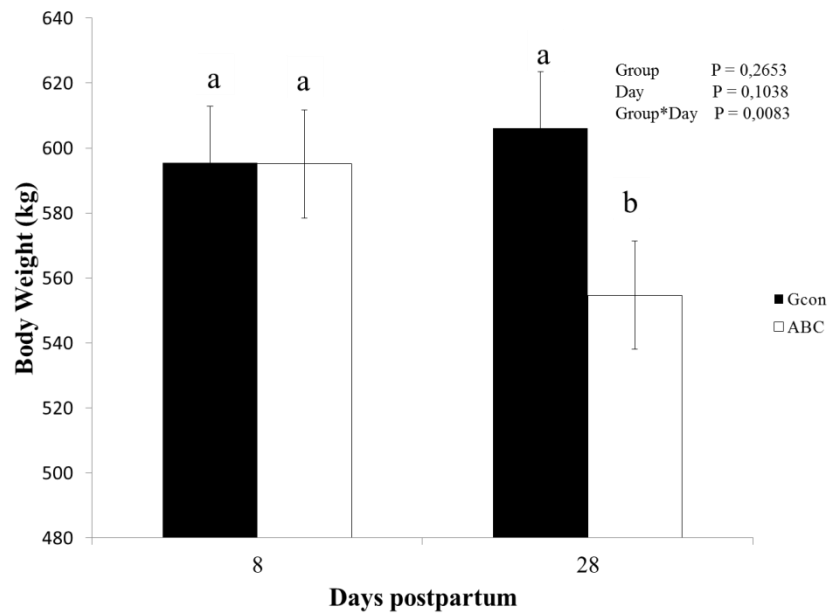
462 † = Not applicable;

463 ^{a,b} Values within a row with different superscripts differ significantly at $P<0.05$.

464



466 **Figure 1:** Mean plasma glucose levels (mg/dL) of milky cows submitted to successive applications of butaphosphan and
467 cyanocobalamine. Mean glucose levels in the control group (CON n=11; NaCl 0.9%; 20 mL/animal) prior to insulin application (a);
468 Mean plasma glucose levels (mg/dL) in the catosal group (ABC n=10; 20 mL Catosal[®] B12[®]/animal per application) prior to insulin
469 application (b); Mean plasma glucose levels (mg/dL) in the control group (CON n=11; NaCl 0.9%; 20 mL/animal) after insulin
470 application (c); Mean plasma glucose levels (mg/dL) in the catosal group (ABGC n=10; 20 mL Catosal[®] B12[®]/animal per
471 application) after insulin application (d).



472

473 **Figure 2:** Animal body weight average (kg) on days 8 and 28 postpartum in the

474 control group (CON n=11; NaCl 0.9%; 20 mL/animal) and Catosal group (ABC

475 n=10; 20 mL Catosal® B12®/animal per application). Distinct letters show a

476 P<0.05 difference

3.2. Artigo 2: Butafosfan e cianocobalamina: efeito na recuperação da glândula mamária de vacas leiteiras após o tratamento de mastite clínica

Tabeleão, Vinicius Coitinho; Pereira, Rubens Alves; Prietsch, Rafael da Fonsceca; Feijó, Josiane de Oliveira, Mattei, Patrícia; Kivel, Taís Helena; Bondan, Carlos; Schwegler, Elizabeth; Schmitt, Eduardo; Brauner, Cassio Cassal; Rabassa, Viviane Rohrig; Del Pino, Francisco Augusto Burkert; Corrêa, Marcio Nunes.

O Artigo será submetido à revista: Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition.

Artigo 2: Butafosfan e cianocobalamina: efeito na recuperação da glândula mamária de vacas leiteiras após o tratamento de mastite clínica.

Efeito do butafosfan e cianocobalamina na glândula mamária

Tabeleão, Vinicius Coitinho¹; Schwegler, Elizabeth¹; Prietsch, Rafael da Fonsceca¹; Feijó, Josiane de Oliveira¹; Bondan, Carlos^{1,5}; Mattei, Patrícia¹; Kivel, Taís Helena¹; Schmitt, Eduardo^{1,2}; Pereira, Rubens Alves¹; Brauner, Cassio Cassal^{1,4}; Rabassa, Viviane Rohrig¹; Del Pino, Francisco Augusto Burkert^{1,3}; Corrêa, Marcio Nunes¹.

¹Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC), Departamento de Clínicas Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, CEP: 96010-900, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil;

²Centro de Pesquisa Agroflorestral de Rondônia – Embrapa CPAF, BR 364 - Km 5,5 - Zona Rural, Caixa Postal 127 - CEP 76815-800, Porto Velho, Rondônia, Brazil;

³ Departamento de Bioquímica, CCQFA, Universidade Federal de Pelotas, CEP: 96010-900, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil;

⁴ Departamento de Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, CEP: 96010-900, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil;

⁵ Serviços de Análise de Rebanhos Leiteiros (SARLE). Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, CEP: 99001-970, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil.

26 Autor Correspondente: Vinicius Coitinho Tabeleão.

27 E-mail: vinicius.tabeleao@gmail.com

28

29

30

RESUMO

31 O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da associação de butafosfan e
32 cianocobalamina na recuperação de glândula mamária de vacas leiteiras após
33 o tratamento da mastite clínica. Foram utilizadas 32 vacas diagnosticadas com
34 mastite clínica e categorizadas em: Mastite Leve (n=18; somente leite
35 coagulado), tratadas com uma associação de tetraciclina (200mg), neomicina
36 (250mg), bacitracina (2000UI) e prednisolona (10mg), de aplicação
37 intramamária; Mastite Moderada (n=14; leite coagulado e sinais clínicos),
38 tratadas com sulfato de cefquinoma de uso intramamário e sulfato de
39 cefquinoma injetável. Dentro de cada categoria de mastite, dividiu-se os
40 animais em dois grupos: Controle (CON, n=15) que recebeu três aplicações i.v
41 de placebo (NaCl 0,9%; 0,1 mL/kg de PV); Grupo Tratado (BFC, n=17) que
42 recebeu três aplicações de 10mg de butafosfan+5µg de cianocobalamina/kg de
43 PV (Catosal[®] B₁₂, Bayer Health Care, São Paulo, Brasil), com intervalos de
44 cinco dias entre as suplementações. Amostras de sangue foram coletadas
45 após cada ordenha, nos tempos -12, 12 e 36 horas em relação a
46 suplementação, para as avaliações das concentrações plasmáticas de glicose,
47 albumina, proteínas plasmáticas totais (PPT) e ácidos graxos não esterificados
48 (AGNES). Amostras de leite foram coletadas individualmente por amostragem
49 da ordenha completa, sendo realizada nos períodos de -12, 0, 12, 24 e 36
50 horas em relação a cada suplementação, para análise das concentrações de

51 proteína, caseínas totais, lactose, gordura, sólidos totais e ureia, além da
52 determinação do pH, da crioscopia, da densidade e contagem de células
53 somáticas (CCS). As análises comparativas entre as mastites, leve e
54 moderada, não diferiram em nenhum dos parâmetros ($P>0,05$). A CCS média
55 no grupo BFC (373.760 ± 180.610 células/mL) foi menor ($P=0,02$) após a
56 terceira dose de BFC, quando comparado com o grupo CON ($1.112.630$
57 ± 405.810 células/mL). O peso corporal, as concentrações de glicose, albumina,
58 PPT, AGNES e os componentes químicos e físicos do leite também não
59 diferiram ($P>0,05$) entre os grupos. Nossos resultados mostram que a
60 suplementação com butafosfan e cianocobalamina após o tratamento da
61 mastite clínica de vacas leiteiras pode contribuir para o processo de
62 recuperação da glândula mamária.

63
64 **Palavras chave:** mastite clínica, butafosfan, vitamina B12, vacas leiteiras.

68 ABSTRACT

69 The aim of this study was to evaluate the effects of butaphosphan and
70 cyanocobalamin (BFC) supplementation on the recovery of mammary gland in
71 dairy cows after clinical mastitis treatment. Thirty two cows diagnosed with
72 clinical mastitis were categorized into two groups: Mild mastitis (n=18; just
73 coagulated milk), treated with a combination of tetracycline (200mg), neomycin
74 (250 mg) , bacitracin (2000IU) and prednisolone (10 mg), of intramammary
75 application; and Moderate mastitis (n=14; coagulated milk and clinical signs),
76 treated with intramammary cefquinome and an injection of cefquinome sulfate.
77 Within each mastitis category, the animals were divided into two groups: control
78 (CON, n=15), that received three applications of placebo i.v. (0.9% NaCl, 0.1
79 ml/kg BW) and treatment group (BFC, n=17) that received three injections,
80 every five days, of 10mg butaphosphan +5mg cyanocobalamin/kg BW
81 (Catosal[®] B₁₂, Bayer Health Care, São Paulo, Brazil). Blood samples were
82 collected after each milking on -12, 12 and 36 hours in relation to the
83 supplementation, for analysis of glucose, albumin, total plasma proteins (TPP)
84 and non-esterified fatty acids (NEFA). Milk samples were collected individually
85 by sampling the complete milking on -12, 0, 12, 24 and 36 hours for each
86 supplementation for analysis of total proteins, total casein, lactose, fat, total
87 solids and urea, besides the pH value, freezing point, density and somatic cell
88 count (SCC). Comparative analyzes between mastitis, mild and moderate, were
89 not different (P>0.05) in any parameters analyzed. The SCC average of the
90 BFC group (373,760 ± 180,610 cells/ml) were lower (P=0.02) after the third
91 injection of BFC compared with CON group (1,112,630 ± 405 810 cells / mL).
92 Body weight, concentrations of glucose, albumin, TPP, NEFA and the chemical

93 and physical components of milk were similar ($P>0.05$) among groups. Our
94 results show that supplementation with butaphosphan and cyanocobalamin
95 after treatment of clinical mastitis in dairy cows may contribute to the recovery
96 process of the mammary gland.

97

98 **Key words:** clinical mastitis butaphosphan, vitamin B12, dairy cows.

99 INTRODUÇÃO

100

101 A mastite clínica é uma das enfermidades com maior ocorrência em
102 vacas leiteiras, causando prejuízos aos sistemas de produção e à indústria de
103 laticínios (Mehrzaad *et al.*, 2004). Esta doença pode ser originada a partir de
104 traumas mecânicos (devido ao mau uso de máquinas e equipamentos), por
105 agentes químicos ou como resultado de infecções causadas por
106 microrganismos como bactérias, fungos e vírus (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007).

107 A mastite pode ocorrer na forma clínica apresentando sinais de dor,
108 edema, hiperemia e alterações macroscópicas das características do leite
109 (Shim *et al.*, 2004). Com base nesses achados, a mastite pode ser classificada
110 de acordo com o grau de intensidade em leve, moderada e grave (Parra *et al.*,
111 2009). O tratamento pode ser somente na forma tópica (intramamário),
112 sistêmica (injetável) ou, ainda, com a combinação de ambas as vias, variando
113 de acordo com a intensidade do quadro clínico. Esses tratamentos têm
114 demonstrado eficácia na cura dos animais com mastite clínica, contando para
115 isso com diversos protocolos terapêuticos e princípios ativos (Bradley and
116 Green, 2009, Kleen *et al.*, 2009, Schukken *et al.*, 2011). Entretanto, o processo
117 de recuperação da glândula mamária depende do correto manejo e eliminação
118 do agente causador (Trevisi *et al.*, 2014), prevenindo uma reincidência ou, até
119 mesmo, evitando a forma subclínica da enfermidade.

120 A mastite subclínica é diagnosticada, principalmente, pela contagem de
121 células somáticas (CCS), que serve como indicador de saúde da glândula
122 (Boutet *et al.*, 2004). As células somáticas são compostas por leucócitos e
123 células epiteliais descamadas da glândula mamária (Paape *et al.*, 2003, Boutet

et al., 2004, Mehrzad et al., 2004) presentes em condição normais, entretanto, sob infecção ocorre o aumento de células leucocitárias. Os leucócitos são constituídos de linfócitos, macrófagos e neutrófilos, este último representando mais de 90% dessas células (Kehrli and Shuster, 1994, Sharif and Muhammad, 2008, Sharma et al., 2011) e são atraídos para o local da inflamação através de citocinas pró-inflamatórias (Paape et al., 2003, Boutet et al., 2004, Oviedo-Boyso et al., 2007).

Assim, lesões na glândula mamária podem ter repercussão sistêmica no organismo animal, com alterações significativas que podem prejudicar outros tecidos e comprometer a produção leiteira (Moyes et al., 2009). Além disso, as alterações metabólicas podem interferir na resposta imunológica celular, levando à diminuição na capacidade de resposta do sistema celular (Moyes et al., 2009, Parra et al., 2009).

Outro sinal importante tanto no início da doença quanto na recuperação da glândula mamária acometida por mastite, relaciona-se as características do leite, já que podem surgir alterações nas concentrações de proteína, lactose e atividade enzimática, causando diminuição destes compostos (Bruckmaier et al., 2004, Ogola et al., 2007), os quais quando degradados podem alterar as condições físicas do leite.

Diante dos desafios da produção leiteira tem-se utilizado a associação de butafosfan e cianocobalamina a fim de intensificar as reações enzimáticas do metabolismo energético. Esta associação já demonstrou aumento da produção leiteira e de proteínas do leite, além de redução na concentração de ácidos graxos não esterificados e prevenção de cetose (Rollin et al., 2010,

Kreipe *et al.*, 2011). Entretanto, estudos sobre seus efeitos na recuperação da glândula mamária acometida por mastite ainda não tem sido relatados.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da associação de butafosfan e cianocobalamina na recuperação de glândula mamária de vacas leiteiras após o tratamento da mastite clínica. A hipótese é que a suplementação de butafosfan e cianocobalamina pode contribuir para o processo de recuperação da glândula mamária.

MATERIAL E MÉTODOS

Local, animais e manejo

Para este estudo, foram utilizadas 32 vacas da raça Holandês, mantidas sob sistema de semi-confinamento (concentrado e pastagem) em um rebanho comercial no sul do Brasil (32° 16 'S, 52 67° 32' E). As vacas eram ordenhadas duas vezes ao dia (10:00 e 22:00 hrs) e recebiam uma dieta (Tabela 1) formulada com base nas exigências nutricionais (NRC, 2001) composta de concentrado e volumoso (Azevém - *Lolium multiflorum*), fornecido aos animais no intervalo entre as ordenhas. Todos os animais foram pesados no início do experimento e obtiveram média de peso de 651,39±53,19 kg. No momento de cada aplicação os mesmos foram pesados, a fim de que pudesse ser realizado o ajuste da dosagem, além do acompanhamento do desenvolvimento corporal.

Diagnóstico e terapia de mastite

Para este estudo, foram selecionados apenas animais com diagnóstico de mastite clínica, através do teste da caneca de fundo escuro (Parra *et al.*, 2009), os quais foram categorizados em:

1) **Mastite Leve**: ausência de sinais clínicos, mas com presença de grumos. Estes animais foram tratados com uma associação de tetraciclina (200mg), neomicina (250mg), bacitracina (2000UI) e prednisolona (10mg), através de infusão intramamária (Mastijet Forte[®], MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil) no quarto acometido, durante três dias consecutivos, com intervalo de 24 horas (Figura 1A).

2) **Mastite Moderada**: presença de sinais clínicos de dor, ou edema, ou hiperemia, além da presença de grumos em concentração superior a uma cruz. Estes animais foram tratados com sulfato de cefquinoma (88 mg) através de infusão intramamária (Cobactan[®] VL, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil), com 3 aplicações com intervalo de 12 horas, associada ao sulfato de cefquinoma injetável (1mg/kg PV) de ação sistêmica (Cobactan[®], MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil), com duas aplicações com intervalo de 24 horas (Figura 1B).

Tratamentos e grupos experimentais

As vacas diagnosticadas com **mastite leve** foram divididas em dois grupos: Grupo Controle (CON, n=9) que recebeu três aplicações i.v de placebo (NaCl 0,9%; 0,1 mL/kg de PV), a cada cinco dias, a partir do 4,22 ±1,30 dias após a terapia antimicrobiana; Grupo Tratado (BFC, n=9) que recebeu três aplicações i.v de 10mg de butafosfan+5µg de cianocobalamina/kg de PV

(Catosal[®] B₁₂, Bayer Health Care, São Paulo, Brasil) a cada cinco dias, a partir do 4,22±1,48 dias após a terapia antimicrobiana.

Da mesma forma, as vacas diagnosticadas com **mastite moderada** foram divididas em dois grupos: Grupo Controle (CON, n=6) que recebeu três aplicações i.v de placebo (NaCl 0,9%; 0,1 mL/kg de PV), a cada cinco dias, a partir do 6,29 ±7,61 dias após a terapia antimicrobiana; Grupo Tratado (BFC, n=8) que recebeu três aplicações i.v de 10mg de butafosfan+5µg de cianocobalamina/kg de PV (Catosal[®] B₁₂, Bayer Health Care, São Paulo, Brasil), a cada cinco dias a partir do 7,43 ±6,9 dias após a terapia antimicrobiana.

Os animais foram acompanhados com inspeção da glândula mamária, além dos testes de diagnóstico de mastite clínica, a fim de monitorar os casos de reinfecção.

Coletas de sangue

Amostras de sangue foram coletadas após cada ordenha, nos tempos - 12, 12 e 36 horas em relação à administração de BFC e placebo. Amostras de sangue foram coletadas através da veia coccígea e divididas em dois tubos: um contendo anticoagulante (EDTA 10%) e antiglicolítico (KF 12%) e outro sem nenhuma solução. Imediatamente após a coleta, as amostras foram centrifugadas a 1800 X g por 15 min e congeladas a -20 °C, ou resfriadas a 4°C para posteriores análises bioquímicas.

223 **Análises Bioquímicas**

224 As análises de glicose, albumina, proteínas plasmáticas totais (PPT)
225 foram realizadas através de ensaios enzimáticos colorimétricos e quantificadas
226 por um espectrofotômetro (CELM SB 190[®], Companhia Equipadora de
227 Laboratórios Modernos – CELM, Brasil). Os reagentes foram manipulados de
228 acordo com instruções do fabricante (Labtest[®] Diagnóstica S.A., Lagoa Santa,
229 Brasil). As análises de ácidos graxos não esterificados (AGNES) foram
230 realizadas através de um kit comercial (Wako NEFA-HR, Wako Chemicals
231 EUA[®], Richmond, EUA), de acordo com técnica padronizada por Ballou et al.
232 (2009). Os coeficientes de variação foram inferiores a 10% para todos os
233 ensaios.

234

235 **Composição do leite**

236 As coletas de amostras de leite (amostragem da ordenha completa)
237 foram realizadas individualmente nos períodos -12, 0, 12, 24 e 36 horas em
238 relação a cada aplicação de BFC e placebo. As amostras foram
239 acondicionadas em frascos de polietileno, contendo conservante bronopol (2-
240 bromo-2-nitropropano-1,3-diol) em forma de pastilha e em seguida foram
241 analisadas através do sistema combinado Delta Instruments[®]. As análises de
242 proteína, caseínas totais, lactose, gordura, sólidos totais, ureia, crioscopia,
243 densidade e pH foram realizadas através do LactoScop FT 10 série FT426601
244 que faz a mensuração através da metodologia de infravermelho. A CCS foi
245 determinada através da metodologia de citometria de fluxo pelo SomatoScop
246 CA3A5 série SO421601.

247

Análise estatística

Os dados foram analisados tendo os animais como unidades experimentais. Todas as variáveis foram submetidas ao teste de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk ($P > 0,90$), pelo procedimento de UNIVARIATE. A comparação foi realizada através dos procedimentos MIXEDMODEL e a aproximação para determinação dos graus de liberdade do denominador pelo Satterthwaite para os testes de efeitos fixos. As análises metabólicas de glicose, albumina, PPT e AGNES, além do peso corporal e os parâmetros do leite (proteína, caseínas totais, lactose, gordura, sólidos totais, ureia, crioscopia, densidade, pH e CCS) foram comparadas entre os tipos de mastite, tratamentos, assim como o momento da coleta e interações entre eles (Littell *et al.*, 1998), por meio de análise de variância com medidas repetidas. A estrutura de covariância simétrica composta forneceu o melhor ajuste para as análises de acordo com o critério de informação de Akaike. Além disso, o animal foi considerado como efeito aleatório dentro dos tratamentos e as coletas como medidas repetidas. Os resultados são apresentados como médias $\pm$ erro padrão da média (EPM). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SAS (Littell *et al.*, 1998. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). As diferenças foram consideradas significativas quando o $P \leq 0,05$.

RESULTADOS

As análises comparativas entre as mastites, leve e moderada, não demonstraram interação ($P > 0,05$) entre si, assim como a interação delas com a

suplementação de BFC fornecida durante a recuperação da glândula mamária. Portanto, os dados foram agrupados para que as análises comparativas entre as médias fossem realizadas de acordo com a suplementação de BFC, sem considerar o grau de mastite.

A CCS média (Figura 2) no grupo BFC (373.760 ± 180.610 células/mL) foi menor ($P=0,02$) após a terceira aplicação de butafosfan+cianocobalamina, quando comparado com o grupo CON ($1.112.630 \pm 405.810$ células/mL). O peso corporal dos animais do grupo BFC ($648,82 \pm 16,62$ kg de PV) não diferiu ($P>0,05$) do grupo CON ($621,17 \pm 16,62$ kg/PV), bem como não houve interação entre tratamento e tempo ($P>0,05$). Todos os animais perderam peso ao longo do tempo ($P<0,05$).

As concentrações de glicose, albumina, PPT e AGNES (Tabela 2) não diferiram ($P>0,05$) entre os tratamentos e suas interações ($P>0,05$), embora tenha havido variação ($P<0,05$) ao longo do tempo. O mesmo ocorreu com os resultados dos parâmetros químicos do leite (proteína, lactose, gordura, caseínas totais, ureia, sólidos totais e pH) e as características físicas como densidade e crioscopia, que não diferiram ($P>0,05$) entre os grupos e nem as interações entre o grupo e o tempo.

DISCUSSÃO

Terapias antimicrobianas

Os tratamentos para as mastites leve e moderada foram eficazes na cura dos animais, uma vez que não houve recidiva da doença. Estes resultados são similares aos de outros estudos (Ehinger *et al.*, 2006, Schukken *et al.*,

2011) e podem ser atribuídos à biodisponibilidade do fármaco, a sensibilidade dos agentes infectantes, via de aplicação (Zonca *et al.*, 2011) e ao status imunológico dos animais (Bradley and Green, 2009).

Suplementação com a associação de butafosfan e cianocobalamina

Os animais do grupo BFC apresentaram menor CCS no leite, sendo esta o equivalente a 33,59% da CCS encontrada no grupo CON, após a terceira aplicação (Figura 2), o que indica uma maior capacidade de recuperação funcional do tecido mamário desses animais. Além disso, também ocorreu diminuição da CCS ao longo do tempo ($P < 0,01$) em ambos os grupos. Esta resposta mais acentuada no grupo BTF, pode ter ocorrido devido à disponibilidade do fósforo, contida na molécula de butafosfan (EMEA, 2000), servindo de substrato para a tirosina quinase, responsável por fosforilar as proteínas do citoesqueleto dos neutrófilos, permitindo a emissão de pseudopodes, necessários para a fagocitose (Berkow and Dodson, 1990, Meconi *et al.*, 2001, Mehrzad *et al.*, 2004), a proliferação, a diferenciação (Monfardini *et al.*, 2002) e o prolongamento da vida (Sweeney *et al.*, 1998). Além disso, o fósforo suplementar recebido pelo grupo BFC, pode ter auxiliado na fosforilação do inibidor kappa-B (I κ B), possibilitando a translocação do fator de transcrição nuclear kappa-B (NF-KB) para dentro do núcleo, incrementando a síntese de citocinas, que por sua vez atraem mais leucócitos para o local da inflamação (Boulanger *et al.*, 2003, Paape *et al.*, 2003), diminuindo assim a carga de microrganismos na glândula mamária e, conseqüentemente a CCS do leite (Figura 2).

Como estas reações demandam grande consumo de energia, a cianocobalamina, como co-fator enzimático, pode ter contribuído para o aumento da atividade neoglicogênica, assim como foi observado em um estudo sobre o tecido hepático (Kreipe *et al.*, 2011), embora as concentrações de glicose não tenham diferido entre os tratamentos no presente estudo. A glicose é fundamental para o sistema imunológico celular, por ser utilizada nas rotas de proliferação, sobrevivência e diferenciação das células fagocitárias (Pithon-Curi *et al.*, 2004, Moyes *et al.*, 2009), com isso, permitindo que os leucócitos sejam mais eficientes no processo de recuperação funcional da glândula mamária.

De mesma forma, os AGNEs que são indicadores de equilíbrio energético do organismo, não diferiram entre os grupos. Os AGNEs já apresentaram efeito na diminuição da capacidade fagocitária *in vitro*, mas em concentrações três vezes maiores (Bertoni *et al.*, 2008, Sander *et al.*, 2011) em relação as utilizadas no presente estudo. Ainda, altos níveis de AGNES têm sido associados ao maior risco de mastite clínica, em especial no periparto (Melendez *et al.*, 2009), mas não no processo de recuperação da glândula mamária.

As concentrações plasmáticas de albumina não diferiram entre os grupos. Esta proteína é considerada preditora da resposta inflamatória de fase aguda (Bertoni *et al.*, 2008), variando suas concentrações somente nos primeiros momentos do processo (Moyes *et al.*, 2009), logo suas concentrações deveriam ser mantidas durante o período de recuperação da glândula mamária. Da mesma forma, as PPTs não sofreram alteração com a suplementação, apesar de outros estudos mostrarem diminuição nas concentrações plasmáticas em vacas com mastite clínica, mas em comparação

a vacas saudáveis, tendo ainda como consequência alterações nos componentes químicos do leite (Parra *et al.*, 2009).

As concentrações de lactose, gordura, proteína, caseínas totais, ureia e sólidos totais do leite, também não sofreram alteração durante o período de recuperação da glândula mamária, corroborando com os resultados de Furll *et al.*, (2010), que também não encontraram alterações na composição química do leite após três aplicações de BFC. Nossos resultados podem estar associados ao mecanismo de controle de síntese dos constituintes do leite, visto que estes dispõem de uma complexa rede de genes e mediadores protéicos (Bionaz and Loores, 2011). Entretanto, um aumento nas concentrações protéicas foi conseguido em outros estudos, mas com maior número de aplicações da associação (Furll *et al.*, 2010, Pereira *et al.*, 2013a).

Equivalentemente, os resultados de crioscopia, densidade e pH do leite também não diferiram entre os grupos, o que pode ser atribuído ao fato de que as proteínas, mas principalmente a lactose, são higroscópicas (Boutinaud *et al.*, 2008), impedindo a variação nas características físicas do leite, as quais são verificadas somente quando comparados vacas saudáveis com vacas com mastite devido ao aumento de permeabilidade causado pela inflamação da glândula mamária (Bruckmaier *et al.*, 2004, Ogola *et al.*, 2007).

Nossos resultados mostram que o butafosfan e a cianocobalamina podem ter agido diretamente na glândula mamária, pois os marcadores metabólicos que representam o status sistêmico permaneceram dentro dos padrões fisiológicos, demonstrando que o butafosfan e a cianocobalamina podem ter atuado nas rotas metabólicas que estavam em maior atividade no momento, ou seja, as da glândula mamária.

372

373 **CONCLUSÃO**

374 A suplementação com butafosfan e cianocobalamina após a terapia da
375 mastite clínica de vacas leiteiras reduz a contagem de células somáticas,
376 contribuindo para recuperação da glândula mamária.

377

REFERENCIAS

- Berkow, R.; Dodson, R., 1990: Tyrosine-specific protein phosphorylation during activation of human neutrophil. *Journal of The American Society of hematology* 75, 2445-2452.
- Bertoni, G.; Trevisi, E.; Han, X.; Bionaz, M., 2008: Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows. *J Dairy Sci* 91, 3300-3310.
- Bionaz, M.; Loor, J.J., 2011: Gene networks driving bovine mammary protein synthesis during the lactation cycle. *Bioinform Biol Insights* 5, 83-98.
- Boulanger, D.; Bureau, F.; Mélotte, D.; Mainil, J.; Lekeux, P., 2003: Increased Nuclear Factor kb Activity in Milk Cells of Mastitis-Affected Cows. *Journal of Dairy Science* 86, 1259-1267.
- Boutet, P.; Boulanger, D.; Gillet, L.; Vanderplasschen, A.; Closset, R.; Bureau, F.; Lekeux, P., 2004: Delayed neutrophil apoptosis in bovine subclinical mastitis. *J Dairy Sci* 87, 4104-4114.
- Boutinaud, M.; Ben Chedly, M.H.; Delamaire, E.; Guinard-Flament, J., 2008: Milking and feed restriction regulate transcripts of mammary epithelial cells purified from milk. *J Dairy Sci* 91, 988-998.
- Bradley, A.J.; Green, M.J., 2009: Factors affecting cure when treating bovine clinical mastitis with cephalosporin-based intramammary preparations. *J Dairy Sci* 92, 1941-1953.
- Bruckmaier, R.M.; Ontsouka, C.E.; Blum, J.W., 2004: Fractionized milk composition in dairy cows with subclinical mastitis. *International Journal for vaterinary and biomedical Science* 49, 283-290.

- 403 Ehinger, A.M.; Schmidt, H.; Kietzmann, M., 2006: Tissue distribution of
404 cefquinome after intramammary and "systemic" administration in the
405 isolated perfused bovine udder. *Vet J* 172, 147-153.
- 406 EMEA, 2000: Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect
407 (Butafosfan - Extension to lactating cows). The european agency for the
408 evaluation of medicinal Products Veterinary Medicines and Information
409 technology unit.
- 410 Furll, M.; Deniz, A.; Westphal, B.; Illing, C.; Constable, P.D., 2010: Effect of
411 multiple intravenous injections of butaphosphan and cyanocobalamin on the
412 metabolism of periparturient dairy cows. *J Dairy Sci* 93, 4155-4164.
- 413 Kehrli, M.E., Jr.; Shuster, D.E., 1994: Factors affecting milk somatic cells and
414 their role in health of the bovine mammary gland. *J Dairy Sci* 77, 619-627.
- 415 Kleen, J.L.; Barrett, D.C.; Courcier, E.; Biggs, A.M., 2009: COMPARISON OF
416 TWO TREATMENTS FOR CLINICAL MASTITIS USING CEFQUINOME
417 (COBACTAN®). British Mastitis Conference.
- 418 Kreipe, L.; Deniz, A.; Bruckmaier, R.M.; van Dorland, H.A., 2011: First report
419 about the mode of action of combined butafosfan and cyanocobalamin on
420 hepatic metabolism in nonketotic early lactating cows. *J Dairy Sci* 94, 4904-
421 4914.
- 422 Littell, R.C.; Henry, P.R.; Ammerman, C.B., 1998: Statistical analysis of
423 repeated measures data using SAS procedures. *Journal of Animal Science*
424 76, 1216-1231.
- 425 Meconi, S.; Capo, C.; Remacle-Bonnet, M.; Pommier, G.; Raoult, D.; Mege,
426 J.L., 2001: Activation of protein tyrosine kinases by *Coxiella burnetii*: role in

- 427 actin cytoskeleton reorganization and bacterial phagocytosis. *Infect Immun*
428 69, 2520-2526.
- 429 Mehrzad, J.; Duchateau, L.; Burvenich, C., 2004: Viability of milk neutrophils
430 and severity of bovine coliform mastitis. *J Dairy Sci* 87, 4150-4162.
- 431 Melendez, P.; Marin, M.P.; Robles, J.; Rios, C.; Duchens, M.; Archbald, L.,
432 2009: Relationship between serum nonesterified fatty acids at calving and
433 the incidence of periparturient diseases in Holstein dairy cows.
434 *Theriogenology* 72, 826-833.
- 435 Monfardini, E.; Paape, M.J.; Wang, Y.; Capuco, A.V.; Husheem, M.; Wood, L.;
436 Burvenich, C., 2002: Evaluation of L-selectin expression and assessment of
437 protein tyrosine phosphorylation in bovine polymorphonuclear neutrophil
438 leukocytes around parturition. *Vet Res* 33, 271-281.
- 439 Moyes, K.M.; Larsen, T.; Friggens, N.C.; Drackley, J.K.; Ingvarsen, K.L., 2009:
440 Identification of potential markers in blood for the development of subclinical
441 and clinical mastitis in dairy cattle at parturition and during early lactation. *J*
442 *Dairy Sci* 92, 5419-5428.
- 443 Ogola, H.; Shitandi, A.; Nanua, J., 2007: Effect of mastitis on raw milk
444 compositional quality. *Journal of Veterinary Science* 8, 237-242.
- 445 Oviedo-Boyso, J.; Valdez-Alarcon, J.J.; Cajero-Juarez, M.; Ochoa-Zarzosa, A.;
446 Lopez-Meza, J.E.; Bravo-Patino, A.; Baizabal-Aguirre, V.M., 2007: Innate
447 immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria
448 responsible for mastitis. *J Infect* 54, 399-409.
- 449 Paape, M.J.; Bannerman, D.D.; Zhao, X.; Lee, J.W., 2003: The bovine
450 neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet Res* 34, 597-627.

- 451 Parra, A.J.A.; Ortega, A.A.L.; Mendoza, C.A.; Delgado, N., 2009: Efecto de la
452 mastitis clínica y subclínica sobre la concentración plasmática de
453 metabolitos, proteínas totales y albúmina en hembras bovinas. *Zootecnia*
454 *Tropical* 27.
- 455 Pereira, R.A.; Silveira, P.A.; Montagner, P.; Schneider, A.; Schmitt, E.;
456 Rabassa, V.R.; Pfeifer, L.F.; Del Pino, F.A.; Pulga, M.E.; Correa, M.N.,
457 2013: Effect of butaphosphan and cyanocobalamin on postpartum
458 metabolism and milk production in dairy cows. *Animal*, 1-5.
- 459 Pithon-Curi, T.C.; De Melo, M.P.; Curi, R., 2004: Glucose and glutamine
460 utilization by rat lymphocytes, monocytes and neutrophils in culture: a
461 comparative study. *Cell Biochem Funct* 22, 321-326.
- 462 Rollin, E.; Berghaus, R.D.; Rapnicki, P.; Godden, S.M.; Overton, M.W., 2010:
463 The effect of injectable butaphosphan and cyanocobalamin on postpartum
464 serum beta-hydroxybutyrate, calcium, and phosphorus concentrations in
465 dairy cattle. *J Dairy Sci* 93, 978-987.
- 466 Sander, A.K.; Piechotta, M.; Schlamberger, G.; Bollwein, H.; Kaske, M.; Sipka,
467 A.; Schuberth, H.J., 2011: Ex vivo phagocytic overall performance of
468 neutrophilic granulocytes and the relation to plasma insulin-like growth
469 factor-I concentrations in dairy cows during the transition period. *Journal of*
470 *Dairy Science* 94, 1762-1771.
- 471 Schukken, Y.H.; Bennett, G.J.; Zurakowski, M.J.; Sharkey, H.L.; Rauch, B.J.;
472 Thomas, M.J.; Ceglowski, B.; Saltman, R.L.; Belomestnykh, N.; Zadoks,
473 R.N., 2011: Randomized clinical trial to evaluate the efficacy of a 5-day
474 ceftiofur hydrochloride intramammary treatment on nonsevere gram-
475 negative clinical mastitis. *J Dairy Sci* 94, 6203-6215.

- 476 SHARIF, A.; MUHAMMAD, G., 2008: SOMATIC CELL COUNT AS AN
477 INDICATOR OF UDDER HEALTH STATUS UNDER MODERN DAIRY
478 PRODUCTION: A REVIEW. Pakistan Vet. J., 28.
- 479 Sharma, N.; Singh, N.K.; Bhadwal, M.S., 2011: Relationship of Somatic Cell
480 Count and Mastitis: An Overview. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 24, 429-438.
- 481 Shim, E.H.; Shanks, R.D.; Morin, D.E., 2004: Milk Loss and Treatment Costs
482 Associated with Two Treatment Protocols for Clinical Mastitis in Dairy
483 Cows. Journal of dairy science 87, 2702-2708.
- 484 Sweeney, J.F.; Nguyen, P.K.; Omann, G.M.; Hinshaw, D.B., 1998:
485 Lipopolysaccharide Protects Polymorphonuclear Leukocytes from
486 Apoptosis via Tyrosine Phosphorylation-Dependent Signal Transduction
487 Pathways. Journal of Surgical Research 74, 64-70.
- 488 Trevisi E, Zecconi A, Cogrossi S, Razzuoli E, Grossi P and Amadori M 2014.
489 Strategies for reduced antibiotic usage in dairy cattle farms. Res Vet Sci 96,
490 229-233.
- 491 Zonca, A.; Gallo, M.; Locatelli, C.; Carli, S.; Moroni, P.; Villa, R.; Cagnardi, P.,
492 2011: Cefquinome sulfate behavior after intramammary administration in
493 healthy and infected cows. J Dairy Sci 94, 3455-3461.
- 494
- 495

496 **Tabela 1.** Ingredientes e composição nutricional da dieta fornecida às vacas
 497 após cada ordenha.

Alimentos	Kg
Azevém	<i>Ad libitum</i>
Pré-secado	15,000
Farelo de trigo	1,500
Farelo de soja	2,400
Farelo de arroz	2,880
Milho moído	3,000
Suplemento Mineral	0,110
Sal	0,002
Composição Química da dieta fornecida no cocho	
Matéria Seca (%)	41,4
FDN (%)	40,40
FDA (%)	24,6
Proteína (%)	10,6
Extrato Etéreo (%)	10,6
Minerais totais (%)	7,83

498 **FDN** = Fibra Detergente Neutro; **FDA** = Fibra Detergente Ácida.

Tabela 2: Concentração plasmática de glicose (mg/dL), albumina (g/L), PPT (mg/dL) e AGNES (mmol/L) de vacas suplementadas com placebo (Grupo CON, n=15) ou com 10mg de butafosfan+5µg de cianocobalamina/kg de PV (Grupo BFC, n=17).

Parâmetros ¹	Tratamentos ²		Medidas repetidas (Valor de P)		
	CON	BFC	Tratamento	Tempo	Trat*Tem ³
Glicose (mg/dL)	47,52 ±0,97	48,57 ±0,87	0,42	<0,01	0,72
Albumina (g/L)	2,82 ±0,06	2,82 ±0,06	0,90	0,21	0,97
PPT ¹ (mg/dL)	8,38 ±0,19	8,40 ±0,18	0,96	0,05	0,38
AGNES (mmol/L)	0,322 ±0,01	0,326 ±0,01	0,94	0,04	0,92

PPT = Proteínas Plasmáticas Totais;

AGNES = Ácido Graxo Não Esterificado;

¹Concentrações plasmática de glicose, albumina, PPT e AGNES durante o período de recuperação da glândula mamária.

²O tratamento era composto por três aplicações a cada cinco dias, após a terapia antimicrobiana, nos grupos CON e BFC respectivamente. **CON**= Placebo (NaCl 0,9%; 0,1 mL/kg de PV); **BFC**= Grupo Tratado (10mg butafosfan+5µg cianocobalamina/kg de PV em cada aplicação, Catosal[®] B12[®]);

³Análises de medidas repetidas e interação entre tratamento e tempo; Letras distintas na mesma linha indicam diferença entre os tratamentos (P<0,05).

515 **Tabela 3:** Média da concentração (%) de lactose, proteína, caseínas totais,
 516 ureia, sólidos totais e pH de vacas suplementadas com placebo (Grupo CON,
 517 n=15) ou com 10mg de butafosfan + 5µg de cianocobalamina/kg de PV (Grupo
 518 BFC, n=17)

Parâmetros ¹	Tratamentos ²		Medidas repetidas (valor de P)		
	CON	BFC	Tratamento	Tempo	Trat*Tem ³
Lactose	3,96±0,100	3,89±0,097	0,64	0,34	0,84
Proteína	3,26±0,099	3,27±0,098	0,94	<0,01	0,48
Gordura	3,28±0,16	2,98±0,16	0,32	0,02	0,23
CT	2,47±0,08	2,48±0,07	0,92	<0,01	0,39
Ureia	16,80±0,81	16,59±0,079	0,86	<0,01	0,83
ST	11,57±0,024	11,34±0,24	0,51	0,04	0,23
pH	6,50±0,021	6,50 ±0,021	0,88	<0,01	0,38

519 **CT** = Caseínas Totais; **ST** = Sólidos Totais;

520 ¹Concentrações (%) de lactose, proteína, caseínas totais, ureia, sólidos totais e
 521 pH durante o período de recuperação da glândula mamária.

522 ²O tratamento era composto por três aplicações a cada cinco dias, após a
 523 terapia antimicrobiana, nos grupos CON e BFC respectivamente. .

524 **CON**= Placebo (NaCl 0,9%; 0,1 mL/kg de PV); **BFC**= Grupo Tratado (10mg
 525 butafosfan + 5µg cianocobalamina/kg de PV em cada aplicação, Catosal[®]
 526 B12[®]);

527 ³Análises de medidas repetidas e interação entre tratamento e tempo; Letras
528 distintas na mesma linha indicam diferença entre os tratamentos ($P < 0,05$).
529

Tabela 4: Parâmetros físicos do leite de crioscopia (°C) e densidade (g/mL) de vacas suplementadas com placebo (Grupo CON, n=15) ou com 10mg de butafosfan+5µg de cianocobalamina/kg de PV (Grupo BFC, n=17).

Parâmetros ¹	Tratamentos ²		Medidas repetidas (valor P)		
	CON	BFC	Tratamento	Tempo	Trat*Tem ³
Crioscopia (°C)	-0,4753 ±0,01	-0,4799±0,01	0,54	0,15	0,92
Densidade (g/mL)	1028,61±0,44	1028,20±0,45	0,52	0,45	0,98

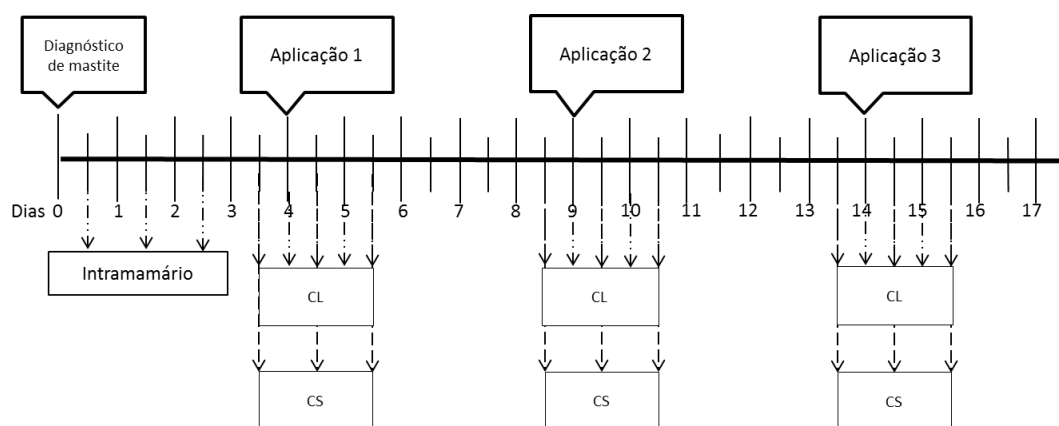
¹Parâmetros de crioscopia (°C) e densidade (g/mL) durante o período de recuperação da glândula mamária.

²O tratamento era composto por três aplicações a cada cinco dias, após a terapia antimicrobiana, nos grupos CON e BFC respectivamente. .

CON= Placebo (NaCl 0,9%; 0,1 mL/kg de PV); **BFC**= Grupo Tratado (10mg butafosfan + 5µg cianocobalamina/kg de PV em cada aplicação, Catosal[®] B12[®]);

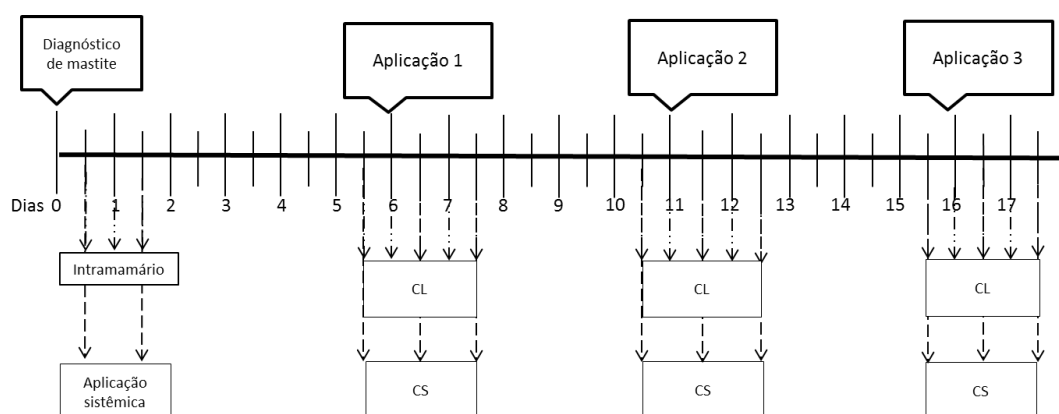
³Análises de medidas repetidas e interação entre tratamento e tempo; Letras distintas na mesma linha indicam diferença entre os tratamentos (P<0,05).

550 A



551

552 B



553

554 **Figura 1:** CL = Coleta de Leite. CS = Coleta de Sangue. A) Protocolo de
 555 terapia antimicrobiana das vacas diagnosticadas com mastite leve, manejo
 556 experimental e suplementação dos grupos Grupo CON e Grupo BFC. B)
 557 Protocolo de terapia antimicrobiana das vacas

558

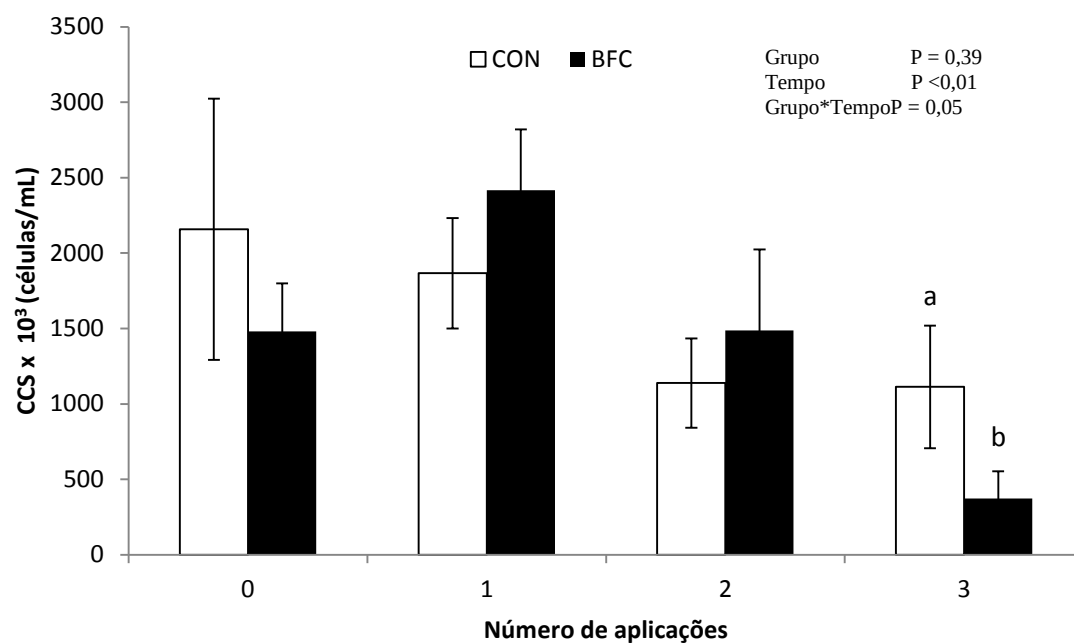


Figura 2: Contagem (Células/mL) de CCS (contagem de células somáticas) de vacas suplementadas com placebo (Grupo CON, n=15) ou com 10mg de butafosfan + 5µg de cianocobalamina/kg de PV (Grupo BFC, n=17)

4. Conclusão Geral

Nossos resultados demonstram que a suplementação de butafosfan e cianocobalamina:

- Aumenta os níveis glicêmicos de vacas leiteiras saudáveis suplementadas após o parto e pode intensificar o catabolismo protéico.
- Diminui a contagem de células somáticas em vacas leiteiras após o tratamento da mastite clínica, contribuindo para recuperação da glândula mamária.
- Como fontes de fósforo orgânico e vitamina B₁₂, o butafosfan e a cianocobalamina contribuem para as reações metabólicas celulares, principalmente como substrato das reações de fosforilação.

5. Referências

- Abe H, Morimatsu M, Nikami H, Miyashige T and Saito M 1997. Molecular cloning and mRNA expression of the bovine insulin-responsive glucose transporter (GLUT4). *Journal of Animal Science* 75, 182-188.
- Alberghina D, Giannetto C, Vazzana I, Ferrantelli V and Piccione G 2011. Reference intervals for total protein concentration, serum protein fractions, and albumin/globulin ratios in clinically healthy dairy cows. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23, 111-114.
- Ballou MA, Gomes RC, Juchem SO and DePeters EJ 2009. Effects of dietary supplemental fish oil during the peripartum period on blood metabolites and hepatic fatty acid compositions and total triacylglycerol concentrations of multiparous Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 92, 657-669.
- Balogh O, Kovacs K, Kulcsar M, Gaspardy A, Zsolnai A, Katai L, Pecsí A, Fesus L, Butler WR and Huszenicza G 2009. AluI polymorphism of the bovine growth hormone (GH) gene, resumption of ovarian cyclicity, milk production and loss of body condition at the onset of lactation in dairy cows. *Theriogenology* 71, 553-559.
- Bell AW 1995. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of Animal Science* 73, 2804-2819.
- Bell AW and Bauman DE 1997. Adaptations of Glucose Metabolism During Pregnancy and Lactation. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2, 265-278.
- Berkow, R.; Dodson, R., 1990: Tyrosine-specific protein phosphorylation during activation of human neutrophil. *Journal of The American Society of hematology* **75**, 2445-2452.
- Bertoni, G.; Trevisi, E.; Han, X.; Bionaz, M., 2008: Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows. *J Dairy Sci* **91**, 3300-3310.
- Bionaz, M.; Looor, J.J., 2011: Gene networks driving bovine mammary protein synthesis during the lactation cycle. *Bioinform Biol Insights* **5**, 83-98.
- Boulanger, D.; Bureau, F.; Mélotte, D.; Mainil, J.; Lekeux, P., 2003: Increased Nuclear Factor kb Activity in Milk Cells of Mastitis-Affected Cows. *Journal of Dairy Science* **86**, 1259-1267.
- Boutet, P.; Boulanger, D.; Gillet, L.; Vanderplasschen, A.; Closset, R.; Bureau, F.; Lekeux, P., 2004: Delayed neutrophil apoptosis in bovine subclinical mastitis. *J Dairy Sci* **87**, 4104-4114.
- Boutinaud, M.; Ben Chedly, M.H.; Delamaire, E.; Guinard-Flament, J., 2008: Milking and feed restriction regulate transcripts of mammary epithelial cells purified from milk. *J Dairy Sci* **91**, 988-998.

- Bradley, A.J.; Green, M.J., 2009: Factors affecting cure when treating bovine clinical mastitis with cephalosporin-based intramammary preparations. *J Dairy Sci* **92**, 1941-1953.
- Bruckmaier, R.M.; Ontsouka, C.E.; Blum, J.W., 2004: Fractionized milk composition in dairy cows with subclinical mastitis. *International Journal for vaterinary and biomedical Science* **49**, 283-290.
- Butler WR 2010. Fertility of lactating cows in relation the physiology of the transition period. *Large Animal Review* 16, 305-308.
- Castaneda-Gutierrez E, Pelton SH, Gilbert RO and Butler WR 2009. Effect of peripartum dietary energy supplementation of dairy cows on metabolites, liver function and reproductive variables. *Anim Reprod Sci* 112, 301-315.
- Chagas LM, Lucy MC, Back PJ, Blache D, Lee JM, Gore PJ, Sheahan AJ and Roche JR 2009. Insulin resistance in divergent strains of Holstein-Friesian dairy cows offered fresh pasture and increasing amounts of concentrate in early lactation. *J Dairy Sci* 92, 216-222.
- De Koster JD and Opsomer G 2013. Insulin resistance in dairy cows. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 29, 299-322.
- Duehlmeier R, Noldt S and Ganter M 2013. Pancreatic insulin release and peripheral insulin sensitivity in German black headed mutton and Finish Landrace ewes: evaluation of the role of insulin resistance in the susceptibility to ovine pregnancy toxemia. *Domest Anim Endocrinol* 44, 213-221.
- Ehinger, A.M.; Schmidt, H.; Kietzmann, M., 2006: Tissue distribution of cefquinome after intramammary and "systemic" administration in the isolated perfused bovine udder. *Vet J* **172**, 147-153.
- El Faro L and Albuquerque LG 2003. Estimação de Parâmetros Genéticos para Produção de Leite no Dia do Controle e Produção Acumulada até 305 dias, para as Primeiras Lactações de Vacas da Raça Caracu. *R. Bras. Zootec* 32, 284-294.
- EMA, 2000: Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect (Butafosfan - Extension to lactating cows). *The european agency for the evaluation of medicinal Products Veterinary Medicines and Information technology unit*.
- Furll, M.; Deniz, A.; Westphal, B.; Illing, C.; Constable, P.D., 2010: Effect of multiple intravenous injections of butaphosphan and cyanocobalamin on the metabolism of periparturient dairy cows. *J Dairy Sci* **93**, 4155-4164.
- Grunberg W, Staufenbiel R, Constable PD, Dann HM, Morin DE and Drackley JK 2009. Liver phosphorus content in Holstein-Friesian cows during the transition period. *J Dairy Sci* 92, 2106-2117.
- Gutierrez CG, Gong JG, Bramley TA and Webb R 2006. Selection on predicted breeding value for milk production delays ovulation independently of changes in

follicular development, milk production and body weight. *Animal Reproduction Science* 95, 193-205.

Hammon DS, Evjen IM, Dhiman TR, Goff JP and Walters JL 2006. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Vet Immunol Immunopathol* 113, 21-29.

Heuer C, Van Straalen WM, Schukken YH, Dirkzwager A and Noordhuizen JPTM 2000. Prediction of energy balance in a high yielding dairy herd in early lactation: model development and precision. *Livestock Production Science* 65, 91-105.

Kehrli, M.E., Jr.; Shuster, D.E., 1994: Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. *J Dairy Sci* 77, 619-627.

Kerestes M, Faigl V, Kulcsar A, Balogh O, Foldi J, Febel H, Chilliard Y and Huszenicza G 2009. Periparturient insulin secretion and whole-body insulin responsiveness in dairy cows showing various forms of ketone pattern with or without puerperal metritis. *Domestic Animal Endocrinology* 37, 250-261.

Kleen, J.L.; Barrett, D.C.; Courcier, E.; Biggs, A.M., 2009: COMPARISON OF TWO TREATMENTS FOR CLINICAL MASTITIS USING CEFQUINOME (COBACTAN®). British Mastitis Conference.

Kreipe, L.; Deniz, A.; Bruckmaier, R.M.; van Dorland, H.A., 2011: First report about the mode of action of combined butafosfan and cyanocobalamin on hepatic metabolism in nonketotic early lactating cows. *Journal of dairy science* 94, 4904-4914.

Kronfeld DS 1982. Major metabolic determinants of milk volume, mammary efficiency, and spontaneous ketosis in dairy cows. *J Dairy Sci* 65, 2204-2212.

Littell, R.C.; Henry, P.R.; Ammerman, C.B., 1998: Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *Journal of Animal Science* 76, 1216-1231.

Loker S, Bastin C, Miglior F, Sewalem A, Schaeffer LR, Jamrozik J, Osborne V and Ali A 2013. Development of a genetic evaluation for body condition score for Canadian Holsteins. *Journal of Dairy Science* 96, 3994-4004.

Lorenzo M, Fernandez-Veledo S, Vila-Bedmar R, Garcia-Guerra L, De Alvaro C and Nieto-Vazquez I 2008. Insulin resistance induced by tumor necrosis factor- α in myocytes and brown adipocytes. *Journal of Animal Science* 86, E94-104.

Mattmiller SA, Corl CM, Gandy JC, Looor JJ and Sordillo LM 2011. Glucose transporter and hypoxia-associated gene expression in the mammary gland of transition dairy cattle. *J Dairy Sci* 94, 2912-2922.

Meconi, S.; Capo, C.; Remacle-Bonnet, M.; Pommier, G.; Raoult, D.; Mege, J.L., 2001: Activation of protein tyrosine kinases by *Coxiella burnetii*: role in

actin cytoskeleton reorganization and bacterial phagocytosis. *Infect Immun***69**, 2520-2526.

Mehrzhad, J.; Duchateau, L.; Burvenich, C., 2004: Viability of milk neutrophils and severity of bovine coliform mastitis. *J Dairy Sci***87**, 4150-4162.

Melendez, P.; Marin, M.P.; Robles, J.; Rios, C.; Duchens, M.; Archbald, L., 2009: Relationship between serum nonesterified fatty acids at calving and the incidence of periparturient diseases in Holstein dairy cows. *Theriogenology***72**, 826-833.

Monfardini, E.; Paape, M.J.; Wang, Y.; Capuco, A.V.; Husheem, M.; Wood, L.; Burvenich, C., 2002: Evaluation of L-selectin expression and assessment of protein tyrosine phosphorylation in bovine polymorphonuclear neutrophil leukocytes around parturition. *Vet Res***33**, 271-281.

Moyes, K.M.; Larsen, T.; Friggens, N.C.; Drackley, J.K.; Ingvarsen, K.L., 2009: Identification of potential markers in blood for the development of subclinical and clinical mastitis in dairy cattle at parturition and during early lactation. *J Dairy Sci***92**, 5419-5428.

Ning J, Hong T, Yang X, Mei S, Liu Z, Liu HY and Cao W 2011. Insulin and insulin signaling play a critical role in fat induction of insulin resistance in mouse. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301, E391-401.

Ogola, H.; Shitandi, A.; Nanua, J., 2007: Effect of mastitis on raw milk compositional quality. *Journal of Veterinary Science***8**, 237-242.

Oviedo-Boyso, J.; Valdez-Alarcon, J.J.; Cajero-Juarez, M.; Ochoa-Zarzosa, A.; Lopez-Meza, J.E.; Bravo-Patino, A.; Baizabal-Aguirre, V.M., 2007: Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J Infect***54**, 399-409.

Paape, M.J.; Bannerman, D.D.; Zhao, X.; Lee, J.W., 2003: The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet Res***34**, 597-627.

Parra, A.J.A.; Ortega, A.A.L.; Mendoza, C.A.; Delgado, N., 2009: Efecto de la mastitis clínica y subclínica sobre la concentración plasmática de metabolitos, proteínas totales y albúmina en hembras bovinas. *Zootecnia Tropical***27**.

Patton J, Kenny DA, McNamara S, Mee JF, O'Mara FP, Diskin MG and Murphy JJ 2007. Relationships among milk production, energy balance, plasma analytes, and reproduction in Holstein-Friesian cows. *J Dairy Sci* 90, 649-658.

Pereira, R.A.; Silveira, P.A.; Montagner, P.; Schneider, A.; Schmitt, E.; Rabassa, V.R.; Pfeifer, L.F.; Del Pino, F.A.; Pulga, M.E.; Correa, M.N., 2013: Effect of butaphosphan and cyanocobalamin on postpartum metabolism and milk production in dairy cows. *Animal*, 1-5.

Pires JAA, Delavaud C, Faulconnier Y, Pomiès D and Chilliard Y 2013. Effects of body condition score at calving on indicators of fat and protein mobilization of periparturient Holstein-Friesian cows. *Journal of dairy science* 96, 6423-6439.

- Pithon-Curi, T.C.; De Melo, M.P.; Curi, R., 2004: Glucose and glutamine utilization by rat lymphocytes, monocytes and neutrophils in culture: a comparative study. *Cell Biochem Funct***22**, 321-326.
- Raggio G, Lobley GE, Berthiaume R, Pellerin D, Allard G, Dubreuil P and Lapierre H 2007. Effect of protein supply on hepatic synthesis of plasma and constitutive proteins in lactating dairy cows. *Journal of dairy science* 90, 352-359.
- Regnault TR, Oddy HV, Nancarrow C, Sriskandarajah N and Scaramuzzi RJ 2004. Glucose-stimulated insulin response in pregnant sheep following acute suppression of plasma non-esterified fatty acid concentrations. *Reprod Biol Endocrinol* 2, 64.
- Rocco SM and McNamara JR 2013. Regulation of bovine adipose tissue metabolism during lactation. 7. Metabolism and gene expression as a function of genetic merit and dietary energy intake. *Journal of dairy science* 96, 3108-3119.
- Roche JR, Berry DP and Kolver ES 2006. Holstein-Friesian strain and feed effects on milk production, body weight, and body condition score profiles in grazing dairy cows. *Journal of Dairy Science* 89, 3532-3543.
- Roche JR, Friggens NC, Kay JK, Fisher MW, Stafford KJ and Berry DP 2009. Invited review: Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *Journal of Dairy Science* 92, 5769-5801.
- Rollin, E.; Berghaus, R.D.; Rapnicki, P.; Godden, S.M.; Overton, M.W., 2010: The effect of injectable butaphosphan and cyanocobalamin on postpartum serum beta-hydroxybutyrate, calcium, and phosphorus concentrations in dairy cattle. *J Dairy Sci***93**, 978-987.
- Ruan H and Lodish HF 2003. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor- α . *Cytokine & Growth Factor Reviews* 14, 447-455.
- Sander, A.K.; Piechotta, M.; Schlamberger, G.; Bollwein, H.; Kaske, M.; Sipka, A.; Schuberth, H.J., 2011: Ex vivo phagocytic overall performance of neutrophilic granulocytes and the relation to plasma insulin-like growth factor-I concentrations in dairy cows during the transition period. *Journal of Dairy Science***94**, 1762-1771.
- Santos JEP, Bisinotto RS, Ribeiro ES, Lima FS, Greco LF, Staples CR and Thatcher WW 2010. Applying nutrition and physiology to improve reproduction in dairy cattle. *Reproduction in Domestic Ruminants* 67, 387-403.
- Scalia D, Lacetera N, Bernabucci U, Demeyere K, Duchateau L and Burvenich C 2006. In vitro effects of nonesterified fatty acids on bovine neutrophils oxidative burst and viability. *Journal of Dairy Science* 89, 147-154.
- Schukken, Y.H.; Bennett, G.J.; Zurakowski, M.J.; Sharkey, H.L.; Rauch, B.J.; Thomas, M.J.; Ceglowski, B.; Saltman, R.L.; Belomestnykh, N.; Zadoks, R.N.,

2011: Randomized clinical trial to evaluate the efficacy of a 5-day ceftiofur hydrochloride intramammary treatment on nonsevere gram-negative clinical mastitis. *J Dairy Sci***94**, 6203-6215.

SGARBIERI VC 2005. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. *Braz. J. Food Technol* 8, 43-56.

SHARIF, A.; MUHAMMAD, G., 2008: SOMATIC CELL COUNT AS AN INDICATOR OF UDDER HEALTH STATUS UNDER MODERN DAIRY PRODUCTION: A REVIEW. *Pakistan Vet. J.*,**28**.

Sharma, N.; Singh, N.K.; Bhadwal, M.S., 2011: Relationship of Somatic Cell Count and Mastitis: An Overview. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.***24**, 429-438.

Shim, E.H.; Shanks, R.D.; Morin, D.E., 2004: Milk Loss and Treatment Costs Associated with Two Treatment Protocols for Clinical Mastitis in Dairy Cows. *Journal of dairy science***87**, 2702-2708.

Shpigel NY, Avidar Y and Bogin E 2003. Value of measurements of the serum activities of creatine phosphokinase, aspartate aminotransferase and lactate dehydrogenase for predicting whether recumbent dairy cows will recover. *Veterinary Record* 152, 773-776.

Sweeney, J.F.; Nguyen, P.K.; Omann, G.M.; Hinshaw, D.B., 1998: Lipopolysaccharide Protects Polymorphonuclear Leukocytes from Apoptosis via Tyrosine Phosphorylation-Dependent Signal Transduction Pathways. *Journal of Surgical Research***74**, 64-70.

Trevisi, E.; Zecconi, A.; Cogrossi, S.; Razzuoli, E.; Grossi, P.; Amadori, M., Strategies for reduced antibiotic usage in dairy cattle farms. *Research in Veterinary Science*.

Tsuruzoe K, Emkey R, Kriauciunas KM, Ueki K and Kahn CR 2001. Insulin receptor substrate 3 (IRS-3) and IRS-4 impair IRS-1- and IRS-2-mediated signaling. *Mol Cell Biol* 21, 26-38.

Wildman EE, Jones GM, Wagner PE, Boman RL, Troutt HF and Lesch TN 1982. A Dairy-Cow Body Condition Scoring System and Its Relationship to Selected Production Characteristics. *Journal of dairy science* 65, 495-501.

Zhang ZG, Wang JG, Gao RF, Zhang WQ, Li XW, Liu GW, Li XB, Wang Z and Zhu XL 2013. High-Energy Diet at Antepartum Decreases Insulin Receptor Gene Expression in Adipose Tissue of Postpartum Dairy Cows. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 57, 203-207.

Zonca, A.; Gallo, M.; Locatelli, C.; Carli, S.; Moroni, P.; Villa, R.; Cagnardi, P., 2011: Cefquinome sulfate behavior after intramammary administration in healthy and infected cows. *J Dairy Sci***94**, 3455-3461.