

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia



Tese

**Avaliação da mastite e seu impacto sobre a  
sensibilidade à dor em vacas leiteiras**

**Mônica Daiana de Paula Peters**

Pelotas, 2012

**MÔNICA DAIANA DE PAULA PETERS**

**AVALIAÇÃO DA MASTITE E SEU IMPACTO SOBRE A SENSIBILIDADE À DOR  
EM VACAS LEITEIRAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área do conhecimento: Produção Animal).

Orientadora: Isabella Dias Barbosa Silveira

Co-Orientadora: Vivian Fischer

Pelotas, 2012

**Dados de catalogação na fonte:  
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)**

P482a Peters, Mônica Daiana de Paula

Avaliação da mastite e seu impacto sobre a sensibilidade à dor em vacas leiteiras / Mônica Daiana de Paula Peters ; orientador Isabella Dias Barbosa Silveira; co-orientador Vivian Fischer-Pelotas, 2012.-97f. ; il..-Tese ( Doutorado ) .Área de conhecimento Produção animal.–Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2012.

1.Bovinos de leite 2.Mamite 3.Dor 4.Limiar Nociceptivo  
I.Silveira, Isabella Dias Barbosa(orientador) II .Título.

CDD 636.2082 4

**Banca examinadora:**

Dr<sup>a</sup>. Isabella Dias Barbosa Silveira

Dr<sup>a</sup>. Mabel Mascarenhas Wiegand

Dr. Adroaldo Jose Zanella

Dr. Jerri Teixeira Zanusso

Dr. Carlos Eduardo da Silva Pedroso

Suplente: Dr. Jorge Schafhauser Jr.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por nunca ter me abandonado nesta caminhada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pela oportunidade de realização de um sonho e a CAPES pela bolsa de estudos.

Ao meu esposo Michel, pelo amor, companheirismo, amizade, incentivo e ajuda em todos os momentos.

Aos meus pais, Lindolfo e Jandira, pelo amor, carinho e incentivo nessa caminhada.

A minha irmã Simone, pelo carinho, amizade, dedicação e auxílio em todos os momentos de minha vida.

Ao meu sobrinho Matheus por alegrar nossas vidas.

A minha orientadora Isabella Silveira pela amizade, incentivo e orientação.

A minha co-orientadora Vivian Fischer pelo carinho e orientação.

As propriedades leiteiras de Pelotas e Bagé, pela possibilidade de executar minha pesquisa.

Aos amigos de sempre, Débora Lopes e Diones Almeida pela parceria, motivação e alegria em todos os momentos.

A amiga Sandra Moura pela amizade e ajuda incansável.

A amiga Júlia Silva pelo incentivo e amizade.

A prima e amiga Viviane de Paula pela amizade, correções na tese e “orientação” na hora que mais precisei.

Aos estagiários e bolsistas do GECAP-UFPel, em especial a Lívia e Bianca, por toda a ajuda e amizade.

Aos bolsistas do GEPZ/IFSul-Bagé, Jordano, Otto e Klinsmann pela ajuda de todas as madrugadas frias de experimento em Bagé.

A todos os amigos do IFSul-*campus* Bagé pelo carinho e incentivo.

Ao amigo Otoniel pela ajuda nas análises.

A todos os colegas e amigos do PPGZ que fizeram das aulas, reuniões e confraternizações maravilhosos encontros entre amigos.

## Resumo

PETERS, Mônica Daiana de Paula. **Avaliação da mastite e seu impacto sobre a sensibilidade à dor em vacas leiteiras**. 2012. 97f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A presente tese apresenta dois trabalhos que envolvem a avaliação da mastite em seus diferentes níveis, bem como seu tratamento, analisando as respostas de dor de vacas leiteiras em função destes aspectos. O primeiro refere-se aos efeitos dos diferentes níveis de mastite sobre a contagem de células somáticas, limiar de dor e níveis de proteínas de fase aguda (PFAs), amilóide sérica A (SAA) e fibrinogênio. Foram avaliadas 100 vacas em lactação com níveis diferentes de mastite, sendo assim classificadas: nível 0 - vaca sadia; nível 1 - mastite subclínica grau 1; nível 2 - mastite subclínica grau 2; nível 3 - mastite subclínica grau 3; nível 4 - mastite clínica. A CCS do leite de vacas com mastite clínica foi significativamente superior a de vacas com a doença nos diferentes níveis subclínicos, bem como a de vacas sadias. A sensibilidade à dor entre casos de mastite clínica e subclínica é semelhante e apenas vacas com mastite clínica apresentam menor resistência à dor do que vacas sadias. O limiar de dor nos membros posteriores, direito ou esquerdo, não sofre influência do lado da glândula mamária afetada pela mastite. As concentrações de PFAs, SAA e fibrinogênio, não são influenciadas pela ausência ou ocorrência de mastite. O segundo trabalho avaliou os efeitos da utilização do antiinflamatório não-esteróide (AINE) cetoprofeno, em associação com antibiótico, na sensibilidade à dor de vacas acometidas por mastite clínica. Verificou-se que o limiar de dor no período sem tratamento foi significativamente menor que no primeiro dia após o início do tratamento e este, por sua vez, não diferiu do limiar no segundo dia após o início do tratamento. No entanto, o limiar, dois dias após o início do tratamento também não diferiu do limiar no momento sem tratamento. Observou-se uma maior variação nas respostas de limiar de dor das vacas no período que antecedeu ao tratamento, com redução desta no primeiro dia após iniciado o tratamento. Vacas com mastite clínica tratadas com AINE apresentam redução na sensibilidade à dor apenas no primeiro dia após o início do tratamento. A mastite clínica causa dor em vacas leiteiras, sendo necessários mais estudos visando adotar tratamentos eficientes na redução da sensação dolorosa para assim atender ao bem-estar animal.

Palavras-chave: bovinos de leite. mastite. limiar nociceptivo.

## Abstract

PETERS, Mônica Daiana de Paula. **Mastitis' evaluation and its impact upon sensibility to pain for dairy cows.** 2012. 97f. Tese (Doutorado) –Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

This thesis presents two studies about evaluation of different levels of mastitis and their treatments besides analyzing the corresponding pain responses in dairy cows. The first study is about the effects of mastitis levels upon somatic cells count, pain thresholds and acute phase proteins concentration (APP): serum amyloid A (SAA) and fibrinogen. One hundred lactating cows were evaluated with different mastitis levels, being classified as follows: level zero (healthy cow), level 1 (subclinical mastitis first degree), level 2 (subclinical mastitis second degree), level 3 (subclinical mastitis third degree), level 4 (clinical mastitis). SCC of the milk from cows affected with clinical mastitis is significantly higher than milk from cows with subclinical mastitis at different levels, as well as healthy cows. Sensibility to pain is similar among clinical and subclinical mastitis, but cows presenting clinical mastitis show lower resistance to pain than healthy cows. Pain threshold measured in the hind limbs (right or left) is not affected by affected mammary gland side. Acute phase proteins (SAA and fibrinogen) are not affected by absence or occurrence of mastitis. The second study evaluated the non steroid anti-inflammatory (AINE) ketoprofen associated to antibiotic upon pain sensibility of cows affected by clinical mastitis. The pain threshold measured on the period without treatment was significantly lower than in the first day after beginning of the treatment, which was similar to the threshold measured on the second day after the beginning of the treatment, which was similar to that measured before the treatment. Variability in pain threshold among cows was larger at the period before the beginning of treatment, but it decreased on the first day after the beginning of the treatment. Cows with clinical mastitis and treated with AINE show reduction in pain sensibility just on the first day after the beginning of the treatment. Clinical mastitis cause pain in dairy cows, being needed more researches aimed at adoption of an efficient treatment to decrease pain sensibility to increase animal welfare.

**Keywords:** dairy cattle. Mastitis. Threshold nociceptive.

## Lista de Figuras

### REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1	Trajetória de um estímulo nocivo demonstrando as vias envolvidas na sensação dolorosa.....	39
Figura 2	Padrão de resposta de biomarcadores inflamatórios frente à lesão tecidual.....	48
Figura 3	Interação baixo grau de bem-estar animal e doença.....	56

### ARTIGO 2

Figura 1	Médias dos limiares de dor em cada um dos três períodos (T0: antes do tratamento; T1: 1 dia após o início do tratamento; T2: 2 dias após o início do tratamento) e respectivos erro padrão.....	79
----------	---	----

## Lista de Tabelas

Tabela 1	Alterações na composição do leite de vacas com mastite subclínica.....	36
----------	--	----

### ARTIGO 1

Tabela 1	Limiar térmico de dor em vacas com diferentes níveis de mastite.....	67
----------	--	----

Tabela 2	Limiar térmico de dor nos membros posteriores, direito e esquerdo, em vacas com mastite em um único lado da glândula mamária (GM).....	68
----------	--	----

Tabela 3	Contagem de células somáticas (CCS) em diferentes níveis de mastite em vacas leiteiras em Pelotas e Bagé, RS.....	68
----------	---	----

Tabela 4	Níveis sanguíneos de amilóide sérica A (SAA) e fibrinogênio segundo os níveis de mastite.....	69
----------	---	----

### ARTIGO 2

Tabela 1	Valores máximo e mínimo de limiares de dor para os tratamentos (T0: antes do tratamento; T1: 1 dia após o início do tratamento; T2: 2 dias após o início do tratamento) e seus respectivos coeficientes de variação (CV) e desvio padrão (DP).....	81
----------	--	----

## Sumário

<b>1. Introdução Geral.....</b>	<b>11</b>
<b>2. Projeto de Pesquisa.....</b>	<b>13</b>
<b>3. Revisão de Literatura.....</b>	<b>27</b>
3.1. Mastite bovina.....	27
3.1.1. Introdução.....	27
3.1.2. Tipos de mastite.....	28
3.1.2.1. Mastite clínica.....	28
3.1.2.2. Mastite subclínica.....	28
3.1.3. Agentes etiológicos causadores da mastite.....	29
3.1.4. Diagnóstico da mastite.....	30
3.1.4.1. Diagnóstico da mastite clínica.....	30
3.1.4.2. Diagnóstico da mastite subclínica.....	30
3.1.5. Fatores de predisposição à mastite.....	32
3.1.6. Controle e tratamento da mastite.....	33
3.1.7. Alterações no leite causadas pela mastite.....	35
3.2. Dor.....	36
3.2.1. Introdução.....	36
3.2.2. Mecanismos da dor em mamíferos.....	37
3.2.2.1. Nocicepção.....	37
3.2.2.2. Classificações da dor.....	40
3.2.3. Avaliação de dor em bovinos.....	42
3.2.3.1. Medidas comportamentais de dor.....	43
3.2.3.2. Medidas fisiológicas de dor.....	45
3.2.3.3. Proteínas de fase aguda como indicadores de dor.....	46
3.2.3.4. Limiar nociceptivo como indicador de dor.....	48
3.2.4. Prevenção e tratamento da dor.....	49
3.3. Bem-estar de bovinos leiteiros.....	52
3.3.1. Introdução.....	52
3.3.2. Avaliação de bem-estar.....	53
3.4. Mastite, dor e Bem-estar animal.....	55
<b>4. Relatório do trabalho de campo.....</b>	<b>57</b>
4.1. Local e unidades experimentais.....	57

4.2. Período.....	57
4.3. Coleta, geração e análise de dados.....	57
<b>5. Artigo 1.....</b>	<b>61</b>
Impacto da mastite bovina na contagem de células somáticas, na sensibilidade a dor e nos níveis de proteínas de fase aguda.....	61
Resumo.....	61
Abstract.....	62
Introdução.....	63
Material e Métodos.....	64
Resultados e Discussão.....	66
Conclusões.....	70
Referências Bibliográficas.....	70
<b>6. Artigo 2.....</b>	<b>74</b>
Efeito do tratamento com o antiinflamatório não esteróide cetoprofeno na sensibilidade à dor de vacas leiteiras com mastite clínica.....	74
Resumo.....	74
Abstract.....	75
Introdução.....	75
Material e Métodos.....	77
Resultados e Discussão.....	78
Conclusões.....	81
Referências Bibliográficas.....	81
<b>7. Considerações finais.....</b>	<b>85</b>
<b>8. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>87</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A cadeia produtiva do leite vem sofrendo uma verdadeira revolução nos últimos 15 anos. Dentro desse contexto de rápidas transformações, em que obviamente muito ainda precisa ser feito, questões relacionadas a doenças e bem-estar animal merecem atenção. Apesar do desenvolvimento de diversas estratégias de controle e prevenção, a mastite continua sendo a doença que mais causa prejuízos a atividade leiteira, afetando diretamente produtores, indústria, consumidor final (SANTOS e FONSECA, 2007), além é claro dos próprios animais. Estima-se que devido à alta prevalência de mastite nos rebanhos leiteiros brasileiros, possam ocorrer perdas de produção entre 12 e 15% (SANTOS e FONSECA, 2007), o que significa uma perda de 4,0 bilhões de litros em relação à produção de leite anual. A mastite afeta rebanhos leiteiros do mundo inteiro, sendo considerada não só um problema econômico, mas também um sério problema ao bem-estar animal (BROOM e FRASER, 2010).

O bem-estar animal é um assunto amplamente discutido em escala mundial, o qual pode ser considerado uma demanda, pois os mercados consumidores, especialmente aqueles dos países desenvolvidos, tornaram-se cada vez mais exigentes no que diz respeito aos métodos para obtenção de um produto final de qualidade. Para ter um alto grau de bem-estar atendido faz-se necessário cumprir as “cinco liberdades” inerentes aos animais (FITZPATRICK, SCOTT e NOLAN, 2006) e, entre elas, merece destaque a liberdade referente à sanidade, a qual prevê que todo animal deve estar livre de dor, ferimento ou doença. Dor associada com doenças inflamatórias, como a mastite, é provavelmente a maior fonte de dor em ruminantes (FITZPATRICK, SCOTT e NOLAN, 2006) e, por isso, pode-se dizer que um bovino leiteiro com infecção da glândula mamária (mastite) está em condições de doença e,

provavelmente, a dor faça parte do seu quadro clínico, resultando assim em baixo grau de bem-estar animal.

A mastite é fácil de ser diagnosticada, no entanto, cabe enfatizar que não é o diagnóstico da enfermidade que ocasiona o bem-estar, mas o tratamento da doença e alívio da dor decorrente (BROOM e FRASER, 2010). A preocupação com o controle da dor pode ser vantajosa para a própria produtividade, pois um animal com dor diminui, por exemplo, a ingestão de alimentos o que resultará em menor produção de leite (HELLEBREKERS, 2002). Além disso, o alívio adequado da dor inflamatória estabelece uma condição de bem-estar geral do animal, com efeitos positivos sobre a velocidade e qualidade da recuperação (HELLEBREKERS, 2002), e talvez, com impacto sobre a capacidade produtiva em lactações futuras.

O tratamento da dor em animais de produção como bovinos leiteiros, não progrediu com a mesma intensidade que em animais de companhia (SHORT, 2003) e os principais motivos para isso são as dificuldades em reconhecer dor e a falta de conhecimento sobre a terapia adequada, destacando a necessidade de mais pesquisas e treinamento nessa área.

As pesquisas avaliando a relação específica da infecção da glândula mamária bovina com a dor são incipientes, pois é difícil quantificar a dor experimentada por vacas afetadas pela mastite e o quanto o bem-estar é prejudicado. No entanto, cabe afirmar que os animais são seres sencientes, tendo capacidade de sentir e perceber dor (HOUP, 2006), ou seja, se a mastite causa dor essa é, sem dúvida, percebida pelos animais, podendo assim comprometer o bem-estar e a produtividade animal.

Os objetivos deste trabalho foram num primeiro momento, avaliar os efeitos da mastite, envolvendo seus diferentes níveis de apresentação, sobre os indicadores de dor adotados e, num segundo momento, tratar a dor em casos clínicos da doença, verificando os efeitos da terapia sob o alívio da sensação dolorosa.

## **2 PROJETO DE PESQUISA**

**Relação entre mastite, dor e bem-estar em bovinos leiteiros**

**Doutoranda: Mônica Daiana de Paula Peters**

**Orientadora: Profª Drª. Isabella Dias Barbosa Silveira**

**Co-orientadora: Profª Drª. Vivian Fischer**

## 2.1 Caracterização do Problema

---

A mastite é considerada a principal doença que afeta os rebanhos leiteiros do mundo e aquela que proporciona as maiores perdas econômicas na exploração de bovinos leiteiros. Estima-se que haja um prejuízo de cerca de US\$ 1,8 bilhões/ano nos EUA em função da ocorrência de mastite. Já no Brasil, pode-se deduzir que em função da alta prevalência de mastite nos rebanhos, possam ocorrer perdas de produção entre 12 e 15%, o que significa um total de 2,8 bilhões de litros/ano em relação à produção anual de 21 bilhões de litros (FONSECA e SANTOS, 2000).

A mastite caracteriza-se por uma inflamação da glândula mamária, geralmente de caráter infeccioso, podendo ser classificada como clínica ou subclínica. A mastite clínica apresenta sinais evidentes, tais como: edema, aumento de temperatura, endurecimento, dor na glândula mamária, grumos, pus ou qualquer alteração das características do leite (FONSECA e SANTOS, 2000). Na forma subclínica não se observa sinais visíveis de inflamação do úbere e sim alterações na composição do leite (CULLOR et al., 1994).

Além das perdas decorrentes da redução na produção de leite e alterações na composição química do leite (FONSECA e SANTOS, 2000), fatores relacionados à dor e desconforto causado pela mastite e efeitos sobre o bem-estar animal devem ser considerados.

Na produção animal, a importância de uma doença é freqüentemente julgada pelo impacto econômico direto, mas uma visão ampla exige um melhor entendimento de como determinada doença afeta o bem-estar animal (WELLS, OTT e HILLBERG SEITZINGER, 1998). Como ocorre em outras doenças, é difícil conhecer como a mastite afeta o bem-estar dos animais. No entanto, é conhecido que o efeito da mastite no animal depende da forma da doença. Por exemplo, mastite sistêmica tem uma longa duração do efeito em relação à mastite localizada (BAREILLE et al., 2003) e pode ter maiores consequências ao bem-estar.

O bem-estar animal é um assunto amplamente discutido em escala mundial, o qual pode ser considerado uma demanda, pois os mercados consumidores, especialmente aqueles dos países desenvolvidos, tornaram-se cada vez mais exigentes no que diz respeito à qualidade do produto final. A Farm Animal Welfare Council (FAWC), órgão consultivo do governo britânico sobre bem-estar dos animais nas explorações pecuárias definiu as “Cinco Liberdades”, as quais são diretrizes

para formar a base dos códigos atuais de recomendação para o bem-estar de todas as espécies de animais (FITZPATRICK et al., 2006). As cinco liberdades são:

1. A liberdade fisiológica (livre de fome e de sede);
2. A liberdade ambiental (livre de desconforto);
3. A liberdade referente à sanidade (livre de dor, ferimento ou doença);
4. A liberdade comportamental (livre para expressar padrões normais de comportamento);
5. A liberdade psicológica (livre de medo e estresse).

A terceira liberdade refere-se ao animal estar livre de dor, ferimento ou doença, ou seja, um animal que está com inflamação da glândula mamária (mastite) está submetido à doença e, provavelmente, a dor, o que resulta no não atendimento desta liberdade, com efeitos negativos sobre o bem-estar animal.

Além da questão ética e moral do bem-estar animal, a dor não-controlada é biologicamente prejudicial. A dor não-aliviada é biologicamente ativa, como um grande estresse biológico, e afeta numerosos aspectos da saúde física, desde a cura de ferimentos até a resistência a doenças infecciosas (ROLLIN, 2002). A preocupação com o bem-estar animal e controle da dor pode ser vantajosa para a própria produtividade, pois um animal com dor diminui, por exemplo, a ingestão de alimentos o que resultará em menor ganho de peso ou menor produção de leite (HELLEBREKERS, 2002).

A habilidade para quantificar o grau de dor experimentada por animais é um importante componente na avaliação do bem-estar animal (BARNETT, 1997). No entanto, a avaliação de dor em animais de produção é freqüentemente difícil. Por exemplo, vacas podem não demonstrar sinais óbvios quando em dor crônica senão na redução da produção de leite (SHORT, 1998).

É consensual entre os pesquisadores que o controle da dor em situações de enfermidades dos animais é essencial para o seu bem-estar. Dor associada com doenças inflamatórias, como a mastite, é provavelmente a maior fonte de dor em ruminantes (FITZPATRICK et al., 2006). Entretanto, pouco se conhece sobre indicadores de dor em bovinos. Existem estudos sobre indicadores de dor em ovinos domesticados (STUBSJØEN et al., 2009), mas faz-se necessário pesquisas que testem a aplicação destes para bovinos.

Os estudos têm testados os seguintes parâmetros como indicadores de dor: limiar nociceptivo (PINHEIRO MACHADO FILHO, HURNIK e EWING, 1998; POTTER et al., 2006; STUBSJØEN, VALLE e ZANELLA, 2010), medidas comportamentais (WEARY et al., 2006; STUBSJØEN et al., 2009), termografia infravermelha (STEWART et al., 2008; STUBSJØEN et al., 2009), medidas de variabilidade da frequência cardíaca (VON BORELL et al., 2007; STUBSJØEN et al., 2009), níveis de cortisol (KENT et al., 1993), níveis de proteínas inflamatórias (FITZPATRICK et al., 1998), entre outros.

PETERS (dados não publicados) encontrou uma variação significativa no limiar nociceptivo térmico de vacas com mastite clínica em relação a vacas com mastite subclínica, bem como em relação às sadias. Este resultado preliminar chama a atenção para a necessidade de maior investigação dos efeitos da mastite bovina, de diferentes graus, sobre os indicadores de dor já testados em outras espécies animais.

Apesar do atual reconhecimento, pelas pessoas, da capacidade dos animais em sentir dor, nem sempre um tratamento adequado é seguido. Estudo examinando as atitudes de veterinários franceses revelou que 96% dos inquiridos eram moderadamente ou extremamente preocupados com reconhecimento e alívio da dor animal (HUGONNARD et al., 2004). Os dois principais motivos apresentados para a falta de tratamento foram dificuldades em reconhecer a dor e falta de conhecimento sobre a terapêutica adequada, destacando a necessidade de maior pesquisa e treinamento nesta área.

O tratamento da dor em animais de produção não progrediu com a mesma intensidade que em animais de companhia, permanecendo um desafio para os profissionais ligados a atividade (SHORT, 2003). Algumas das razões para o baixo uso de medicamentos analgésicos em animais estão relacionadas a aspectos econômicos e práticos, tais como o baixo custo de cada animal em relação ao custo do tratamento ou a necessidade de maior mão-de-obra para aplicação dos tratamentos. Além disso, tem a preocupação com os resíduos das drogas nos alimentos de origem animal e a necessidade de observar o período de carência (VIÑUELA-FERNÁNDEZ et al., 2007).

Entre as drogas mais populares da atualidade que tem demonstrado eficácia no tratamento da dor estão os anti-inflamatórios não-esteróides (AINEs), os quais compartilham ações terapêuticas, incluindo uma capacidade analgésica, anti-

inflamatória e antipirética (GAYNOR e MUIR, 2009). Para o tratamento da mastite utiliza-se rotineiramente antibióticos, mas AINEs podem também ser utilizados para melhorar o bem-estar e aumentar a velocidade de recuperação de animais doentes (FITZPATRICK et al., 2006). Contudo, até o momento poucos estudos (FITZPATRICK et al., 1998) foram desenvolvidos para avaliar os efeitos de determinado AINEs sobre indicadores de dor relacionado à mastite, bem como sobre o desempenho produtivo. Desta forma, acredita-se que um tratamento polimodal (antibiótico + AINEs) para mastite resultará em benefícios, detectados através dos indicadores de dor testados, bem como efeitos sobre a vida produtiva da vaca.

## **2.2 Objetivos e Metas**

---

Estudar a relação entre a dor e o bem-estar animal em vacas leiteiras com mastite, verificando os efeitos na vida produtiva da vaca.

Desenvolver e testar indicadores de dor em vacas leiteiras com infecções intramamárias;

Investigar se vacas com diferentes graus de mastite apresentam alterações dos indicadores de dor;

Investigar o efeito da droga antiinflamatória não-esteróide nos indicadores de dor;

Avaliar o efeito da droga antiinflamatória não-esteróide sobre os indicadores produtivos.

## **2.3 Metodologia**

---

O projeto será desenvolvido utilizando animais da raça Jersey e/ou Holandês, pertencentes à Unidade de Produção Leiteira (UPL), localizada na região Sul do Rio Grande do Sul, em duas etapas experimentais.

A primeira etapa será realizada com o objetivo de testar os indicadores de dor, verificando se existe diferença de resposta entre vacas mastíticas e não-mastíticas. Para isto, primeiramente realizar-se-á a identificação dos animais que apresentem casos naturais de mastite, através da observação e palpação do úbere, teste da caneca de fundo preto e CMT (*California Mastitis Test*). Após serão realizadas medidas de dor (avaliações comportamentais e fisiológicas, descritas a seguir), nestes animais bem como nos demais que foram considerados não-

mastíticos. Além das medidas de dor, amostras de leite serão coletadas de todos os animais para contagem de células somáticas (CCS) e assim, classificar as vacas em diferentes graus de mastite, levando em consideração os níveis de CCS, bem como os testes subjetivos realizados e exame do úbere. Nesta etapa, o número de animais utilizados será o total de vacas em ordenha na UPL. As avaliações serão realizadas durante cinco (5) dias, onde se registrará a idade e estágio de lactação dos animais, para posterior utilização destas informações como co-variáveis na análise estatística.

Na segunda etapa serão utilizadas 20 vacas em lactação que estejam sofrendo com mastite. Os fatores idade, estágio de lactação e incidência anterior de mastite serão considerados para formação dos grupos, buscando diminuir a variabilidade entre e dentro de grupo.

Os tratamentos a serem utilizados são: T1=antibiótico; T2=antibiótico + antiinflamatório não-esteróide (AINE).

O antibiótico utilizado para o tratamento 1 (T1) e tratamento 2 (T2) será o adotado rotineiramente na UPL e o antiinflamatório não-esteróide testado no T2 será o cetoprofeno (Ketofen 10%, Merial). A escolha do AINE deve-se a este ter ação analgésica de longa duração (GRISNEAUX et al., 1999), ser licenciado para tratamento da mastite em bovinos (FITZPATRICK et al., 1998), não ter período de carência para o leite (Merial) e já ter sido usado em estudos de tratamento da mastite bovina (SHPIGEL et al., 1994). A dosagem do antiinflamatório não-esteróide (T2) será de 3 mg por kg de peso vivo, o que corresponde à dose de 3 ml de Ketofen® 10% para cada 100 kg de peso vivo por via intramuscular ou endovenosa, durante três (3) dias consecutivos, conforme recomendação do fabricante (Merial).

Esta etapa se subdividirá em três períodos de avaliação: antes do tratamento (P1), durante o tratamento (P2) e após o tratamento (P3). Dentro de cada período serão realizadas as seguintes avaliações como variáveis respostas indicadoras diretas e/ou indiretas de dor:

- Avaliações produtivas e qualitativas
- Avaliações comportamentais
- Avaliações bioquímicas
- Avaliações hematológicas
- Avaliações fisiológicas

Para as avaliações produtivas e qualitativas serão utilizadas as seguintes variáveis:

Produção de leite (PL): será registrada a produção de leite individual em litros/dia, através de medidor automático do sistema de ordenha;

Exame bacteriológico: amostra de leite individual será coletada e encaminhada ao laboratório para determinação do agente patogênico causador da mastite; esta avaliação será realizada apenas no período P1 (antes do tratamento);

Composição química do leite: será coletada amostra de leite individual e encaminhada ao laboratório para determinação da gordura, proteína, sólidos totais e lactose do leite;

Contagem de células somáticas (CCS): a partir da mesma amostra coletada para determinação da composição será realizada a contagem de células somáticas no Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS.

Contagem bacteriana total (CBT): será coletada amostra de leite individual e encaminhada ao laboratório para análise;

Para as avaliações comportamentais serão utilizados as seguintes variáveis:

Reatividade: será observada, na sala de ordenha, toda a movimentação do animal, desde a preparação do úbere até a retirada do conjunto de teteiras;

Ruminação (Ru): será observada, na sala de ordenha, a ocorrência dos movimentos de regurgitação e mastigação do alimento. Para avaliação da ruminação na sala de ordenha será realizada uma avaliação do comportamento ingestivo dos animais durante todo o dia, sendo registrados a cada cinco minutos os comportamentos apresentados pelos animais.

Defecação (De – eliminação de fezes) e Micção (Mi - eliminação de urina): será registrada a ocorrência ou não durante o tempo de permanência na sala de ordenha, bem como a frequência (número de vezes) com que ocorreu.

Posição da cabeça: será registrada a posição da cabeça do animal em relação ao corpo, durante sua permanência na sala de ordenha;

Comportamento social: será observada no campo a relação dos animais entre si, registrando comportamentos indicativos como isolamento do rebanho, falta de interação com outros animais, entre outros.

Comportamento ingestivo: será observada no campo a freqüência dos seguintes comportamentos: ingestão de alimentos, ingestão de água, ruminção em pé e deitado, ócio em pé e deitado.

Os observadores serão pessoas treinadas para interpretar corretamente as respostas comportamentais das vacas, sendo estas realizadas através de observação visual direta do comportamento dos animais.

Para as avaliações bioquímicas serão utilizados os seguintes indicadores:

Níveis de Haptoglobina (Hp) e Amilóide sérica A (SAA): será coletada amostra de sangue, sem adição de anticoagulante, com posterior separação do soro e parte deste (aproximadamente 4 ml) encaminhado ao laboratório para determinação destas proteínas de fase aguda;

Níveis de fibrinogênio: a partir da mesma amostra coletada para determinação dos parâmetros hematológicos será determinado os níveis de fibrinogênio por animal.

Para determinação dos parâmetros hematológicos serão coletadas amostras de sangue, com adição do anticoagulante EDTA (etilenodiaminotetra cético), para posterior determinação de leucócitos, hemácias, hemoglobina, hematócrito, plaquetas e série branca.

Para diminuir o nível de estresse causado pela agulha, será coletada uma única amostra de sangue (aproximadamente 8 ml) de cada animal e esta subdividida em frascos de acordo com os procedimentos recomendados para posterior realização das análises bioquímicas e hematológicas. As coletas serão feitas em tubo de ensaio a partir da contenção dos animais em bretes apropriados, com extração de sangue da veia caudal.

Para avaliações fisiológicas serão utilizados os seguintes indicadores:

Limiar nociceptivo térmico: as medidas serão realizadas utilizando o equipamento TTM (Thermal Threshold Measurer), o qual consiste de aplicar um estímulo térmico a pata do animal avaliando a resposta de retirada do animal. Cada teste nociceptivo consistirá de três medidas consecutivas do limiar de temperatura (em °C), em que a resposta de retirada da pata ocorreu, conforme metodologia descrita por PINHEIRO MACHADO FILHO, HURNIK e EWING, 1998.

Limiar nociceptivo mecânico: as medidas serão realizadas utilizando um algômetro eletrônico, o qual consiste na aplicação de força sobre a mão do animal avaliando a

reação de retirada, conforme adaptação de metodologia utilizada em ovinos (STUBSJØEN, VALLE e ZANELLA, 2010).

Variabilidade da frequência cardíaca e frequência cardíaca: as medidas serão realizadas através de cinta polar colocada no animal que acoplada a um relógio registra a frequência cardíaca do animal, bem como a variabilidade entre intervalos R-R; estas medidas serão feitas na sala de ordenha, no momento em que a vaca está sendo ordenhada (metodologia descrita por STUBSJØEN et al., 2009).

Frequência respiratória: será avaliada na sala de ordenha, após a colocação das teteiras, através da contagem visual dos movimentos do flanco do animal em 1 minuto.

As avaliações hematológicas e bioquímicas serão feitas uma única vez dentro de cada período (P1, P2 e P3), por serem consideradas medidas mais invasivas e envolverem coletas de sangue. No P1 será realizada a coleta de sangue no dia anterior ao início do tratamento; no P2 no 2º dia após o início do tratamento e no P3 no 7º dia após o encerramento do tratamento.

Nos períodos P1 e P2 (antes e durante o tratamento, respectivamente) as avaliações comportamentais e fisiológicas serão realizadas diariamente, durante a ordenha, totalizando três (3) medidas no P1 e mais três (3) no P2. Já as medidas produtivas e qualitativas serão realizadas duas vezes em cada um destes dois períodos. No P3 (após o tratamento), medidas fisiológicas, comportamentais, produtivas e qualitativas serão realizadas no 7º e 15º dia após o término do tratamento, bem como no momento da secagem da vaca.

A etapa experimental durará 21 dias, sem incluir a última avaliação que será realizada no momento da secagem das vacas. Os períodos P1, P2 e P3 durarão três (3), três (3) e quinze (15) dias, respectivamente, e os animais de cada tratamento permanecerão juntos no campo. A identificação dos animais de cada tratamento será através de marcação numérica, com tinta atóxica. A ordenha será realizada pelos funcionários da propriedade, sendo que os observadores estarão presentes na sala de ordenha durante a ordenha.

O delineamento utilizado será completamente ao acaso com 10 repetições (animal como unidade experimental) e o modelo matemático descrito pela seguinte equação:

$$Y_{ijkl} = M + T_j + P_j + TP_{ij} + e_{ijkl}, \text{ onde:}$$

$Y_{ijkl}$  = valor observado da variável resposta na unidade experimental;

$M$ = média geral do experimento;

$T_i$ =efeito de tratamento;

$P_j$ =efeito do período;

$TP_{ij}$ =efeito da interação entre período e tratamento;

$e_{ijkl}$ =erro experimental.

Após o término das etapas de levantamento e experimental, os dados serão analisados estatisticamente (SAS, 2001). As variáveis que apresentam distribuição normal serão submetidas à análise de variância e aplicação de testes paramétricos. As variáveis respostas de caráter qualitativo, que assumem valores quantitativos, mas representam uma resposta de natureza categórica serão submetidas à análise não paramétrica.

## **2.4 Resultados e Impactos esperados**

---

Pretende-se validar indicadores de dor para mastite em bovinos leiteiros, comprovando que de acordo com a forma de apresentação desta doença os indicadores se alteram, mas que toda vaca com algum grau de infecção na glândula mamária está submetida a um processo doloroso, com efeitos sobre a produtividade e bem-estar animal. Além disso, acredita-se encontrar um tratamento eficiente para a mastite em rebanhos leiteiros com efeitos benéficos sobre o bem-estar animal, mas, principalmente sobre a recuperação da saúde da glândula mamária o que resultará em efeitos positivos na vida produtiva do animal.

Acredita-se que os resultados gerados serão de grande relevância para o meio científico, inicialmente porque as pesquisas nesta área estão começando e há muito ainda a ser estudado e desvendado. Espera-se que os indicadores de dor validados neste estudo, sejam utilizados por outros pesquisadores e assim venha a contribuir para o crescimento das pesquisas e maior entendimento da relevância de se preocupar com a dor nos sistemas de produção animal.

Além da contribuição para o meio científico espera-se que as informações e conclusões geradas com este estudo atinjam produtores e pessoas ligadas diretamente ao setor de produção leiteira, e que ocorra uma conscientização de que os animais são seres sencientes, e que a mastite além de causar perdas no volume de leite produzido, causa muita dor e desconforto, podendo comprometer toda a vida produtiva do animal caso sua dor não seja tratada eficientemente.

## 2.5 Cronograma do Projeto

PERÍODO	ATIVIDADES A SEREM DESENVOLVIDAS
Janeiro a setembro de 2010	Revisão bibliográfica e elaboração do projeto; Aquisição de equipamentos necessários para a execução das avaliações.
Outubro de 2010 a março de 2011	Execução das etapas de levantamento e experimental do projeto; Análises laboratoriais do projeto.
Abril a julho de 2011	Organização dos dados coletados; Realização do exame de qualificação.
Agosto de 2011 a fevereiro de 2012	Aplicação de análises estatísticas aos dados; Conclusões do projeto; Preparação da tese; Defesa de tese.

## 2.6 Outros Projetos e Financiamentos

**2.6.1. Projeto:** Caracterização da produção de bovinos de corte, na região Sul do Rio Grande do Sul: interação dos animais com seres humanos bem-estar e suas conseqüências nas perdas de carcaça e carne desde a fazenda até o abate.

**2.6.2. Projeto:** Interação homem-vaca leiteira e efeitos na saúde da glândula mamária, no bem-estar animal e nas características produtivas e qualitativas do leite.

**2.6.3. Projeto:** O bem-estar animal na criação orgânica de rebanhos leiteiros.

**2.6.4. Projeto:** Avaliação dos marcadores metabólicos de estresse e suas implicações na qualidade final da carne.

Todos os projetos citados são financiados pela CAPES, PROAP-CAPES e CNPQ.

## 2.7 Aspectos Éticos

O projeto foi submetido a Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

## 2.8 Referências Bibliográficas

- BARNETT, J.L. Measuring pain in animals. **Australian Veterinary Journal**, v. 75, p.878-879, 1997.
- BAREILLE, N.; BEAUDEAU, F.; BILLON, S.; ROBERT, A.; FAVERDIN, P. Effects of health disorders on feed intake and milk production in dairy cows. **Livestock Production Science**, v.83, p.53–62, 2003.
- CULLOR, J.S.; TYLER, J.W.; SMITH, B.P. Distúrbios da glândula mamária. In: SMITH, B.P. Tratado de Medicina Interna dos Grandes Animais. São Paulo, 1994, v.2, p. 1041-1060.
- FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.
- FITZPATRICK, J.L.; YOUNG, F.J.; ECKERSALL, D.; LOGUE, D.N.; KNIGHT, C.J.; NOLAN, A. Recognising and controlling pain and inflammation in mastitis. In: Proceedings of the British Mastitis Conference, Stoneleigh, October 7, p. 36-44, 1998.
- FITZPATRICK, J.L.; SCOTT, M.; NOLAN, A. Assessment of pain and welfare in sheep. **Small Ruminant Research**, v.62, p.55-61, 2006.
- GAYNOR, J.S.; MUIR, W.W. **Manual de controle da dor em medicina veterinária**. Ed. MedVet, 2ª edição, São Paulo, 643p., 2009.
- GRISNEAUX, E.; PIBAROT, P.; DUPUIS, J.; BLAIS, D. Comparison of ketoprofen and carprofen administered prior to orthopedic surgery for control of postoperative pain in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.215, p.1105-1110, 1999.
- HUGONNARD, M.; LEBLOND, A.; KEROACK, S.; CADORE, J.; TRONEY, E. Attitudes and concerns of French veterinarians towards pain and analgesia in dogs and cats. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v.31, p. 154-163, 2004.
- HELLEBREKERS, L.J. **Dor em animais**. Ed. Manole Ltda, 1ª edição, São Paulo, 166p. 2002.
- KENT, J.E.; MOLONY, V.; ROBERTSON, I.S. Changes in plasma cortisol concentration in lambs of three ages after three methods of castration and tail docking. **Research Veterinary Science**, v.55, p.245-251, 1993.
- PINHEIRO MACHADO FILHO, L.C.; HURNIK, J.F.; EWING, K.K. A thermal threshold assay to measure the nociceptive response to morphine sulphate in cattle. **Canadian Journal Veterinary Research**, v.62, p. 218-223, 1998.

- POTTER, L.; MCCARTHY, C.; OLDHAM, J. Algometer reliability in measuring pain pressure threshold over normal spinal muscles to allow quantification of anti-nociceptive treatment effects. **International Journal of Osteopathic Medicine**, v.9, p. 113-119, 2006.
- ROLLIN, B. A ética do controle da dor em animais de companhia. In: HELLEBREKERS, L.J. Dor em animais. Ed. Manole Ltda, 1ª edição. São Paulo. p 17-35, 2002.
- SHORT, C.E. Fundamentals of pain perception in animals. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 59, p. 125-33, 1998.
- SHORT, C.E. The management of animal pain. Where have we been, where are now and where are we going? **The Veterinary Journal**, v.165, p. 101-103, 2003.
- SHPIGEL, N.Y.; CHEN, R.; WINKLER, M.; SARAN, A.; ZIV, G.; LONGO, F. Anti-inflammatory ketoprofen in the treatment of field cases of bovine mastitis. **Research Veterinary Science**, v.56, p.62-68, 1994.
- STUBSJØEN, S.M.; FLO, A.S.; MOE, R.O.; JANCZAK, A.M.; SKJERVE, E.; VALLE, P.S.; ZANELLA, A.J. Exploring non-invasive methods to assess pain in sheep. **Physiology & Behavior**, v. 98, p. 640-648, 2009.
- STUBSJØEN, S.M.; VALLE, P.S.; ZANELLA, A.J. The use of a hand-held algometer as a method to measure mechanical nociceptive thresholds in sheep. **Animal Welfare**, v.19, p.xxx-xxx, 2010.
- STEWART, M.; STAFFORD, K.J.; DOWLING, S.K.; SCHAEFER, A.L.; WEBSTER, J.R. Eye temperature and heart rate variability of calves disbudded with or without local anaesthetic. **Physiology & Behavior**, v.93, p. 789-97, 2008.
- VIÑUELA-FERNÁNDEZ, I.; JONES, E.; WELSH, E.M.; FLEETWOOD-WALKER, S.M. Pain mechanisms and their implication for the management of pain in farm and companion animals. **The Veterinary Journal**, v. 174, p. 227-239, 2007.
- VON BORELL, E.; LANGBEIN, J.; DESPRÉS, G.; HANSEN, S.; LETERRIER, C.; MARCHANT-FORDE, J.; MARCHANT-FORDE RUTH.; MINERO, M.; MOHR, E.; PRUNIER, A.; VALANCE, D.; VEISSER, I. Heart rate variability as a measure of autonomic regulation of cardiac activity for assessing stress and welfare in farm animals- a review. **Physiology & Behavior**, v.92, p.293-316, 2007.
- WELSS, S.J.; OTT, S.L.; HILLBERG SEITZINGER, A. Key health issues for dairy cattle – new and old. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 3029–3035, 1998.

WEARY, D.M.; NIEL, L.; FLOWER, F.C.; FRASER, D. Identifying and preventing pain in animals. **Applied Animal Behaviour Science**, v.100, p.64-76, 2006.

## **3 REVISÃO DE LITERATURA**

### **3.1 Mastite bovina**

#### **3.1.1 Introdução**

A mastite é uma inflamação da glândula mamária caracterizada por apresentar alterações patológicas no tecido glandular e uma série de modificações físico-químicas no leite como aparecimento de coágulos e presença de elevado número de leucócitos (RIBEIRO et al., 2000).

A mastite é considerada a principal doença que afeta os rebanhos leiteiros do mundo e a que proporciona as maiores perdas econômicas na atividade leiteira. Nos EUA, Bramley et al. (1996) estimaram prejuízo anual de 2 bilhões de dólares. Já no Brasil, essas informações são muito inconsistentes, entretanto, Costa et al. (1999), trabalhando com rebanhos leiteiros dos estados de São Paulo e Minas Gerais, estimaram perdas pela doença de US\$ 317,93/vaca/ano e prejuízos de US\$ 20.611,32/propriedade/ano. Segundo Santos e Fonseca (2007) deduz-se que em função da alta prevalência de mastite nos rebanhos brasileiros, possam ocorrer perdas de produção entre 12 e 15%. Considerando a produção de leite no Brasil em 2008, que foi de 27 bilhões de litros (EMBRAPA, 2010), ter-se-ia uma perda de 4,0 bilhões de litros.

Acompanhando os registros de ordem sanitária de um rebanho bovino leiteiro no Sul do Brasil de 2000 a 2009, Cruz et al. (2011) observaram uma prevalência de 27,8% de mastite. Além das perdas decorrentes da redução na produção de leite e alterações nos componentes do leite, ocorre aumento dos custos com tratamentos e descarte precoce de vacas com mastite crônica (SANTOS e FONSECA, 2007).

Além do impacto econômico da mastite, resultante das perdas em produção de leite, alterações na composição e descarte de animais, fatores relacionados à dor e desconforto causado por esta doença devem ser considerados nos sistemas de produção leiteira, buscando assim elevar os níveis de bem-estar na propriedade e conseqüentemente, a produtividade animal.

### **3.1.2 Tipos de mastite**

A mastite pode ser dividida em dois grupos principais, quanto a sua forma de manifestação, a clínica e subclínica.

A incidência de mastite clínica e subclínica foi diagnosticada na região Sul do Rio Grande do Sul por Ribeiro et al. (2003), sendo que foram examinados 12.970 quartos mamários em diversas unidades de produção leiteira, os quais 37,69% apresentaram mastite subclínica e 1,48% mastite clínica.

#### **3.1.2.1 Mastite clínica**

Chama-se mastite clínica os casos da doença em que existem sinais evidentes de manifestação da mesma, tais como edema, aumento de temperatura, endurecimento e dor na glândula mamária e/ou aparecimento de grumos, pus ou qualquer alteração das características do leite, independente da contagem de células somáticas. O quadro de mastite clínica pode ser acompanhado por sintomas sistêmicos, como aumento da temperatura retal, depressão, desidratação, diminuição do consumo de alimento e da produção de leite (SANTOS e FONSECA, 2007).

#### **3.1.2.2 Mastite subclínica**

A mastite subclínica caracteriza-se pela ausência de alterações visíveis no leite ou no úbere, mas apresenta redução da produção de leite, mudanças na composição do leite: aumento da contagem de células somáticas, dos teores de cloreto, sódio e proteínas séricas, e diminuição dos teores de caseína, lactose e gordura do leite. Na forma subclínica não existem sinais evidentes da doença, portanto, não é possível diagnosticá-la sem a utilização de testes auxiliares, tais como: *California Mastitis Test* (CMT), o *Wisconsin Mastitis Test* (WMT), a condutividade elétrica do leite e a contagem de células somáticas (CCS), os quais serão apresentados em subitem abaixo (SANTOS e FONSECA, 2007).

A mastite subclínica apresenta prevalência muito maior do que a clínica, sendo responsável, em média, por 90 a 95% dos casos da doença nos rebanhos leiteiros (SANTOS e FONSECA, 2007).

### 3.1.3 Agentes etiológicos causadores da mastite

A doença é geralmente classificada de acordo com a origem do agente causador. Em função de suas características, os microorganismos causadores da mastite podem ser divididos em: agentes ambientais ou contagiosos. A fonte principal dos agentes contagiosos é o úbere, seja no interior da glândula mamária ou pele dos tetos. Dessa forma, a transmissão ocorre principalmente durante a ordenha dos animais, por meio das teteiras, das mãos do ordenhador e de panos utilizados na limpeza e secagem dos tetos (RADOSTITS et al., 2007; SANTOS e FONSECA, 2007).

A mastite contagiosa manifesta-se principalmente sob a forma subclínica, acarretando os maiores prejuízos, devido à doença na forma subclínica não apresentar sinais evidentes e muitas vezes, passar despercebido pelo produtor.

A mastite ambiental é causada por agentes, cujo principal reservatório é o ambiente em que a vaca vive, principalmente onde há acúmulo de esterco, urina, barro e camas orgânicas. Causada pelos patógenos ambientais como *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *S. uberis*, *S. bovis*, *S. dysgalactiae* é responsável pela alta incidência de casos clínicos, geralmente de curta duração e, freqüentemente, com manifestação aguda. Já a mastite contagiosa tem como principais agentes: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis* e *Corynebacterium bovis*, os quais se caracterizam, de maneira geral, por habitarem o interior da glândula mamária e a superfície da pele dos tetos, elevando a contagem de células somáticas do leite (SANTOS e FONSECA, 2007).

Segundo Philpot e Nickerson (2002), embora mais de 140 espécies microbianas possam estar envolvidas com a mastite, um número relativamente pequeno é responsável pela maioria dos casos da doença.

Os principais patógenos bacterianos responsáveis pela mastite bovina são: *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus dysgalactiae* (QUINN et al., 2005). Ribeiro et al. (2009), relataram que, em um levantamento com 74 vacas com mastite, *Staphylococcus aureus* (25,7%), *Streptococcus spp.* (21,4%), *Corynebacterium bovis* (12,9%),

*Streptococcus agalactiae* (4,3%) e *Staphylococcus spp.* (4,3%) foram os microorganismos mais freqüentemente isolados nos animais.

Avaliando 935 quartos mamários, Oliveira et al. (2011) isolaram em casos de mastite clínica *Staphylococcus coagulase negativa* (25%), *Staphylococcus aureus* (16,7%), *Streptococcus spp.* (8,3%) e *Corynebacterium spp.* (8,3%). Em casos de mastite subclínica foram isolados *Staphylococcus coagulase negativa* (32,3%), *Staphylococcus aureus* (17,7%), *Staphylococcus intermedius* (1,6%), *Streptococcus spp.* (4,8%) e *Corynebacterium spp.* (4,8%).

### **3.1.4 Diagnóstico da mastite**

#### **3.1.4.1 Diagnóstico da mastite clínica**

O diagnóstico da mastite pode ser realizado a partir de testes individuais ou através de testes do leite do tanque, quando a finalidade é verificar o nível da doença no rebanho. Entre os testes individuais para detecção da mastite clínica tem-se:

*Exame físico do úbere:* este exame deve ser feito pela palpação da glândula mamária, buscando alterações físicas como dor, rubor, alteração da consistência do tecido mamário ou presença de nódulos, edema ou inchaço.

*Exame das características físicas do leite:* o método que auxilia na visualização do aspecto do leite é a utilização da caneca de fundo preto nos primeiros jatos antes da ordenha. Este teste além de permitir a detecção de anormalidades no leite, como grumos, pus e sangue, auxilia também no estímulo da descida do leite e diminui a contagem de bactérias no leite após a ordenha uma vez que a maior parte delas está presente nos primeiros jatos (SANTOS e FONSECA, 2007).

#### **3.1.4.2 Diagnóstico da mastite subclínica**

Quando se pretende diagnosticar a mastite subclínica é necessária a utilização de exames complementares baseados no conteúdo celular do leite. A *contagem de células somáticas* (CCS) é um deles e pode ser realizado por método direto com o uso de microscópio ou contadores celulares eletrônicos (SANTOS e FONSECA, 2007).

As células somáticas do leite são formadas basicamente por dois tipos de células: células de descamação do epitélio secretor e leucócitos de origem

sanguínea como macrófagos, linfócitos e neutrófilos. Segundo Santos e Fonseca (2007), o leite de um quarto não infectado apresenta CCS menor que 100.000 cél/ml, enquanto a CCS de um quarto infectado é geralmente superior a 200.000 cél/ml, o que indica a ocorrência de mastite subclínica ou que o quarto está se recuperando da infecção. Deve-se lembrar que não só a mastite causa aumento de células somáticas no leite. Outros fatores como época do ano, raça, estágio de lactação, número de lactações, estresse causado por deficiências no manejo, problemas nutricionais e doenças intercorrentes também podem causar (NORO et al., 2006; LADEIRA, 2007).

Há métodos mais simples que podem ser realizados a campo e que, apesar de sua subjetividade, conseguem estimar o número de células somáticas presentes no leite. Um deles é o *teste do CMT (California Mastitis Test)*, que é um dos mais populares e práticos para diagnóstico da mastite subclínica. O CMT é um teste qualitativo que estima a contagem de células somáticas presentes no leite em função do grau de gelatinização ou viscosidade da mistura de partes iguais de leite e reagente (2 ml), sendo o teste realizado em bandeja apropriada. Os resultados são expressos em 5 escores: negativo, traços, +, ++ ou +++, os quais apresentam boa correlação com a contagem de células somáticas da amostra (SANTOS e FONSECA, 2007).

O teste da condutividade elétrica baseia-se no princípio de que o leite das vacas com mastite apresenta alteração na carga iônica em decorrência de lesão do epitélio secretor e/ou alteração da permeabilidade vascular, aumentando as concentrações de sódio e cloro no leite, reduzindo os níveis de potássio e lactose, gerando assim o aumento na condutividade (SANTOS e FONSECA, 2007).

A coleta e cultura de amostras de leite provenientes de vacas acometidas de mastite é a melhor maneira para se determinar quais microorganismos estão causando a doença em determinado animal ou no rebanho. Desta forma, o isolamento microbiológico do microorganismo patogênico em amostra de leite é considerado o método diagnóstico padrão para a mastite, sendo útil a identificação do agente causador da mastite para recomendação de tratamento ou descarte. Os resultados de cultura microbiológica de leite podem ser apresentados como: ausência de crescimento microbiano, crescimento de um agente isoladamente e crescimento de mais de um tipo de agente microbiano (SANTOS e FONSECA, 2007).

Outros métodos de diagnóstico da mastite incluem: exames de sangue, ultrassonografia da glândula mamária e biópsia do tecido mamário (RADOSTITS et al., 2007).

### **3.1.5 Fatores de predisposição à mastite**

O desencadeamento da mastite está vinculado à complexa tríade: animal (hospedeiro), agente etiológico e meio ambiente, fazendo desta uma enfermidade multifatorial. Fatores de manejo, nutrição, higiene e condições ambientais, aliados às características genéticas, influenciam a capacidade do hospedeiro em responder as agressões. Entre os fatores ligados ao animal temos a resistência natural, a qual varia de indivíduo para indivíduo, o estágio de lactação em que o animal encontra-se (parto, lactogênese e período seco são fases que influenciam na susceptibilidade a mastite), genética (vacas holandês devido à alta capacidade produtiva podem ter maior ocorrência de infecções intramamárias) e idade (segundo Ladeira, 1998, fêmeas mais velhas são mais suscetíveis a doença) (PRESTES, FILAPPI e CECIM, 2002). Os fatores ligados ao agente causador da mastite podem influenciar na incidência e gravidade da doença devido à espécie de microorganismo causador (SANTOS e FONSECA, 2007).

Entre os fatores ligados ao meio ambiente temos a ordenha em si, a qual pode ser disseminadora dos microorganismos entre os animais devido a falta de higiene, má regulagem dos equipamentos, não realização do manejo de ordenha correto e até o próprio clima em si (PELEGRINO, MELLO e AMARAL, 2008). Além das causas apontadas, a terapia da vaca seca não realizada nas propriedades leiteiras, pode resultar em casos crônicos de mastite (SANTOS e FONSECA, 2007).

Segundo Coentrão et al. (2008), os principais fatores de risco para ocorrência de mastite subclínica em vacas leiteiras são as características dos animais, o manejo inadequado, a inexistência de treinamento dos ordenhadores, a não utilização de serviços laboratoriais para identificação de patógenos e o uso de equipamentos de ordenha sem manutenção periódica.

### **3.1.6 Controle e tratamento da mastite**

As pesquisas atuais têm sido direcionadas ao controle da doença, buscando tratamentos de acordo com o agente causador da doença, bem como soluções alternativas (homeopatia) para controlar a doença, pois as causas da doença já são conhecidas.

A prevenção é a chave para o controle da mastite. Um adequado manejo de ordenha (higiene, correta regulação dos equipamentos e manejo tranqüilo) pode diminuir o número de animais acometidos por mastite clínica e subclínica, reduzir as taxas de novas infecções, melhorar a contagem de células somáticas do rebanho e a qualidade do leite produzido (RUPP, BEAUDEAU e BOICHARD, 2000).

Dentro de um programa de controle de mastite deve-se levar em consideração os seguintes pontos: imersão dos tetos pré e pós-ordenha em solução desinfetante; descarte de animais com mastite crônica; tratamento adequado e imediato de todos os casos clínicos; adoção de terapia da vaca seca para todos os animais do rebanho e correta manutenção do equipamento de ordenha (RADOSTITS, BLOOD e GAY, 2002).

O tratamento das mastites é uma das medidas preconizadas para o seu controle, além de prevenir a morte dos animais, especialmente nos casos agudos, septicêmicos e toxêmicos. Visa ainda o retorno à composição e produção normal do leite, além de eliminar fontes de infecção para as demais vacas sadias (CULLOR, 1993).

O êxito no tratamento das mastites clínicas está diretamente relacionado ao seu período de evolução, sendo neste caso extremamente importante o estabelecimento de diagnóstico precoce, o que é possível com a realização do exame da caneca de fundo preto previamente a cada ordenha. Fator ainda importante é a sensibilidade do microorganismo envolvido frente ao princípio ativo utilizado.

O tratamento adequado das mastites é uma das formas mais práticas e eficientes de controle, por eliminar um elo importante da cadeia epidemiológica desta enfermidade. Embora haja preocupação com o custo /benefício, sabe-se que os custos com tratamento sempre redundam em lucros por aumentar a produção leiteira (BLOWEY, 1986). Neste sentido, Domingues (1993) demonstrou que o diagnóstico precoce e o tratamento adequado da mastite bovina subclínica podem

restabelecer a produção de leite do quarto mamário na mesma lactação, com aumento significativo da produção dos tetos tratados.

Várias são as formulações de antimicrobianos disponíveis no mercado para tratamento da mastite bovina (WATANABE, 1999), podendo ser administrados por via parenteral, intramamária ou intramuscular. A via intramamária é a mais utilizada e tal indicação deve-se ao fato de que muitas vezes os animais apresentam somente um dos quartos mamários acometidos e desta forma o leite secretado pelos quartos sadios pode ser utilizado para consumo, pois não apresenta resíduos de antibióticos (WATANABE, 1999).

A estratégia de tratamento depende do tipo de mastite, se clínica ou subclínica, da identificação dos agentes envolvidos, da severidade da resposta inflamatória, da duração da infecção, da quantidade de quartos afetados, do estágio de lactação, da idade do animal e da presença ou não de prenhez (RADOSTITS et al., 2007). Em vacas lactantes, a mastite clínica sem alterações visíveis da glândula mamária pode não requerer tratamento. Por outro lado, a mastite clínica com alterações da glândula ou sinais sistêmicos deve ser tratada com antimicrobianos por via intramamária e, em alguns casos, por via parenteral. Além disso, pode ser necessário terapia com antiinflamatórios não esteróides em casos de mastite aguda ou hiperaguda (SOUZA, 2011).

Os antibióticos como a gentamicina, as tetraciclinas e os macrolídeos são citados por Quinn et al. (2005) como comumente usados contra patógenos causadores de mastite bovina.

Segundo Zafalon et al. (2007), o tratamento da mastite subclínica não é viável economicamente, pois em estudo avaliando o custo benefício da antibioticoterapia no tratamento desta enfermidade causada por *Staphylococcus aureus*, os gastos com medicamento, descarte do leite, antibiograma e mão-de-obra não compensaram. A maioria dos autores concorda que o tratamento com antibioticoterapia da mastite clínica é indispensável, entretanto, com relação à mastite subclínica ainda há controvérsias quanto ao uso ou não de antibióticos.

O uso de estratégias que aumentem a resistência natural da vaca contra infecções é atualmente, muito estudado. A resposta imune específica é aquela que reconhece um patógeno específico e através de anticorpos e da ação de células do sistema imune, como linfócitos e macrófagos, atuam de forma coordenada na tentativa de eliminar o agente causador da mastite. A vacinação é uma das maneiras

mais eficientes de aumentar a capacidade de resposta imune da vaca contra um agente patogênico. Em estudos de Giraud et al. (1997) sobre o uso de vacina contra mastite bovina baseada em células encapsuladas de *Staphylococcus aureus* foram encontradas menores incidências de mastites em animais que receberam a vacina. Entretanto, segundo Ruegg (2001), na maioria dos rebanhos, a estratégia mais eficaz de controle é a prevenção de novas infecções através da adoção de boas práticas de manejo.

### **3.1.7 Alterações no leite causadas pela mastite**

Além da redução da produção leiteira causada pela mastite, alto custo dos tratamentos de casos de mastite clínica, custos do descarte e morte prematura de alguns animais, os prejuízos por redução na qualidade e rendimento do leite merecem destaque.

A mastite determina uma série de alterações tanto na composição como nas características físico-químicas do leite produzido por uma glândula mamária infectada. Dentre os componentes do leite, as proteínas são os que sofrem os maiores efeitos, ainda que a porcentagem de proteína total do leite praticamente não varie. No entanto, há decréscimo significativo de caseína total e aumento das proteínas séricas, incluindo elevação nas imunoglobulinas. O teor de gordura do leite sofre decréscimo, em torno de 10%, em animais com mastite (SANTOS e FONSECA, 2007).

Com relação à lactose, ocorre decréscimo de aproximadamente 10% no leite mastítico em relação ao leite normal. Devido à lactose desempenhar papel fundamental no equilíbrio osmótico do leite em relação ao sangue, a consequência direta do decréscimo de lactose é o mecanismo de compensação por meio do aumento da passagem de íons sódio (Na<sup>+</sup>) e cloreto (Cl<sup>-</sup>), resultando em aparecimento de sabor salgado no leite (SANTOS e FONSECA, 2007).

Em estudo para determinar a variação na composição do leite de acordo com CCS encontrou-se que, conforme aumenta a contagem de células somáticas do leite, ocorre diminuição da lactose e aumento dos teores de gordura e proteína bruta (Marques, Balbinotti e Fischer, 2002).

Com relação às características físico-químicas do leite de animais com mastite, ocorre elevação do pH, aumento da condutividade elétrica do leite em

função do aumento de íons, diminuição da densidade e aumento do ponto de congelamento (SANTOS e FONSECA, 2007).

As principais alterações nos componentes do leite de vacas com mastite subclínica em comparação com o leite de vacas normais encontram-se na tab.1.

Tabela 1 - Alterações na composição do leite de vacas com mastite subclínica

Componente (%)	Leite normal	Leite mastítico
Gordura	3,5	3,2
Lactose	4,9	4,4
Proteína total	3,61	3,56
Caseína total	2,8	2,3
Proteínas séricas	0,8	1,3
Albumina sérica	0,02	0,07
Lactoferrina	0,02	0,1
Imunoglobulinas	0,1	0,6
Sódio	0,057	0,105
Cloreto	0,091	0,147
Potássio	0,173	0,157
Cálcio	0,12	0,04

Fonte: Santos e Fonseca, 2007.

Os valores de CCS afetam os caracteres organolépticos e o tempo de vida de prateleira dos derivados lácteos, causando enormes prejuízos à indústria de laticínios. Além disso, os prêmios dos programas de pagamento do leite por qualidade podem variar de 2 a 10%, do preço recebido pelo leite, o que pode justificar economicamente a adoção de medidas de controle da mastite (SANTOS e FONSECA, 2007).

## 3.2 Dor

### 3.2.1 Introdução

No passado, os animais eram considerados inferiores ao homem, em termos de evolução ou de desenvolvimento, e, por consequência, acreditava-se que eles não possuíam qualquer sensação de dor, da forma como o homem a conhecia (HELLEBREKERS, 2002). Atualmente tem-se um conhecimento que nos permite

compreender melhor a fisiologia da dor em animais e aceitar que de fato estes podem sentir dor.

A International Association for the Study of Pain's (IASP) definiu a dor como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada com dano tecidual atual ou potencial, ou descrita em termos de tal dano (IASP, 1979). O estudo da dor envolve todas as ciências biológicas básicas, especialmente a anatomia, a fisiologia, a farmacologia e a patologia.

Nos últimos anos, tem aumentado a atenção para os problemas de dor em animais, seu reconhecimento, alívio e sua prevenção subsequente, devido à preocupação crescente da sociedade com as questões de bem-estar animal.

É consensual entre os pesquisadores que condições de enfermidades causam dor, apesar de ainda pouco se conhecer sobre o processo da dor em casos de inflamação da glândula mamária bovina. A importância de se preocupar com a condição de dor em vacas leiteiras abrange aspectos relacionados ao bem-estar e a produtividade animal, pois é evidente que a dor inflamatória diminui o grau de bem-estar. Além disso, uma vaca submetida a condição de infecção na glândula mamária e dor pode apresentar efeitos deletérios não só em produção de leite, como apresentado anteriormente, mas também na estrutura alveolar da glândula, acarretando em problemas produtivos e sanitários para as próximas lactações.

### **3.2.2 Mecanismos da dor em mamíferos**

Os animais em geral dependem da sua própria capacidade para responder aos desafios provenientes do ambiente e de outros animais. A maneira disponível para receber e transmitir essas informações ao sistema nervoso central é através de órgãos sensoriais distribuídos por todo o corpo (neurônios), que têm propriedades especializadas que lhes permitem receber informações, processá-las e transmiti-las a outras células. Os estímulos como pressão e temperatura são traduzidos em impulsos nervosos e transmitidos através de uma fibra nervosa correspondente (neurônios aferentes) para o sistema nervoso central para então serem processados (STILWELL, 2009).

#### **3.2.2.1 Nocicepção**

Embora muitos autores afirmem que a nocicepção não deve ser confundida com a dor, que é uma experiência consciente envolvendo aspectos emocionais,

outros dizem que a nocicepção é parte básica do mecanismo da dor, chamada por alguns como a via da dor.

A nocicepção é o reconhecimento dos estímulos nocivos ou dolorosos feito inicialmente pelos nociceptores (receptores sensoriais de dor) e transmitido até o sistema nervoso central, chegando então ao cérebro onde esses estímulos são interpretados (MUIR III, 2009).

Os nociceptores são terminações livre não-mielinizadas nos neurônios sensoriais, que sinalizam lesão tecidual iminente ou em andamento. Os receptores de dor são seletivos quanto aos tipos de estímulo nocivo ou “doloroso” aos quais respondem, sendo classificados em mecânicos, térmicos e químicos. Além disso, também são classificados de acordo com o tipo de fibra aferente (em direção ao sistema nervoso central) a eles associada, podendo ser fibra A delta e/ou C. Os nociceptores mecânicos utilizam fibras A delta mielinizadas de pequeno diâmetro e limiar alto, os quais respondem a estímulos como beliscões, apertões e extremos de pressão. Os nociceptores associados a fibras C não-mielinizadas tem pequeno diâmetro, condução lenta e são considerados polimodais pois respondem a estímulos nocivos mecânicos, térmicos ou químicos. Diz-se que as fibras A delta compõem a dor rápida, pois a transmissão do estímulo é mais rápido devido a característica da fibra (mielinizada), enquanto que as fibras C são responsáveis pela dor lenta devido a característica diferente deste tipo de fibra (GAYNOR e MUIR III, 2009).

Os nociceptores A delta podem ser nociceptivos ou não-nociceptivos e são compostos de mecanorreceptores e receptores mecanotérmicos de baixo limiar e de alto limiar. Estes últimos são denominados receptores de calor A delta. Os nociceptores A delta de alto limiar respondem somente à estimulação capaz de lesionar tecidos ou que representem uma ameaça de lesão a estes. Muitos dos nociceptores A delta respondem somente a estímulos específicos, enquanto outros são polimodais e respondem à estimulação mecânica, química e térmica (MUIR III, 2009).

Já os nociceptores das fibras C são de alto limiar e polimodais, e encontram-se em grande quantidade na pele, musculatura esquelética e articulações. A ativação destas fibras é responsável pela “segunda dor” e ocorre após o insulto inicial. Existem também as fibras A delta e C que contêm nociceptores silenciosos ou

dormentes que podem ser ativados por eventos que causam lesão tecidual (MUIR III, 2009).

Na Fig.1 observa-se a trajetória de determinado estímulo nocivo sendo transduzido (transdução) pelos nociceptores em potencial de ação o qual é transmitido (transmissão) à medula espinhal, onde é modulado (modulação) antes de ser retransmitido (projeção) ao cérebro para o processamento final e sensibilização (percepção). A partir daí o cérebro envia “resposta” pelas vias eferentes.

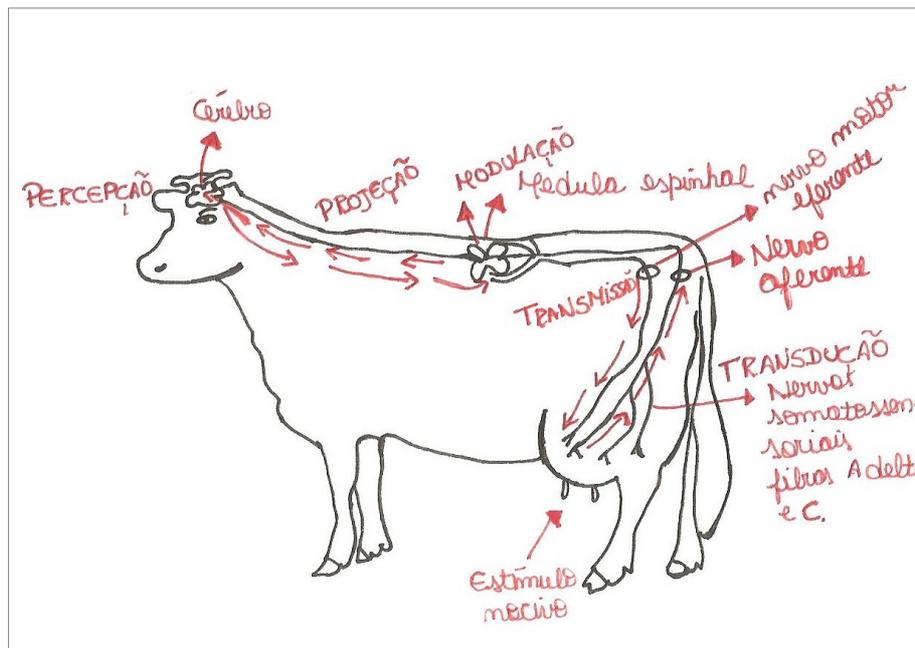


Figura 1 - Trajetória de um estímulo nocivo demonstrando as vias envolvidas na sensação dolorosa.

Inicialmente, na fase de transdução, a detecção do estímulo nocivo é realizada por terminações nervosas livres (nociceptores) que transformam estímulos em potenciais de ação. O estímulo mínimo necessário para induzir a formação de um potencial de ação transmissível a partir de um receptor sensorial periférico é considerado o seu limiar. Uma vez que o limiar de um receptor é atingido, estímulos mais fortes induzem a formação de mais potenciais de ação, e quanto mais longa a duração dos estímulos, mais longa a série de potenciais de ação produzidos. Logo em seguida, os potenciais de ação ou impulsos elétricos são transmitidos (transmissão) para a medula espinhal por nervos periféricos. Os nervos periféricos contêm fibras nervosas aferentes (sensoriais) e eferentes (motoras), as quais formam à raiz dorsal próxima a medula espinhal e a raiz ventral, respectivamente.

Chegando na medula espinhal os impulsos nervosos periféricos sensoriais são amplificados ou suprimidos (modulação). A medula espinhal é dividida em substância branca (axônios ou fibras nervosas) e substância cinzenta (células nervosas), sendo esta última dividida em três regiões distintas: corno dorsal, a zona intermediária e o corno ventral. Em seguida, as informações nociceptivas são levadas ao cérebro por um feixe de neurônios que se originam nas lâminas do corno dorsal (projeção). E por último ocorre a integração, o processamento e o reconhecimento das informações sensoriais (percepção), as quais ocorrem em múltiplas áreas específicas do cérebro e serve para produzir uma resposta (MUIR III, 2009).

### **3.2.2.2 Classificações da dor**

Quando um estímulo nocivo é induzido este causa uma “primeira dor”, também denominada dor fisiológica ou dor nociceptiva, que serve para proteger o organismo pela advertência do contato com estímulos teciduais nocivos (STILWELL, 2009). Este é o tipo de dor que o animal sente quando é beliscado, cutucado ou palpado de maneira agressiva, ou quando, da realização do teste de limiar térmico de dor. Todos os outros tipos de dor podem ser considerados patológicos ou clínicos, sendo que a maior parte surge de lesões teciduais (inflamatórias) ou de nervos (neuropáticas) (GAYNOR e MUIR III, 2009).

A “segunda dor” ou “dor profunda” é interpretada pelo sistema nervoso central como uma sensação difusa, dolorida ou latejante e algumas vezes chamada dor clínica, crônica ou patológica (GEORGE, 2003). A dor patológica ocorre na presença ou ausência de um estímulo ou em resposta a estímulos inócuos (alodinia), produzindo frequentemente uma resposta exagerada (hiperalgesia) e prolongada (hiperpatia). A forma aguda da dor patológica, assim como ocorre na dor fisiológica, funciona como uma proteção, levando a não utilizar a região afetada, ao descanso e à recuperação, minimizando o agravamento da injúria e promovendo a reparação. A dor prolongada (crônica) tem um impacto significativo na qualidade de vida do animal, excedendo em muito qualquer função protetora, rompendo a homeostasia e causando alterações fisiopatológicas e um sofrimento considerável (GAYNOR e MUIR III, 2009).

A dor clínica, produzida pela injúria de tecidos periféricos ou danos aos nervos, é caracterizada como dor inflamatória ou neuropática. A dor inflamatória

pode ser somática (pele, articulações, músculos ou periósteo) ou visceral (vísceras torácicas e abdominais). A dor neuropática ocorre como um resultado direto do dano de nervos periféricos ou da medula espinhal, sendo descrita como ardente, penetrante e intermitente, além de ser, frequentemente, irresponsiva ao tratamento (GAYNOR e MUIR III, 2009).

A dor é frequentemente classificada como aguda ou crônica. Dor aguda é de curta duração e tende a desaparecer com a cura, estando geralmente associada com procedimentos cirúrgicos. Já a dor crônica é de longa duração, podendo durar mais tempo do que o processo de cicatrização normal (FIERHELLER, 2009).

A dor crônica resultante de inflamação será tratada em detalhes por ser a mais comum e problemática em bovinos, como em casos de mastite. O manejo da dor crônica é complexo, mas talvez mais importante porque afeta o bem-estar dos animais em maior intensidade e de maneira prolongada (STILWELL, 2009).

Depois do processo infeccioso estabelecido ocorre uma reação com liberação dos mediadores químicos da dor e da inflamação, referidos coletivamente como a “sopa inflamatória” (JULIUS e BASBAUM, 2001). Alguns dos principais componentes da “sopa inflamatória” incluem a histamina, serotonina, bradicininas, leucotrienos, prostaglandinas (E2), interleucinas (IL-1, IL-6) peptídeos neutrófilos quimiotáticos, fator de crescimento do nervo e neuropeptídeos, incluindo a substância P (GAYNOR e MUIR III, 2009). A natureza ácida da “sopa inflamatória” é importante na sensibilização do nervo. Cada um desses componentes sensibiliza (diminui o limiar) ou excita os nociceptores pela interação com receptores da superfície celular expressadas por estes neurônios. Além disso, outros tipos de nociceptores, chamados silenciosos ou dormentes tornam-se mais sensíveis quando sensibilizados pela sopa inflamatória. Este nociceptor hiper excitado leva a uma condição denominada de sensibilização primária ou hiperalgesia primária, na qual qualquer estímulo é sentido como dor, mesmo quando o animal é simplesmente tocado. Vasodilatação local, extravasamento de plasma e extensão dos resultados da sopa inflamatória em uma amplificação adicional da resposta inflamatória pela redução do limiar de outras terminações nervosas, mesmo aquelas consideradas inócuas, dando lugar à dor sem qualquer dano aos tecidos é denominado de estado de hiperalgesia periférica secundária (ANDERSON e MUIR, 2005).

Segundo Ji e Woolf (2001) a estimulação nociva repetida das fibras C não-mielinizadas pode resultar em prolongada descarga no corno dorsal devido ao

aumento da liberação de glutamato, substância P e outros agentes neurotróficos. A ativação de nociceptores periféricos também resulta em plasticidade neuronal da medula espinhal, que modifica o desempenho posterior da via nociceptiva através do exagero ou prolongamento da resposta a estímulos nocivos (hiperalgesia) ou permitindo respostas a estímulos inócuos (alodinia). Este fenômeno é denominado “wind-up” ou sensibilização central e pode ser resumido como um aumento contínuo na intensidade das respostas evocadas pelas fibras C dos neurônios do corno dorsal, resultante da estimulação repetida das fibras C (HELLYER, ROBERTSON e FAILS, 2007).

Baseado nisso, um estímulo nocivo prolongado resulta em uma maior sensibilização a estímulos subseqüentes e, desta forma, pode-se explicar o que acontece com vacas acometidas de claudicação crônica que leva a hiperalgesia, perda de peso, redução da produção e aumento da susceptibilidade a outras doenças. O estado de hipersensibilidade pode prolongar a dor mesmo quando a lesão primária é tratada. Além disso, os animais hipersensíveis não respondem de maneira satisfatória ao tratamento analgésico, especialmente quando tratados após o início do estímulo doloroso (CODERRE, VACCARINO e MELZACK, 1990; LEY, WATERMAN e LIVINGSTON, 1995).

Os mecanismos descritos que levam à sensibilização primária, secundária e central, alodinia e hiperalgesia são consideradas características comuns resultantes da dor inflamatória (ANDERSON e MUIR, 2005; GAYNOR e MUIR III, 2009), a qual ocorre em situações de mastite.

Segundo Stilwell (2009), o dano tecidual e a subseqüente inflamação aumentam: a sensibilidade, reduzindo o limiar de dor e ativando as fibras não-nociceptivas e silenciosas; a área, a dor é estendida para outros tecidos devido à hipersensibilidade periférica secundária e hiperalgesia central; a duração, às vezes a dor prolonga-se além da cura.

### **3.2.3 Avaliação de dor em bovinos**

A complexidade da dor ultrapassa a fronteira física e é influenciada pelo meio ambiente e pela resposta psíquica do animal, sendo desta forma considerada um fenômeno biopsico-social, que envolve os aspectos biológico, psíquico e social do indivíduo (LUNA, 2008).

Os animais de produção são os que mais sofrem dor, tanto pelo fato de que raramente recebem tratamento, como pelo fato de serem submetidos a diversos procedimentos com a finalidade de incrementar a capacidade produtiva ou corrigir problemas. Dentre as causas principais de dor em animais de produção pode-se citar a marcação a quente ou frio, descorna, mastite e laminite em ruminantes (LUNA, 2008). No entanto, o ponto crítico é como avaliar a dor em animais.

A avaliação de dor em bovinos pode ser ainda mais difícil, pois estes são considerados espécies presa e menos prováveis de demonstrarem sinais de dor quando comparado com outros animais ou pessoas. Isto é um instinto natural de sobrevivência das espécies presas, onde a não expressão de sinais de dor ou doença evita a aproximação de predadores (FIERHELLER, 2009).

Segundo Weary et al. (2006), pesquisas de avaliação da dor em animais tendem a usar uma das três abordagens: medidas gerais de funcionamento do organismo como a alimentação, ingestão de água ou ganho de peso; medidas de respostas fisiológicas, tais como as concentrações de cortisol plasmático e medidas de comportamento tais como vocalizações.

### **3.2.3.1 Medidas comportamentais de dor**

Três classes principais de comportamentos podem ser úteis na avaliação da dor. A mais óbvia destas são os comportamentos específicos da dor, como contorções, número crescente de vocalizações e comportamentos vigorosos de fuga. Por exemplo, terneiros respondem a marcação com ferro quente, através da realização de comportamentos como tropeçar para frente com membros dianteiros e traseiros, mas respondem à dor pós-operatória com comportamentos mais sutis e diretos, tais como sacudindo a orelha e balançando a cabeça (GRØNDAHL-NIELSEN et al., 1999).

A segunda classe de resposta à dor é a diminuição na frequência ou magnitude de certos comportamentos. Por exemplo, a apatia geral tem sido considerada como um sinal clássico de dor em animais e estudos da dor, muitas vezes, incluem medidas de redução da atividade tais como, menor ingestão de alimentos ou reatividade (WEARY et al., 2006).

Uma terceira classe de medidas de dor são as de escolha ou preferência. Através de exposições repetidas às alternativas, os animais podem aprender o que esperar, bem como evitar uma situação dolorosa. Rushen (1986) utilizou essa

abordagem para avaliar como ovinos respondem a imobilização elétrica, procedimento utilizado para imobilizar temporariamente os animais durante a tosquia. Neste estudo, Rushen realizou ensaios repetidos de imobilização elétrica, sendo que ovelhas submetidas à imobilização elétrica por várias vezes tornaram-se mais difíceis de serem manejadas do que aquelas que desconheciam o procedimento, indicando que este procedimento é aversivo e, se possível, o animal evitará.

O estudo da escolha a partir da perspectiva de avaliação da dor é indiscutivelmente a forma mais convincente de que os animais podem ser treinados para se automedicar com analgésicos (WEARY et al., 2006). Danbury et al. (2000) treinando frangos de corte mancos para discriminarem entre duas rações, uma contendo analgésico e outra não, percebeu que as aves doentes escolhiam consumir mais do alimento que continha analgésico, comprovando o comportamento de escolha.

Para avaliar as condições em que bovinos de leite encontram-se é necessário conhecer as características comportamentais normais da espécie, pois assim qualquer alteração no comportamento normal poderá ser identificada e tomada as providências para descobrir as causas e solucionar o problema. Entre os comportamentos indicativos da condição de dor em bovinos de leite pode-se citar: comportamento ingestivo alterado; comportamento social alterado e mudanças do comportamento de ordenha. Bovinos com elevado grau de dor reduzem o consumo de alimentos, com redução também nas atividades de ruminção e se o animal apresentar febre, como ocorre em casos de mastite clínica grave, poderá ocorrer aumento do consumo de água. Segundo Siivonen et al. (2011), vacas com mastite clínica passam menos tempo deitadas e menos tempo ruminando do que animais saudáveis, provavelmente devido ao desconforto de deitar-se pressionando a glândula dolorida.

Quando se observa bovinos em condições extensivas de criação e percebe-se um animal afastado dos demais, inquieto ou apático deve-se redobrar a atenção, pois há algum problema com este animal. Um exemplo disso é o parto de bovinos, situação em que as vacas se afastam do rebanho para parir. Isso ocorre, provavelmente, devido à dor (observação pessoal).

Em bovinos de leite, principalmente vacas em lactação, o manejo diário na ordenha facilita a identificação dos comportamentos anormais, pois a ordenha é o

momento ideal para observação de cada animal individualmente. Vacas com laminite apresentam escore de andadura anormal com relutância em colocar o peso sobre a pata doente, redução na flexão dos joelhos e caminham com o dorso arqueado, indicando assim desconforto e dor (RUSHEN et al., 2008).

Em casos de mastite clínica, comportamentos como elevada movimentação dos membros posteriores durante a ordenha podem indicar desconforto e dor durante a extração do leite da glândula mamária. Ainda na ordenha, pode-se observar a posição da cabeça, animais em desconforto ou dor mantém a cabeça baixa e com “olhar triste” (observação pessoal).

Cabe destacar que os indicadores comportamentais para dor devem ser utilizados com cuidado, pois alguns deles não são específicos e pode-se confundirlos com as respostas de estresse.

### **3.2.3.2 Medidas fisiológicas de dor**

Ao longo da história utiliza-se as respostas fisiológicas como forma de avaliar a dor e o sofrimento (para revisão ver GREGORY, 2004). Essas medidas incluem respostas do sistema simpático - adrenomolecular, tais como alterações do ritmo cardíaco devido à liberação de norepinefrina e respostas do sistema hipotálamo-pituitária-adrenal, como as concentrações de cortisol, hormônio adrenocorticotrófico e fator liberador da corticotropina. Estas medidas podem ser particularmente úteis em espécies consideradas presas como bovinos que são considerados impassíveis e improváveis para demonstrar respostas comportamentais à dor até que as lesões estejam avançadas (WEARY et al., 2006). Além disso, em condições extensivas de criação a contenção dos animais e amostragem de tecidos pode ser estressante e confundir os resultados fisiológicos.

Respostas fisiológicas de dor são reações do organismo em resposta a um estímulo doloroso. Quando o cérebro percebe o estímulo doloroso, o sistema nervoso simpático é ativado, produzindo a adrenalina. A adrenalina causa aumento na frequência cardíaca e na pressão sanguínea, além de aumentar os níveis do hormônio do estresse, o cortisol. Estas variáveis, frequência cardíaca, pressão sanguínea e cortisol, podem ser utilizadas como indicadores objetivos de dor em animais de produção (FIERHELLER, 2009). A medida de hormônios do estresse como o cortisol tem sido útil como indicadores de dor, embora apresente algumas

limitações como a falta de especificidade para a dor e a ocorrência de um efeito teto (MOLONY e KENT, 1997).

A substância P tem sido um bom indicador de dor em terneiros castrados quando comparado com terneiros controle, sugerindo que este neurotransmissor pode ser um indicador específico de dor em bovinos (FIERHELLER, 2009).

Kemp et al. (2008), avaliando alguns parâmetros fisiológicos como marcadores objetivos da gravidade de mastite clínica em bovinos de leite, encontraram temperatura retal, frequência cardíaca e respiratória mais elevada em vacas com mastite clínica moderada do que em vacas com mastite clínica leve ou grupo controle, demonstrando que estes parâmetros fisiológicos podem ser úteis para indicar condições de dor inflamatória.

### **3.2.3.3 Proteínas de fase aguda como indicadores de dor**

A reação em um processo de dor inflamatória é acompanhada por uma resposta sistêmica conhecida por resposta de fase aguda. Esta resposta é caracterizada por febre, produção de diversos hormônios e de proteínas de fase aguda. As citocinas como interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e fator  $\alpha$  de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), são produzidas no local da inflamação e desempenham papel crucial na resposta de fase aguda, facilitando a migração de leucócitos e induzindo a produção de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos (BILATE, 2007).

A resposta de fase aguda altera a síntese e liberação de muitas proteínas sintetizadas pelo fígado, algumas diminuem e outras aumentam. Essas proteínas que diminuem, tais como a albumina e a transferrina, são denominadas proteínas de fase aguda negativas (HAYES, 1994). Já as proteínas que aumentam em mais de 25% sua concentração são denominadas proteínas de fase aguda positivas ou, simplesmente, proteínas de fase aguda (KUSHNER, 1982).

As proteínas de fase aguda produzidas podem ser de dois tipos. As do tipo 2, na maioria das espécies, incluem o fibrinogênio e a haptoglobina (Hp) e as do tipo 1 incluem a  $\alpha$ 1 glicoproteína ácida ( $\alpha$ 1-Ag), amilóide sérica A (SAA) e proteína C-reativa (PCR) (BAUMANN e GAULDIE, 1994).

Em bovinos leiteiros, a haptoglobina e a amilóide sérica A são as principais proteínas de fase aguda (MURATA, SHIMADA e YOSHIOKA, 2004; HUMBLET et al., 2006) com utilidade no diagnóstico de processos inflamatórios com alta sensibilidade (ECKERSALL et al., 2006). O monitoramento destas proteínas tem

sido útil para identificar situações subclínicas em vacas leiteiras, especialmente em situações de afecções mamárias (PETERSEN, NIELSEN e HEEGAARD, 2004).

Colla et al. (2011), relacionando a concentração plasmática de haptoglobina e fibrinogênio com a contagem de células somáticas e mastite em rebanhos leiteiros no Rio Grande do Sul, encontraram maior concentração destas proteínas no grupo de vacas com mastite clínica do que nos demais grupos. No entanto, a haptoglobina não diferiu entre vacas sadias e vacas com mastite subclínica, indicando que esta proteína não é útil para identificar casos leves da mastite.

Casos de mastite moderada apresentam maiores níveis de haptoglobina do que animais com casos leves da inflamação e animais sadios, indicando que esta proteína tem potencial para ser utilizada como marcador de alerta precoce de mastite (FITZPATRICK et al., 1998).

Horadagoda et al.(1999), avaliando as concentrações de amilóide sérica A e haptoglobina como possíveis fatores de distinção entre casos agudos e crônicos de inflamação em bovinos, encontraram que a amilóide sérica A tem alta sensibilidade em discriminar casos agudos de casos crônicos, e a haptoglobina tem alta especificidade clínica. Segundo Berry, Hillerton e Torgerson (2005), a amilóide A em leite bovino pode ser um marcador mais sensível do que a contagem de células somáticas e menos influenciada por outros fatores fisiológicos.

Cabe salientar que as proteínas de fase aguda têm um padrão de resposta frente à lesão tecidual, conforme demonstrado na Fig.2.

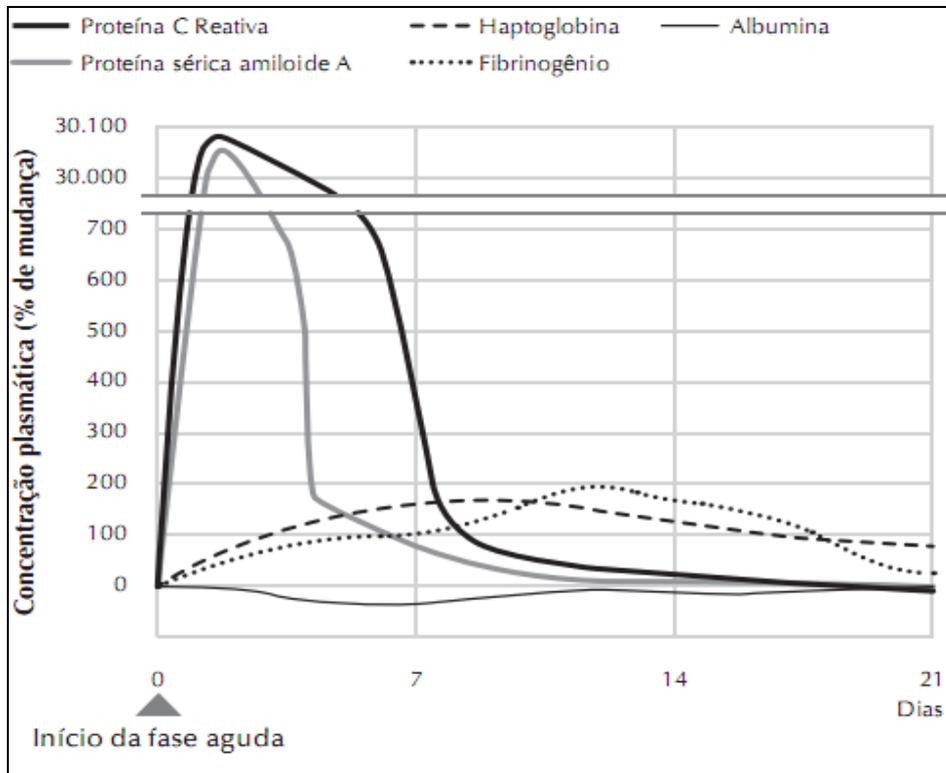


Figura 2 - Padrão de resposta de biomarcadores inflamatórios frente à lesão tecidual (adaptado de Neto e Carvalho, 2009).

#### 3.2.3.4 Limiar nociceptivo como indicador de dor

A avaliação do limiar de dor tem sido usada como um marcador indireto de dor em várias espécies, incluindo ovinos e bovinos, pois, mudanças no limiar são associadas com doença inflamatória dolorosa (NOLAN et al., 1987; CHAMBERS, LIVINGSTON e WATERMAN, 1990; FITZPATRICK et al., 1998).

O limiar de dor é um método que avalia objetivamente a dor e o bem-estar em animais de produção (FITZPATRICK et al., 2006), sendo caracterizado como o estímulo mínimo necessário para que o animal o perceba como nocivo e responda a ele (ARENDRT-NIELSEN e CHEN, 2003). As respostas nociceptivas, independentemente do dispositivo utilizado, consistem na mensuração da natureza da reação ou o tempo de latência até a resposta a partir da aplicação de um estímulo doloroso ao animal.

Diferentes dispositivos têm sido desenvolvidos para mensurar limiar nociceptivo de dor em grandes animais, entre eles o dispositivo Thermal Threshold Measurer (TTM) (PINHEIRO MACHADO FILHO, HURNIK e EWING, 1998) utilizado em bovinos, o dispositivo laser CO<sub>2</sub> para mensurar limiar térmico em bovinos (VEISSIER et al., 2000), o dispositivo a gás para mensurar limiar mecânico em bovinos (KEMP et al., 2008) e o algômetro utilizado em ovinos (STUBSJØEN et al., 2010).

Avaliações de limiar mecânico de dor em vacas leiteiras demonstram que animais com mastite moderada ou leve têm menor limiar de dor do que vacas consideradas saudáveis, demonstrando que o processo doloroso inflamatório torna o animal mais sensível a dor (FITZPATRICK et al., 1998; KEMP et al., 2008).

Assim, a mensuração do limiar de dor fornece informações quantitativas na resposta nociceptiva de vacas com mastite, podendo ser utilizada para identificar animais em estado de hiperalgesia e, juntamente, com outros indicadores, avaliar os efeitos dos medicamentos sobre as doenças dolorosas em bovinos (KEMP et al., 2008). Neste sentido, Pinheiro Machado Filho, Hurnik e Ewing (1998), ressaltam que o limiar nociceptivo térmico é utilizado para investigar a sensibilidade dos nociceptores periféricos a dor, bem como para avaliar a eficiência do uso de analgésicos.

Existe uma similaridade de limiar de dor entre as espécies animais e a variação entre estas não ocorre pela sensação em si, mas sim pela forma de manifestação comportamental reativa frente ao estímulo doloroso (LUNA, 2008). Portanto, um método validado para mensurar limiar de dor em ovinos não será da mesma forma utilizado em bovinos, podendo ocorrer uma resposta diferente ou até mesmo não ser aplicável a esta espécie. Os testes nociceptivos apresentados são considerados úteis na mensuração da sensibilidade nociceptiva dos animais de produção, pois são métodos considerados não-invasivos. No entanto, cabe ressaltar que nem todos os métodos estão testados e aprovados para todas as espécies animais, sendo necessários estudos que validem os dispositivos existentes para as diferentes espécies de animais de produção.

### **3.2.4 Prevenção e tratamento da dor**

Reconhecer a dor é parte do caminho, pois é necessário também encontrar formas de reduzir ou evitar sua ocorrência (WEARY et al., 2006). A maneira óbvia de

evitar a dor é dispensar os procedimentos que possam causá-la, mas em sistemas produtivos é inviável deixar de realizar procedimentos como a descorna, castração e outros. Como alternativa, um procedimento doloroso pode ser eliminado através da utilização de reprodutores selecionados para as características desejadas (WEARY et al., 2006), por exemplo, a descorna em terneiros pode ser evitada se for utilizado reprodutores de raças não aspadadas.

Já os casos de lesões dolorosas e doenças como a mastite podem ser evitadas por melhorias no cuidado dos animais, com a implantação de boas práticas de manejo (WEARY et al., 2006). Entretanto, nem sempre se consegue evitar em 100% os casos de doenças infecciosas nos rebanhos leiteiros, sendo necessária a adoção de tratamentos que diminuam o desconforto causado pela dor.

A dor nos animais de produção tem sido tradicionalmente negligenciada devido, entre outros fatores, as atitudes dos produtores e médicos veterinários (CLEMETS, MELLOR e FITZPATRICK, 2001; HUXLEY e WHAY, 2006).

O tratamento da dor nestes animais não progrediu com a mesma intensidade que em animais de companhia, permanecendo um desafio para os profissionais ligados a atividade (SHORT, 2003). Algumas das razões que sustentam o baixo uso de analgésicos em animais de produção incluem considerações econômicas e práticas, tais como o baixo valor de cada animal em relação ao custo dos tratamentos ou as complicações logísticas do fornecimento de analgesia durante a execução de procedimentos cirúrgicos em massa como a castração (VIÑUELA-FERNÁNDEZ et al., 2007). Outros fatores que contribuem são a escassez de analgésicos licenciados para uso em animais destinados ao consumo humano (O'CALLAGHAN, 2002), bem como as preocupações sobre resíduos de medicamentos em alimentos de origem animal e a necessidade de observar os períodos de carência (VIÑUELA-FERNÁNDEZ et al., 2007).

De modo geral, as drogas mais populares da atualidade que têm demonstrado alguma eficácia no tratamento da dor estão entre uma das cinco categorias mais amplas: opióides, antiinflamatórios não-esteróides (AINEs),  $\alpha_2$ -agonistas, anestésicos locais e outros. Cada grupo de drogas é mais ou menos eficaz, dependendo do tipo e da severidade da dor que esta sendo tratada (MUIR III, 2009).

Os antiinflamatórios não-esteroides (AINEs) compartilham ações terapêuticas, incluindo uma capacidade analgésica, antiinflamatória e antipirética,

possuindo uma ação bioquimicamente semelhante na inibição das enzimas ciclo-oxigenase (BUDSBERG, 2009). AINEs são amplamente utilizados na prática veterinária, a fim de proporcionar alívio dos sintomas no tratamento de condições inflamatórias agudas e crônicas, como as afecções da glândula mamária (FITZPATRICK et al., 2006). Os AINEs mais utilizados para tratar a dor associada com mastite clínica em bovinos leiteiros são o cetoprofeno, a flunixin meglumine (FIERHELLER, 2009) e o meloxicam (MCDUGALL, BRYAN e TIDDY, 2009).

Os opióides são drogas naturais ou sintéticas que possuem atividades semelhantes aos opiáceos, exercendo seus efeitos através da interação com receptores opiáceos das membranas celulares. Estes se caracterizam por produzir analgesia sem perda da consciência e são atualmente os meios sistêmicos mais eficazes de controlar a dor aguda ou pós-operatória (WAGNER, 2009). O uso de opióides em bovinos é relativamente limitado, sendo que estes não têm promovido analgesia clinicamente relevante para a maior parte de animais desta espécie (LERCHE e MUIR III, 2009).

Os  $\alpha_2$ -agonistas são um grupo de drogas sedativo-analgésicas que exercem seus efeitos pela interação com receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos do sistema nervoso central. Apesar de não serem considerados analgésicos de primeira linha como os opióides e os antiinflamatórios não-esteróides, estes são utilizados como analgésicos adjuvantes (LAMONT, 2009).

Os anestésicos locais bloqueiam reversivelmente a transmissão do potencial de ação ao longo das terminações ou fibras nervosas, sendo usualmente injetados em uma área localizada do corpo para bloquear áreas específicas (MAMA, 2009). Os anestésicos locais são mais frequentemente utilizados para produzir uma anestesia ou analgesia regional (MAMA, 2009), ou seja, não ocorre o tratamento da dor em si, mas sim perda da sensibilidade a dor, na região de aplicação do anestésico, por estas drogas atuarem bloqueando a chegada dos impulsos nervosos as fibras.

A transmissão da dor envolve múltiplos caminhos, mecanismos e sistemas de transmissão. Por isso, a terapia multimodal, combinação ou administração seqüencial de analgésicos que agem por diferentes mecanismos, é muito mais efetiva para proporcionar analgesia. Por exemplo, a administração de dois analgésicos maiores, AINE e opióide ou opióide e  $\alpha_2$ -agonista, produz efeito

analgésico supra-aditivo ou sinérgico, permitindo a redução das doses individuais e diminuindo os efeitos colaterais (LERCHE e MUIR III, 2009).

### **3.3 Bem-estar de bovinos leiteiros**

#### **3.3.1 Introdução**

O tema bem-estar animal vem recebendo crescente atenção nos meios técnico, científico e acadêmico, juntamente com as questões ambientais e a segurança alimentar. Em 1965, questionava-se a validade de avaliar um sistema de manejo apenas por parâmetros como produção ou produtividade, pois, o processo criatório precisa ser ambientalmente benéfico, eticamente defensável, socialmente aceitável e relevante aos objetivos, necessidades e recursos da comunidade para a qual foi desenhado para servir (FRASER, 1985).

Desde a década de 1970, os cientistas têm tentado definir ou conceituar o bem-estar dos animais. Uma definição bastante utilizada atualmente foi estabelecida pela “Farm Animal Welfare Council” (FAWC), órgão consultivo do governo britânico sobre bem-estar dos animais nas explorações pecuárias, o qual definiu as “Cinco liberdades” que norteiam as recomendações para o bem-estar de todas as espécies de animais (FITZPATRICK et al., 2006). As cinco liberdades são:

- ✓ Liberdade fisiológica (livre de fome e de sede);
- ✓ Liberdade ambiental (livre de desconforto);
- ✓ Liberdade referente à sanidade (livre de dor, injúrias e doenças);
- ✓ Liberdade comportamental (livre para expressar padrões normais de comportamento);
- ✓ Liberdade psicológica (livre de medo e estresse).

O bem-estar animal envolve questões complexas e abstratas, pois é a combinação de aspectos subjetivos e objetivos das condições de vida dos animais, incluindo a saúde, o comportamento, a criação, os sentimentos e o manejo (DUNCAN e FRASER, 1997; PETERS et al., 2010).

Até alguns anos atrás, o bem-estar da vaca não era percebido como sendo de baixo grau, e os sistemas de produção leiteira eram criticados regularmente apenas em relação à criação de terneiras (BROOM e FRASER, 2010). No entanto, a indústria leiteira vem se modificando e as evidências de baixo grau de bem-estar de vacas e suas relações com a produção vêm se acumulando e apresentando influência sobre a opinião pública e tecno-científica em vários países.

Os principais problemas de bem-estar de vacas leiteiras são claudicação, mastite, problemas reprodutivos, e qualquer condição que torne o animal incapaz de demonstrar respostas comportamentais normais ou fisiológicas emergenciais (BROOM e FRASER, 2010).

Os animais leiteiros estão produzindo consideravelmente mais que seus ancestrais e questionamentos surgem com relação a estarem no nível máximo da capacidade produtiva ou além dele, o que pode resultar em problemas de bem-estar. Segundo Broom e Fraser (2010), apesar de algumas vacas aparentemente serem altamente produtivas e não apresentarem problemas de bem-estar, o risco de ter baixo grau de bem-estar indicado por doenças como mastite, claudicação ou problemas de fertilidade é maior à medida que a produção aumenta. Em consequência, por outro lado, baixos níveis de bem-estar ocasionados por doenças inflamatórias, por exemplo, com consequente dor física pode impedir o animal de atingir o potencial máximo de produção. Além disso, estresses abióticos, como manejo aversivo, podem causar baixos níveis de bem-estar e perdas significativas na produção de leite (PETERS et al., 2010).

O nível de produção leiteira e a extensão das condições de doença de bovinos são evidentes a partir de uma variedade de estudos (URIBE et al., 1995; PRYCE et al., 1998). Há uma correlação positiva ( $0,29 \pm 0,05$ ) entre o nível de produção leiteira e a incidência de mastite em rebanhos leiteiros (PRYCE et al., 1998).

Uma forma de baixo grau de bem-estar é a dor (BROOM e FRASER, 2010), e esta pode ser experimentada em condições de enfermidades, principalmente quando se tem um processo infeccioso estabelecido, como em casos de mastite bovina. No entanto, as pesquisas avaliando a relação específica de doenças da glândula mamária e bem-estar são incipientes. Cabe afirmar que os animais são seres sencientes e tem capacidade de sentir e perceber dor (HOUPPT, 2006), ou seja, se a mastite causa dor essa é, sem dúvida, percebida pelos animais, comprometendo assim o bem-estar e a produtividade animal.

### **3.3.2 Avaliação de bem-estar**

A partir da verificação do atendimento ou não das cinco liberdades pode-se “quantificar” o bem-estar de determinado animal (BROOM e FRASER, 2010). Assim, para mensurar bem-estar animal é necessário identificar indicadores de alto e

baixo grau e para isso deve-se considerar a natureza dos animais, os aspectos emocionais e a função biológica do animal em avaliação.

Com relação à natureza dos animais, conhecê-la é fundamental para entender o comportamento normal e avaliar o bem-estar. Por exemplo, sabe-se que bovinos são animais de hábito gregário, ou seja, andam em grupos, apresentam organização social bem estabelecida e são animais com comportamento de presa (GRANDIN, 1997). Além dessas características, os bovinos apresentam outros padrões comportamentais e fisiológicos próprios da espécie (ver HOUP, 2006), como a ruminção (PHILLIPS, 1993). Quando em situações de avaliação do bem-estar utiliza-se a ocorrência e frequência de comportamentos anormais e estereotípias para definir o grau de bem-estar (MOLONY e KENT, 1997; BROOM e FRASER, 2010), por isso a importância de conhecer aspectos comportamentais naturais da espécie em avaliação.

Outro aspecto a ser considerado durante mensurações de bem-estar são as particularidades emocionais de cada animal como motivação, medo, preferência e outros. Esses aspectos subjetivos podem ser considerados quando se avalia bem-estar através de testes de preferência (FRASER e MATTHEWS, 1997). Além disso, medidas fisiológicas de prazer, como níveis de ocitocina, podem demonstrar o grau de bem-estar emocional em que o animal se encontra (BROOM e FRASER, 2010).

A verificação do bem-estar pode ser realizada também através de indicadores fisiológicos como níveis de glicocorticóides, frequência cardíaca, frequência respiratória e respostas do sistema imune, conforme relatos de Broom e Fraser (2010). Além disso, respostas como produção de leite (PETERS et al., 2010), leite residual (RUSHEN, DE PASSILLÉ e MUNKSGAARD, 1999) e respostas comportamentais (PETERS et al., 2010) podem auxiliar na avaliação de bem-estar respeitando a função biológica. Assim, considerando a função biológica de determinado animal, que no caso de vacas leiteiras a principal finalidade é reproduzir-se e produzir leite, é possível buscar cumprir a função do animal e, ao mesmo tempo, atender ao bem-estar, de acordo com os indicadores fisiológicos.

Os indicadores de bem-estar auxiliam a identificar o estado do animal em relação à sua situação na escala, que varia de bem-estar muito alto a muito baixo (BROOM e FRASER, 2010). Algumas medidas são mais relevantes para problemas de curto prazo, como aqueles associados a manejo humano, enquanto outras são

mais apropriadas para problemas de longo prazo (KEELING e JENSEN, 2002; BROOM, 2006).

É evidente que a ocorrência de enfermidades pode ser utilizada como um indicador de baixo grau de bem-estar em unidades de produção animal (RUSHEN et al., 2008). Esta medida de bem-estar é relevante, pois, o mesmo pode ser comprometido por vários fatores, entretanto, tem sido reconhecido que doenças têm um impacto negativo maior sobre o bem-estar (FITZPATRICK et al., 2006). Contudo, cabe salientar que os problemas de saúde também estão associados com o sofrimento animal (WELLS, OTT e HILLBERG SEITZINGER, 1998), e assim prejudicam o bem-estar de duas maneiras: efeitos patológicos da doença e efeitos do processo doloroso que se estabelece em função da doença. Assim, as medidas de dor, comentadas em capítulo anterior, são um dos métodos capazes de avaliar o grau de bem-estar em bovinos de leite, como em condições de afecções da glândula mamária.

### **3.4 Mastite, dor e bem-estar animal**

Vacas leiteiras com mastite sentem dor e têm seu bem-estar prejudicado. Essa afirmativa pode ser apresentada, sem dúvidas, após conhecer as cinco liberdades inerentes aos animais, bem como após a leitura dos capítulos anteriores. A mastite é uma condição muito dolorosa (BROOM e FRASER, 2010), afetando diretamente a terceira liberdade, a qual prevê que as vacas devem estar livres de dor e doenças para ter um alto grau de bem-estar.

Como ocorre com outras doenças, é difícil conhecer como a mastite afeta o bem-estar dos animais. No entanto, sabe-se que o efeito da mastite no animal depende da forma da doença (RUSHEN et al., 2008). Por exemplo, mastite sistêmica tem uma longa duração do efeito em relação à mastite localizada (BAREILLE et al., 2003) e pode ter maiores consequências no bem-estar.

A interação entre baixo grau de bem-estar e doença ao longo do tempo pode ser representada pela fig.3.

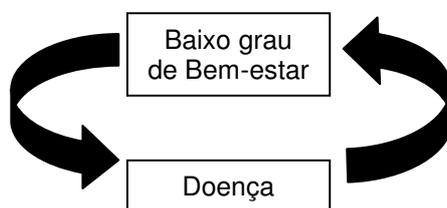


Figura 3 - Interação baixo grau de bem-estar animal e doença (adaptada a partir de BROOM e FRASER, 2010).

Entre as conseqüências do baixo grau de bem-estar associado à doença tem-se a redução da resistência a outras doenças (BROOM e FRASER, 2010), podendo explicar casos em que uma doença inicialmente suave leva o animal à morte. Desta forma, um animal submetido a um quadro clínico crônico de mastite não tratada adequadamente pode resultar, além das perdas em produção e composição do leite, em morte.

A mastite é fácil de ser diagnosticada, no entanto, cabe enfatizar que não é o diagnóstico da doença que ocasiona o bem-estar, mas o tratamento da doença e alívio da dor decorrente (BROOM e FRASER, 2010). Pode-se afirmar que o alívio adequado da dor promove o bem-estar geral do animal, além de apresentar um efeito positivo sobre a velocidade e qualidade da recuperação. Desta forma, o tratamento da dor objetiva obter um estado no qual a dor não é totalmente eliminada, mas se torna muito mais suportável, ao mesmo tempo em que os aspectos positivos são conservados e potencializados (HELLEBREKERS, 2002).

Diante do exposto, doenças infecciosas como a mastite, podem causar altos níveis de dor em vacas leiteiras, o que pode prejudicar negativamente o bem-estar e conseqüentemente a produção animal. Assim, a relação “doença”, “dor” e “bem-estar” formam um sistema em que os elementos influenciam-se entre si e cada um tem seu nível de importância. No entanto, ainda são necessários estudos que quantifiquem os efeitos da mastite sobre a dor e o bem-estar de bovinos leiteiros.

## **4 RELATÓRIO DO TRABALHO DE CAMPO**

### **4.1 Local e unidades experimentais**

Para o desenvolvimento do trabalho de pesquisa foram selecionadas duas unidades de produção leiteira (UPL), localizadas nos municípios de Bagé/RS e Pelotas/RS. A escolha das UPL ocorreu devido à concordância dos proprietários em realizar a pesquisa com seus animais. As UPL tinham seus rebanhos compostos por animais das raças Jersey e Holandês. Para fins de pesquisa, foram utilizadas como unidades experimentais todas as vacas em lactação das UPL, as quais estavam em ordenha.

### **4.2 Período**

Os animais das unidades de produção leiteira foram avaliados nos períodos de abril a maio de 2010, fevereiro a junho de 2011 e agosto de 2011.

### **4.3 Coleta, geração e análise de dados**

Foram coletados dados referentes a possíveis indicadores diretos e/ou indiretos de dor em casos de mastite. Entre os parâmetros sugeridos como variáveis respostas têm-se avaliações produtivas e qualitativas como a produção de leite, composição química, contagem de células somáticas, contagem bacteriana total e exame bacteriológico do leite. As avaliações bioquímicas foram realizadas utilizando a determinação dos níveis de proteínas de fase aguda, especificamente, haptoglobina, amilóide sérica A e fibrinogênio. Avaliações fisiológicas sugeridas foram limiar nociceptivo, frequência respiratória e variabilidade da frequência cardíaca. Além destas, parâmetros comportamentais como reatividade, ruminação,

defecação, micção, posição da cabeça na sala de ordenha, comportamento social e ingestivo foram indicados para as avaliações de dor.

Para tanto, inicialmente foi realizado um trabalho piloto na UPL de Pelotas/RS para fins de testar a metodologia e corrigir erros e dificuldades na aplicação da mesma. Assim, durante o trabalho piloto foram feitas algumas adaptações e também supressão de metodologia, para garantir a adequada coleta de dados e o êxito na continuidade da pesquisa.

As avaliações suprimidas foram reatividade, ruminação, defecação, micção, posição da cabeça na sala de ordenha, comportamento social e comportamento ingestivo. A supressão não indica que estas variáveis não sejam apropriadas para estudar dor em casos de mastite, mas sim que necessitam de metodologia mais detalhada para que de fato possam indicar efeitos da dor causada pela mastite. Já a variável limiar nociceptivo mecânico de dor (metodologia adaptada de STUBSJØEN, VALLE e ZANELLA, 2010) não foi aplicado, pois não se apresentou viável em grandes animais, devido à resposta não caracterizar uma reação ao estímulo de dor e sim, uma resposta pelo contato do dispositivo com a região do corpo. A variabilidade da frequência cardíaca não foi mensurada, pois o dispositivo para registro da mesma, não foi recebido até o momento de execução da pesquisa.

Após o piloto, partiu-se para a primeira etapa da pesquisa, na qual foram realizadas avaliações em todos os animais em lactação nas unidades de produção leiteira (UPL). Todos os animais tinham suas idades, estágios de lactação e raça anotados em planilha específica, conforme registros da UPL. Foi avaliado um total de 100 vacas nas UPL, sendo 90 da raça Jersey e dez (10) da Holandês. Nestas, as avaliações realizadas na sala de ordenha foram exame físico do úbere, testes da mastite (teste da caneca de fundo preto e teste da raquete/CMT), medição do volume de leite produzido por animal, coletas de amostras de leite para determinação da composição química, contagem de células somáticas, contagem bacteriana total e testes de limiar nociceptivo de dor. Após as avaliações na ordenha, os animais eram conduzidos ao brete, local em que se coletavam amostras de sangue para posterior determinação de parâmetros hematológicos e proteínas de fase aguda.

Os testes da caneca de fundo preto e CMT foram realizados segundo metodologia descrita por Santos e Fonseca (2007). O teste da caneca de fundo preto consistiu de ordenhar os três primeiros jatos de leite de cada teto em recipiente

escuro observando a formação de grumos, pus ou sangue. O teste do CMT foi realizado utilizando raquete com quatro repartições onde se ordenhou 2 ml de leite de cada quarto mamário, adicionando-se logo em seguida 2 ml de reagente; após homogeneizar a mistura com movimentos circulares, visualizava-se o resultado pela viscosidade, atribuindo graus de acordo com o nível de viscosidade. Foram avaliados um total de vinte e seis (26) vacas com mastite nível 0, vinte e cinco (25) com mastite nível 1, quinze (15) com mastite nível 2, vinte e cinco (25) com mastite nível 3 e nove (9) com mastite nível 4. As amostras de leite foram coletadas e armazenadas em frascos específicos contendo conservante (bronopol e azidiol). As análises foram realizadas no Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, onde foram determinados os teores de proteína, gordura, lactose e sólidos totais através de espectrofotometria por radiação infravermelha; contagem de células somáticas e contagem bacteriana total em contador eletrônico por citometria de fluxo. Alguns animais com casos clínicos e subclínicos de mastite tiveram amostras de leite coletadas por quarto mamário para exame bacteriológico.

As mensurações de limiar nociceptivo térmico de dor foram realizadas utilizando dispositivo TTM (*Thermal Threshold Measurer*) desenvolvido por Pinheiro Machado Filho, Hurnik e Ewing (1998), o qual consiste em aplicar um estímulo térmico na pata do animal, observando a resposta de retirada do membro, registrando assim a temperatura no momento da resposta.

Os níveis das proteínas de fase aguda, haptoglobina e amilóide sérica A, foram determinados no soro, em laboratório terceirizado, utilizando a técnica de nefelometria (ELSON, 1974). O fibrinogênio foi determinado, em laboratório terceirizado, baseando-se na precipitação deste e posterior leitura em refratômetro manual, segundo metodologia descrita por Schalm, Jain e Carroll (1981). Os dados de haptoglobina não foram analisados devido aos resultados, fornecidos pelo laboratório terceirizado, terem sido apresentados dentro de um intervalo ao invés de um valor exato, não sendo possível encontrar diferenças entre os animais, pois todos pertenciam ao mesmo intervalo de concentração desta proteína no sangue.

A cada avaliação nas UPL, as vacas com mastite clínica eram identificadas e encaminhadas para a segunda etapa da pesquisa. Nesta etapa, os animais recebiam tratamento intramamário com antibiótico (associação de flumetasona, espiramicina e neomicina) e antiinflamatório não-esteróide (cetoprofeno) por via intramuscular. Ambos os tratamentos foram aplicados por três (3) dias consecutivos.

Nesta etapa foram utilizadas sete (7) vacas que apresentaram casos naturais de mastite clínica. Cabe destacar que foram tratadas e avaliadas apenas sete (7) vacas, no entanto, foi detectado um total de 15 casos clínicos da doença, os quais foram tratados, mas perderam-se as avaliações devido a problemas com o funcionamento do dispositivo TTM (*Thermal Thershold Measurer*).

Os dados foram inicialmente submetidos a uma análise exploratória utilizando estatística multivariada, no entanto, não houve formação de grupos nítidos. Assim, posteriormente aplicou-se a análise definitiva, utilizando estatística descritiva, análise da variância e comparação de médias, através dos programas SAS, versão 2001 e Biostat 5.0.

## 5 ARTIGO 1

### **Impacto da mastite bovina na sensibilidade à dor, na contagem de células somáticas e nos níveis de proteínas de fase aguda\***

Impact of bovine mastitis in sensitivity to pain, in somatic cell count and on levels of acute phase proteins

M.D.P. Peters<sup>1</sup>, I.D. Barbosa Silveira<sup>2</sup>, S.V. Moura<sup>3</sup>, L.A. Lourenço<sup>4</sup>, B.P. Gonçalves<sup>4</sup>, V. Fischer<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Doutoranda em Zootecnia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS. Bolsista CAPES. Endereço: Avenida Duque de Caxias nº 947 Apart. 160, Bloco 15, Bairro Fragata, Pelotas, RS, CEP: 96030-003. Telefone: 53-81340509. E-mail: [monipaulapeters@yahoo.com.br](mailto:monipaulapeters@yahoo.com.br).

<sup>2</sup> Professor adjunto, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Pelotas.

<sup>3</sup> Doutoranda em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

<sup>4</sup> Graduando em Zootecnia, Universidade Federal de Pelotas.

<sup>5</sup> Professor Associado, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

### **RESUMO**

Avaliou-se a sensibilidade à dor, a contagem de células somáticas (CCS) e as concentrações de proteínas de fase aguda (PFAs) em vacas leiteiras com diferentes níveis de mastite. Foram utilizadas 100 vacas oriundas de unidades de produção leiteira no Rio Grande do Sul (RS). Foram realizados testes da caneca de fundo preto e CMT (*California Mastitis Test*) e a partir destes a mastite foi classificada nos seguintes níveis: nível 0- vaca sadia; nível 1- mastite subclínica grau I; nível 2- mastite subclínica grau II; nível 3- mastite subclínica grau III e

nível 4 – mastite clínica. Foram coletadas amostras de leite para determinação da CCS e medidas de limiar térmico de dor foram realizadas, em ambos os membros posteriores, utilizando dispositivo TTM (*Thermal Threshold Measurer*). Amostras de sangue para determinação das PFAs, a amilóide sérica A (SAA) e o fibrinogênio, foram coletadas de 17 e 32 vacas, respectivamente. CCS do leite de vacas com mastite clínica foi significativamente superior a de vacas com a doença nos diferentes níveis subclínicos, bem como a de vacas saudáveis. A sensibilidade à dor entre casos de mastite clínica e subclínica é semelhante. Apenas vacas com mastite clínica apresentam menor resistência à dor do que vacas saudáveis. O limiar de dor nos membros posteriores, direito ou esquerdo, não sofre influência do lado da glândula mamária afetada pela mastite. As proteínas de fase aguda, SAA e fibrinogênio, podem ser utilizadas como indicadores em casos de mastite desde que se conheça o estágio da doença.

Palavras-chave: mastite, células somáticas, limiar de dor, amilóide sérica A, fibrinogênio

#### **ABSTRACT**

Pain sensitivity thresholds, somatic cells count and acute phase proteins concentration (APP) were evaluated with dairy cows with different mastitis affections. One hundred lactating cows from production units were used. Tests of mug and CMT were conducted and from these mastitis was classified into the following levels: level zero (healthy cow), level 1 – subclinical mastitis first degree, level 2 - subclinical mastitis second degree, level 3 - subclinical mastitis third degree and level 4 - clinical mastitis. Milks samples were collected for SCC determination, thermal pain threshold was measured in both hind limbs, using TTM (*Thermal Threshold Measurer*) device. Blood was collected for acute phase proteins: serum amyloid A (SAA) and fibrinogen from 17 and 32 cows, respectively. SCC of the milk from cows affected with clinical mastitis is significantly higher than milk from cows with subclinical mastitis at different levels, as well as healthy cows. Sensitivity to pain is similar among clinical and subclinical mastitis, but cows presenting clinical mastitis show lower resistance to pain than healthy cows. Pain threshold measured in the hind limbs (right or left) is not affected by affected mammary gland side. The acute phase proteins (SAA and fibrinogen) may be used as markers in mastitis since knowing the stage of disease.

Keywords: mastitis, somatic cell, pain threshold, serum amyloid A, fibrinogen

## INTRODUÇÃO

A mastite é a doença infecciosa mais comum encontrada em rebanhos leiteiros do mundo e a que proporciona as maiores perdas econômicas na atividade. No Brasil, deduz-se que em função da alta prevalência de mastite nos rebanhos, possam ocorrer perdas de produção entre 12 e 15% (Santos e Fonseca, 2007). Considerando a produção de leite no Brasil em 2008, que foi de 27 bilhões de litros, ter-se-ia uma perda de 4,0 bilhões de litros.

A enfermidade pode apresentar-se de forma clínica ou subclínica. Quando há sinais visíveis da doença, tais como edema, endurecimento, dor na glândula mamária e/ou aparecimento de grumos ou pus no leite a mastite é considerada clínica. Por outro lado, quando não há alterações visíveis no leite e apenas redução na produção e alterações na composição química do leite a doença encontra-se na forma subclínica (Santos e Fonseca, 2007).

Os prejuízos econômicos da mastite bovina, clínica e subclínica, resultam da redução na produção de leite, alterações na composição química do leite, custos com tratamentos e, muitas vezes descarte dos animais (Santos e Fonseca, 2007). Ainda, uma das formas de baixo grau de bem-estar é a dor e a mastite é uma condição muito dolorosa em bovinos (Broom e Fraser, 2010). Assim, devido à preocupação crescente com aspectos relacionados à saúde e ao bem-estar animal faz-se necessário considerar também os efeitos da mastite sobre a dor e desconforto causados por essa doença. A preocupação com bem-estar animal e dor pode ser vantajosa para a própria produtividade, pois um animal com dor diminui, por exemplo, a ingestão de alimentos o que resultará em menor produção de leite (Hellebrekers, 2002).

Com relação à avaliação de dor e mastite pesquisas avaliando em bovinos leiteiros tem utilizado métodos subjetivos como comportamento (Siivonen et al., 2011) e objetivos como limiar nociceptivo (Fitzpatrick et al., 1998). O limiar nociceptivo de dor é um parâmetro bem descrito para avaliação de dor (Potter et al., 2006), o qual avalia objetivamente a dor (Fitzpatrick et al., 2006), pois caracteriza-se como um estímulo mínimo para que o animal o perceba como doloroso e responda a ele (Muir III, 2009). No entanto, poucos estudos (Fitzpatrick et al., 1998; Kemp et al., 2008) investigaram a resposta nociceptiva de dor em bovinos leiteiros com inflamação da glândula mamária e ainda não se pode afirmar se há diferença na sensação de dor entre os níveis, clínico e subclínico, da doença.

Na avaliação dos níveis de mastite nos rebanhos e na estimativa de perdas quantitativas e qualitativas na produção de leite a contagem de células somáticas no leite é uma ferramenta importante que pode ser utilizada. Estas células do leite apresentam correlação positiva com a presença de mastite em rebanhos leiteiros (Coffey et al., 1986;

Rupp e Boichard, 2000). As células somáticas incluem as de defesa, originárias da corrente sanguínea e as de descamação do epitélio alveolar da glândula mamária. Em casos de infecções intramamárias ocorre um aumento no número de células de defesa passando a predominar neutrófilos, macrófagos e linfócitos, enquanto o número de células epiteliais permanece inalterado (Philpot e Nickerson, 2002).

Os níveis de proteínas de fase aguda (PFAs) surgem como bons indicadores de processo inflamatório como ocorrem em casos de mastite. As PFAs são um grupo de proteínas séricas que mudam suas concentrações em animais sob condições como infecção, inflamação, trauma cirúrgico ou estresse (Murata et al., 2004). Na mastite bovina, a haptoglobina, a amilóide sérica A (Eckersall et al., 2001) e o fibrinogênio tem demonstrado utilidade na diferenciação de casos leves e moderados da doença. Até a data, existe um número limitado de estudos publicados sobre o uso dessas proteínas para avaliar níveis de mastite.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a sensibilidade à dor, a contagem de células somáticas e os níveis de proteínas de fase aguda em vacas leiteiras com diferentes níveis de mastite.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado em duas unidades de produção leiteira (UPL), localizadas nos municípios de Bagé-RS e Pelotas-RS, no período de fevereiro a agosto de 2011. Os rebanhos das UPL eram compostos por animais das raças Jersey e Holandês, totalizando para o estudo 100 vacas em lactação. Os animais tinham idade média de seis (6) anos, produção de leite média de  $7,4 \pm 0,3$  litros e estágio de lactação variando de 5 a 523 dias.

Inicialmente foram realizadas avaliações clínicas das vacas, na sala de ordenha, através de exame físico do úbere, com palpação da glândula mamária, buscando alterações como nódulos, inchaço, vermelhidão, rubor e dor. Na sequência, foi realizado o teste da caneca de fundo preto, para identificação de alterações visuais no leite indicativas de mastite clínica, e teste do CMT (*California Mastitis Test*) para identificar casos subclínicos da doença. O teste da caneca consiste em ordenhar os três primeiros jatos de leite de cada teto em recipiente escuro verificando a formação de grumos ou pus. Já o teste do CMT foi realizado utilizando bandeja apropriada onde ordenhou-se 2 ml de leite de cada quarto mamário, adicionando logo em seguida cerca de 2 ml de reagente de CMT, misturando-os com movimentos circulares e visualizando o resultado pela gelatinização.

Os resultados do teste do CMT foram classificados, de acordo com o grau de gelatinização, em quatro escores (Adaptado de Santos e Fonseca, 2007): nível 0-vaca sadia (gelatinização normal, reação “aguada”); nível 1-mastite subclínica grau I (gelatinização leve); nível 2-mastite subclínica grau II (gelatinização intensa) e nível 3-mastite subclínica grau III (gelatinização muito intensa). Os resultados positivos ao teste da caneca de fundo preto receberam, para fins de análise, escore de nível quatro (4). Todos os animais tiveram suas respostas aos testes registradas em planilha, e quando o resultado na caneca de fundo preto ou no CMT foi positivo identificou-se o lado do quarto mamário afetado (direito ou esquerdo). Foram avaliados um total de vinte e seis (26) vacas com mastite nível 0, vinte e cinco (25) com mastite nível 1, quinze (15) com mastite nível 2, vinte e cinco (25) com mastite nível 3 e nove (9) com mastite nível 4.

As mensurações de limiar nociceptivo de dor foram realizadas durante a ordenha utilizando dispositivo TTM (*Thermal Threshold Measurer*) desenvolvido por Pinheiro Machado Filho et al. (1998). Estas mensurações consistiam em aplicar um estímulo térmico ao membro posterior do animal, na região dorsal das falanges médias, logo acima do casco, observando a resposta de retirada do membro. No momento da resposta registrava-se a temperatura em graus Celsius. Para evitar algum dano à pele do animal, foi fixado como limite superior a temperatura de 25°C acima do basal do animal (38°C), ou seja, 63°C. Quando atingida essa temperatura sem ocorrer a resposta, o estímulo era desativado. O teste nociceptivo foi realizado em ambos os membros posteriores, consistindo em três medidas consecutivas do limiar térmico, para cada membro, em que a resposta de retirada ocorreu. Todos os testes foram realizados pela mesma pessoa conforme metodologia de aplicação descrita por Pinheiro Machado Filho et al. (1998).

Foram coletadas 100 amostras de leite (1 por animal) em frascos específicos contendo o conservante Bronopol (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol), acondicionadas em caixa isotérmica, com gelo reciclável. As amostras foram enviadas em até 24 horas para o laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Clima Temperado, para determinação da contagem de células somáticas (CCS), utilizando o método de citometria de fluxo por meio do equipamento eletrônico Somacount 300 (Bentley Instruments).

Amostras de sangue foram coletadas em tubos de ensaio a partir da contenção dos animais em bretes apropriados, com extração de sangue da veia caudal. Para determinação dos níveis de amilóide sérica A (SAA) foi coletada amostra sem adição de anticoagulante com posterior centrifugação e extração do soro. Este foi acondicionado em eppendorfs, congelado e armazenado em ultrafreezer até a análise em laboratório terceirizado. A técnica utilizada

para determinar os níveis de SAA foi nefelometria conforme metodologia descrita por Elson (1974). Para determinação dos níveis de fibrinogênio foi coletada amostra com anticoagulante EDTA (etilenodiaminotetra cético) e posterior análise baseando-se na precipitação deste e posterior leitura em refratômetro manual, segundo metodologia descrita por Schalm et al. (1981). Foram analisadas no total 17 e 32 amostras para amilóide sérica A e fibrinogênio, respectivamente.

O protocolo de execução (n° 6537) do projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

Os dados de limiar nociceptivo térmico de dor foram organizados de duas formas. Para análise deste limiar entre os níveis de mastite, utilizou-se a média das medidas deste realizadas em ambos os membros posteriores (n=100). Para analisar se há diferença no limiar nociceptivo de dor entre os membros posteriores direito e esquerdo, em vacas com mastite em um único lado da glândula mamária (direito ou esquerdo) (n=36), foram utilizados limiares por membro posterior. Foi considerado para essa análise apenas as vacas com os níveis de mastite entre 1 e 4, e com a doença em apenas um lado da glândula mamária (direito ou esquerdo), excluindo nesse caso vacas com o nível 0 (sadia) da doença.

Os dados coletados foram submetidos à análise da variância, considerando como variável classificatória a mastite, com cinco (5) níveis e as demais variáveis classificadas como dependentes (CCS, limiar de dor e proteínas de fase aguda). O limiar nociceptivo de dor entre membros posteriores (direito e esquerdo) foram as duas variáveis classificatórias para serem comparadas entre si, quando em vacas com níveis de mastite entre 1 e 4 em apenas um lado da glândula mamária. Quando esta análise foi significativa (*F-test*), a separação das médias foi realizada pelo teste de Tukey. A significância estatística foi testada na probabilidade de 5% de erro. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software estatístico SAS (Statistical Analysis System, 2001).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve diferença ( $P=0,0137$ ) nos limiares térmicos entre os níveis de mastite como mostrado na Tab.1. Verifica-se que, devido ao menor limiar térmico, a mastite clínica (nível 4) aumenta a sensibilidade à dor, em vacas leiteiras quando comparado com animais em condições saudáveis da glândula mamária (nível 0) e de mastite subclínica de nível 1 (Tab. 1). No entanto, não difere quando comparado com casos subclínicos de nível 2 e 3. Já, os animais com quadro subclínico de nível 2 ou 3 não apresentaram diferença na sensibilidade a dor em relação a animais sadios. Vacas sadias e vacas com mastite subclínica nível 1 apresentam os

maiores valores de limiar térmico, demonstrando maior resistência a dor. Os resultados deste estudo relativos à mastite clínica são semelhantes aos encontrados por Fitzpatrick et al. (1998) e Kemp et al. (2008), em que o limiar de dor em vacas com mastite clínica, leve e moderada, foi significativamente menor do que em vacas consideradas saudáveis, demonstrando maior sensibilidade à dor em animais com mastite clínica. Cabe salientar que no estudo de Fitzpatrick et al. (1998) e Kemp et al. (2008) foram utilizados apenas casos de mastite caracterizados como clínico com nível de severidade leve ou moderado. No entanto, no presente estudo utilizou-se casos clínicos de mastite e, também, esta na sua forma subclínica (níveis 1 a 3), a qual não apresenta sinais visíveis da presença da doença.

Tabela 1. Limiar térmico de dor em vacas com diferentes níveis de mastite.

Nível de mastite	Limiares médios (°C)	Erro padrão
<b>0</b>	56,1 abc	1,0
<b>1</b>	57,1 a	1,0
<b>2</b>	53,2 cd	1,3
<b>3</b>	53,9 bcd	1,0
<b>4</b>	51,4 d	1,7

Nível de mastite 0: saudável, 1: subclínica grau I, 2: subclínica grau II, 3: subclínica grau III, 4: clínica. Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste Tukey ( $P < 0,05$ ).

O processo inflamatório, decorrente da mastite clínica, induz a alterações no processamento da informação nociceptiva da dor, o que traz graves consequências ao animal. Entre as características comuns de dor inflamatória esta a hiperalgesia, resposta exagerada a estímulos dolorosos (Coderre e Melzack, 1987; Nolan, 2000), a qual pode ser utilizada como um indicador da presença de dor (Fitzpatrick et al., 2006). Quando esta situação ocorre os animais podem ser chamados de “hiperalgésicos”, ou seja, eles respondem a um estímulo desagradável a um nível que poderia não afetar indivíduos normais (Fitzpatrick et al., 2006). Hiperalgesia pode, portanto, ter ocorrido neste estudo com as vacas que estavam acometidas de mastite clínica e responderam mais sensivelmente ao estímulo térmico do que as vacas saudáveis, indicando assim a presença de dor nestes animais.

Não houve diferença na sensibilidade à dor entre os membros direito e esquerdo, independente do lado do quarto mamário acometido de mastite (Tab.2). Estes resultados são contrários aos de Fitzpatrick et al.(1998) onde vacas com mastite, leve ou moderada, apresentaram aumento na sensibilidade à dor na pata do mesmo lado que o quarto mastítico. No entanto, Kemp et al. (2008), encontraram sensibilidade à dor significativamente menor (maiores limiares) no membro do mesmo lado do quarto mamário afetado, demonstrando um estado de hipoalgesia. Convém ressaltar, que os autores citados trabalharam apenas com

mastite clínica, em diferentes severidades (leve e moderada). Portanto, baseado nos resultados do presente estudo e nas pesquisas dos autores citados, a relação da sensibilidade a dor entre membros de realização do teste de limiar e sua relação com o lado do quarto mamário afetado pela mastite ainda são inconsistentes, sendo necessários mais estudos que possam confirmar ou não o encontrado nestes estudos.

Tabela 2. Limiar térmico de dor nos membros posteriores, direito e esquerdo, em vacas com mastite em um único lado da glândula mamária (GM).

	XLE	XLD	Valor de P
<b>GM (direito ou esquerdo)</b>	54,9 ± 1,3	54,2 ± 1,2	0,7012

XLE: limiar térmico no membro posterior esquerdo; XLD: limiar térmico no membro posterior direito. Valores de  $P > 0,05$  não diferem significativamente.

A contagem de células somáticas (CCS) diferiu ( $P < 0,001$ ) entre os níveis de mastite conforme resultados na Tab.3.

A CCS do leite de animais com mastite clínica (nível 4) foi significativamente superior a de animais com a doença na forma subclínica, independente do grau, bem como a de animais sadios (Tab.3). Os valores para CCS no caso clínico confirmam resultados de Sordillo et al. (1997), cujos valores de CCS no leite podem chegar a milhões de células/ml em condições graves da doença. A CCS do leite de animais com mastite subclínica grau 3 foi significativamente maior do que os casos subclínicos de grau 1 e 2, bem como dos animais sadios, sendo estes iguais entre si. Assim, casos de mastite subclínica leve (grau 1 e 2) não chegam a alterar a contagem de células somáticas a um nível que os diferencie de animais em condições saudáveis da glândula mamária. No entanto, os casos subclínicos graves (grau 3) merecem atenção pois elevam drasticamente a CCS do leite.

Tabela 3. Contagem de células somáticas (CCS) em diferentes níveis de mastite em vacas leiteiras em Pelotas e Bagé, RS.

Nível de mastite	CCS (cél/ml)
<b>0</b>	255.461 c
<b>1</b>	299.252 c
<b>2</b>	487.800 c
<b>3</b>	2.037.360 b
<b>4</b>	4.376.666 a

Nível de mastite 0: sadia, 1: subclínica grau I, 2: subclínica grau II, 3: subclínica grau III, 4: clínica. Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste Tukey ( $P < 0,001$ ).

Segundo Santos e Fonseca (2007) o leite de uma glândula ou quarto mamário não infectado por mastite apresenta CCS menor que 200.000 células/ml. Os valores de CCS encontrados no presente estudo para animais sadios foram superiores ao citado na literatura para esta condição e não diferiram estatisticamente dos níveis iniciais, 1 e 2, de mastite subclínica (Tab. 1). Porém, convém ressaltar que outros aspectos, além da mastite, podem causar aumento de células somáticas no leite. Fatores como época do ano, raça, estágio de lactação, número de lactações, problemas nutricionais e doenças intercorrentes também podem causar elevação do número de células somáticas (Philpot e Nickerson, 2002; Ladeira, 2007). Assim, a CCS não deve ser utilizada como parâmetro único na identificação de casos de mastite em rebanhos, pois, como verificado neste estudo, animais sem sinais de mastite subclínica ou clínica também podem apresentar valores relativamente elevados de CCS.

As concentrações séricas das proteínas amilóide sérica A e fibrinogênio não diferiram entre os níveis de mastite como se verifica na Tab.4.

Tabela 4. Níveis sanguíneos de amilóide sérica A (SAA) e fibrinogênio segundo os níveis de mastite.

Nível de mastite	SAA (mg/l)	Fibrinogênio (mg/dl)
<b>0</b>	2.29 ± 1.1	350.0 ± 68.6
<b>1</b>	3.22 ± 0.8	480.0 ± 61.4
<b>2</b>	0.73 ± 1.9	371.43 ± 73.3
<b>3</b>	0.73 ± 1.9	400.0 ± 97.0
<b>4</b>	0.93 ± 0.7	533.3 ± 112.0
<b>Valor de P</b>	0.3337	0.4919

Nível de mastite 0: sadia, 1: subclínica grau I, 2: subclínica grau II, 3: subclínica grau III, 4: clínica. SAA: amilóide sérica A. Valores de P>0.05 não diferem significativamente.

Apesar da sensibilidade clínica comprovada da amilóide sérica A (SAA) em distinguir entre casos agudos e crônicos de inflamação (Horadagoda et al., 1999), neste estudo não encontrou-se diferença nas concentrações séricas de SAA entre os níveis de mastite (Tab.4). Este resultado pode ser atribuído, provavelmente, a duração da resposta das proteínas de fase aguda, sendo a SAA detectada no plasma a partir de quatro horas da lesão tecidual e atingindo o seu pico em 24 a 72 horas, podendo chegar a mil vezes o valor normal (James, 2002). Portanto, o momento de detecção da mastite através dos testes utilizados neste estudo pode não ter coincidido exatamente com o período em que as concentrações séricas de SAA estavam elevadas. Os resultados encontrados (Tab.4) são contrários aos de Eckersall et al.

(2001), em que vacas com mastite clínica leve ou moderada apresentaram maior concentração sérica de SAA do que vacas saudáveis.

As concentrações de fibrinogênio também não foram influenciadas pelos níveis de mastite, provavelmente, pela mesma razão que a SAA não se alterou. O fibrinogênio tem pico em sete a dez dias e eleva-se duas a três vezes o normal (Neto e Carvalho, 2009). Os resultados do presente estudo discordam de Tabrizi et al. (2008) e Colla et al. (2011), onde as concentrações de fibrinogênio encontradas foram significativamente maiores em vacas com mastite do que em vacas sadias. Portanto, o padrão de resposta da SAA e do fibrinogênio pode explicar os resultados encontrados neste estudo, porque o momento de coleta e avaliação das concentrações séricas destas PFAs pode ter sido anterior ou posterior ao pico da resposta de fase aguda, pois, quando era identificado o nível da doença, desconhecia-se o momento exato de início do processo infeccioso.

### CONCLUSÕES

A mastite, quando na forma clínica, causa dor em bovinos leiteiros.

A contagem de células somáticas no leite é um bom indicador do nível de mastite.

Para utilização de proteínas de fase aguda como indicador em casos de mastite faz-se necessário o conhecimento do estágio exato da doença.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BROOM, D.M.; FRASER, A.F. *Comportamento e bem-estar de animais domésticos*. São Paulo: Manole, 4ª ed., 2010. 438 p.

CODERRE, T.J.; MELZACK, R. Cutaneous hyperalgesia: contributions of the peripheral and central nervous systems to the increase in pain sensitivity after injury. *Brain Res.*, v.404, p.95-106, 1987.

COFFEY, E.M.; VINSON, W.E; PEARSON, R.E. Potential of somatic cell concentration in milk as a sire selection criterion to reduce mastitis in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, v.69, n.8, p.2163-2172, 1986.

COLLA, M.F.; VALLE, S.F.; SECCHI, P. et al. Plasma haptoglobina values in cows with different somatic cell counting in milk samples. *Acta Scientiae Veterinariae.*, v.39, p. 944-949, 2011.

ECKERSALL, P.D.; YOUNG, F.J.; MCCOMB, C. et al. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. *Vet. Rec.*, v.148, p.35-41, 2001.

ELSON, E.C. Quantitative determination of serum haptoglobina: a simple and rapid method. *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 62, n. 5, p. 655-663, 1974.

FITZPATRICK, J.L.; YOUNG, F.J.; ECKERSALL, D. et al. Recognising and controlling pain and inflammation in mastitis. In: PROCEEDINGS OF BRITISH MASTITIS CONFERENCE, 1998, Stonoleigh. *Anais...Stonoleigh*: [s.n.] 1998, p. 36-44, 1998.

FITZPATRICK, J.; SCOTT, M.; NOLAN, A. Assessment of pain and welfare in sheep. *Small Rum. Res.*, v. 62, p.55-61, 2006.

HELLEBREKERS, L.J. *Dor em animais*. São Paulo: Manole, 1ª Ed., 2002. 166p.

HORADAGODA, N.U.; KNOX, K.M.G.; GIBBS, H.A. et al. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. *Vet. Rec.*, v. 144, p.437-441, 1999.

JAMES, K. Cellular and Humoral Mediators of Inflammation: Nonspecific Humoral Response to Inflammation. In: MCCLATCHEY, K.D. *Clinical Laboratory Medicine*. 2 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002.

KEMP, M.H.; NOLAN, A.M.; CRIPPS, P.J. et al. Animal-based measurements of the severity of mastitis in dairy cows. *Vet. Rec.*, v.163, p.175-179, 2008.

LADEIRA, S.L.R. Mastite Bovina. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; LEMOS, R.A.A.; BORGES, J.R.J. *Doenças de Ruminantes e eqüídeos*. 3ed. Santa Maria: Palloti, v.1, 2007. p. 359-372.

MUIR III, W. Fisiologia e fisiopatologia da dor. In: GAYNOR, J.S.; MUIR III, W. *Manual de Controle da dor em Medicina Veterinária*. São Paulo: Editora MedVet, 2009. p.13-41.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet. J.*, London, v.168, p. 24-40, 2004.

NETO, N. S.R.; CARVALHO, J.F. O uso de provas de atividade inflamatória em reumatologia. *Rev. Bras. Reumatol.*, v.49, n.4, p.413-430, 2009.

NOLAN, A.M. Patterns and management of pain in animals. In: MORTON, D. (Ed.), *Pain: its Nature and Management in Man and Animals, International Congress and Symposium Series*. Lord Soulsby of Swaffham Prior, v.246. Royal Society of Medicine Press, p.93-100, 2000.

PHILPOT, W.; NICKERSON, S.C. Vencendo a luta contra a mastite. São Paulo: Milkbuzz, 2002. 188p.

PINHEIRO MACHADO FILHO, L.C.; HURNIK, J.F.; EWING, K.K. A thermal threshold assay to measure the nociceptive response to morphine sulphate in cattle. *Can. J. Vet Res.*, v. 62, p. 218-223, 1998.

POTTER, L.; MCCARTHY, C.; OLDHAM, J. Algometer reliability in measuring pain pressure threshold over normal spinal muscles to allow quantification of anti-nociceptive treatment effects. *Int J Osteopath Med.*, v. 9, p.113-119, 2006.

RUPP, R.; BOICHARD, D. Relationship of early first lactation somatic cell count with risk of subsequent first clinical mastitis. *Liv. Prod. Sci.*, v.62, n.2, p.169-180, 2000.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. *Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite*. São Paulo: Manole, 2007. 314p.

SAS Institute INC., SAS Technical Report. Release 8.01 TS Level 01MO. Cary: NC, USA. 2001.

SCHALM, W.; JAIN, N. C.; CARROLL, E.J. *Hematología veterinaria*. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 1981. 856 p.

SIIVONEN, J.; TAPONEN, S.; HOVINEN, M. et al. Impact of acute clinical mastitis on cow behavior. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, v. 132, p.101-106, 2011.

SORDILLO, L.M.; SHAFER-WEAVER, K.; ROSA, D. Immunobiology of mammary gland. *J. Dairy Sci.*, Champaign, v.80, p.1851-1865, 1997.

TABRIZI, A.D.; BATAVANI, R.A.; ASRI REZAEI, S. et al. Fibrinogen and ceruloplasmin in plasma and milk from dairy cows with subclinical and clinical mastitis. *Pakistan J. Biol. Sci.*, Faisalabad, v.15, p.571-576, 2008.

## 6 ARTIGO 2

### **Efeito do tratamento com o antiinflamatório não esteróide cetoprofeno na sensibilidade à dor de vacas leiteiras com mastite clínica\***

Effect of treatment with the nonsteroidal antiinflammatory ketoprofen on pain sensibility of dairy cows with clinical mastitis

M.D.P. Peters<sup>1</sup>, I.D. Barbosa Silveira<sup>2</sup>, S.V. Moura<sup>3</sup>, J.J. Luiz<sup>4</sup>, V. Fischer<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Doutoranda em Zootecnia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS. Bolsista CAPES. Endereço: Avenida Duque de Caxias nº 947 Apart. 160, Bloco 15, Bairro Fragata, Pelotas, RS, CEP: 96030-003. Telefone: 53-81340509. E-mail: [monipaulapeters@yahoo.com.br](mailto:monipaulapeters@yahoo.com.br).

<sup>2</sup> Professor adjunto, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Pelotas.

<sup>3</sup> Doutoranda em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

<sup>4</sup> Estudante de Agropecuária, Instituto Federal Sul rio-grandense, *Campus* Bagé.

<sup>5</sup> Professor Adjunto, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

### **RESUMO**

Avaliou-se o efeito do antiinflamatório não-esteróide (AINE) cetoprofeno, em associação com antibiótico, na sensibilidade à dor em vacas leiteiras com mastite clínica. Para tanto, foram avaliadas sete (7) vacas oriundas de unidades de produção leiteira no estado do Rio Grande do Sul (RS), que apresentaram casos naturais da doença. Os limiares de dor foram mensurados antes e depois do tratamento da seguinte maneira: antes do tratamento (T0), um dia após o início do tratamento (T1) e dois dias após o início do tratamento (T2). A sensibilidade a dor, nestes tratamentos, foi mensurada a partir dos limiares térmicos utilizando o dispositivo TTM

(*Thermal Threshold Measurer*). Os resultados demonstraram que o limiar de dor no período T0 foi significativamente menor do que no T1 e este, por sua vez, não diferiu do T2. No entanto, o T2 também não diferiu do T0. Observou-se uma maior variação nas respostas de limiar no T0, com redução desta no T1. Já no T2, a variação nas respostas individuais de limiar de dor apresentou valores intermediários entre T1 e T0. Vacas com mastite clínica tratadas apresentam redução na sensibilidade à dor apenas no primeiro dia após o início do tratamento.

Palavras chave: bovinos de leite, infecção mamária, terapia, AINE, limiar de dor

### ABSTRACT

The non steroid anti-inflammatory (AINE) ketoprofen associated to antibiotic was evaluated upon pain sensibility of 7 cows naturally affected by clinical mastitis, derived from dairy production units of the State of Rio Grande do Sul. Pain threshold was measured before (T0) and 1 (T1) and 2 (T2) days after the beginning of the treatment. The sensitivity to pain, these treatments was measured from thermal thresholds using the TTM (*Thermal Threshold Measurer*) device. The pain threshold measured on T0 was significantly lower than the pain threshold measured on T1, which was similar to the threshold measured on T2, which was similar to T0. Variability in pain threshold among cows was larger at T0, but it decreased on T1, presenting intermediary values at the T2. Cows with clinical mastitis and treated with AINE show reduction in pain sensibility just on the first day after the beginning of the treatment.

Key words: dairy cattle, infection mammary, therapy, AINE, pain threshold

### INTRODUÇÃO

A mastite é definida como uma infecção da glândula mamária caracterizada por alterações físicas, químicas e organolépticas do leite, além de alterações do tecido glandular (Ladeira, 2007). Essa doença é responsável por grandes perdas econômicas devido à redução na produção de leite, perdas pelo descarte e morte de animais, além dos custos com tratamentos, principalmente com antibióticos (Philpot e Nickerson, 2002; Ladeira, 2007; Radostits et al., 2007).

A infecção da glândula mamária provoca uma resposta imune, incluindo o deslocamento de células do sangue para o leite (Sordillo et al., 1997). Estas células são

atraídas para dentro da glândula mamária pelas citocinas, prostaglandinas e complemento (Persson et al., 1993; Sordillo et al., 1997). As concentrações de prostaglandinas  $PGE_2$ ,  $PGF_{2\alpha}$  e  $PGI_2$  apresentam-se aumentadas em casos de infecção intramamária (Atroschi et al., 1996) e estão envolvidas na produção da inflamação, inchaço, dor e febre (Fierheller, 2009). Prostaglandinas são produzidas pela enzima ciclo-oxigenase (COX), a qual apresenta duas isoformas bem estabelecidas, COX-1 e COX-2, e uma terceira isoforma, a COX-3, a qual é uma variante alternativa da COX-1. A COX-2 é tida usualmente como a isoforma induzida e é encontrada em sítios de inflamação (Budsberg, 2009).

O uso de terapia com antiinflamatório não esteróide (AINEs) pode ser indicado para aliviar os sinais clínicos sistêmicos e locais da inflamação (McDougall et al., 2009) produzido pelo aumento de mediadores inflamatórios, como as prostaglandinas. Especificamente, nos casos de mastites clínicas, em virtude do quadro inflamatório, o uso de AINEs é bastante favorável, reduzindo o desconforto e dor dos animais, além de obter maior êxito nos tratamentos quando associado ao uso de antibióticos (Anderson et al., 1986). As drogas antiinflamatórias não esteróides (DAINEs) podem ser usadas para aliviar a dor leve e até severamente moderada, possuindo ação antipirética, antiinflamatória e analgésica (Smith, 2003). DAINEs podem ser não seletivos ou inibidores seletivos da COX-2. Os AINEs que inibem a enzima COX-2 periférica bloqueiam a formação de prostaglandinas como a  $PGE_2$  e  $PGI_2$ , as quais causam sensibilização dos nociceptores terminais periféricos às ações de mediadores que produzem dor localizada e hipersensibilidade (Stock et al., 2001; Bergh e Budsberg, 2005). Contudo, poucos estudos (Shpigel et al., 1994, Banting et al., 2008; McDougall et al., 2009) têm sido desenvolvidos para demonstrar os efeitos dos AINEs no tratamento de casos de mastite clínica.

Entre os AINEs licenciados para uso em bovinos, o cetoprofeno é o único que não tem período de carência no leite (Fierheller, 2009). O cetoprofeno é um dos mediadores mais potentes da dor (Landoni et al., 1995), inibidor da COX-1, COX-2 e também da lipooxigenase, e tem potencial de ação analgésica central via mecanismo serotoninérgico (Diaz-Reval et al., 2004). Vacas com mastite aguda tratadas com cetoprofeno melhoraram as taxas de recuperação quando comparadas com vacas que não receberam tratamento para dor (Shpigel et al., 1994).

O tratamento das mastites deve utilizar também antibióticos adequados e para isso, o ideal é que sejam realizados cultivo, isolamento e antibiograma do agente etiológico da mastite. Com a identificação do agente e testes de susceptibilidade a antimicrobianos pode-se escolher o medicamento apropriado (Langoni, 1995). A indicação terapêutica apropriada é

essencial para preservar a saúde da glândula mamária e, conseqüentemente, também para manter a produtividade animal.

Testes nociceptivos têm sido utilizados com êxito na avaliação da resposta de bovinos aos medicamentos para alívio da dor como o opiáceo morfina (Pinheiro Machado Filho et al., 1998) e o antiinflamatório não esteróide flunixinina meglumine (Fitzpatrick et al., 1998). Entretanto, trabalhos avaliando o efeito de AINEs, no limiar de dor em casos de mastite clínica ainda são poucos (Fitzpatrick et al., 1998).

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do antiinflamatório não-esteróide cetoprofeno, em associação com antibiótico, na sensibilidade à dor em vacas leiteiras acometidas de mastite clínica.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

A metodologia do estudo foi aprovada, antes da execução, pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) (protocolo n° 6537).

O estudo foi realizado utilizando sete (7) vacas leiteiras, oriundas de unidades de produção leiteira (UPL) localizadas nos municípios de Bagé-RS e Pelotas-RS, durante o ano de 2011. A seleção das vacas ocorreu a partir da detecção de casos naturais de mastite clínica através de exame físico do úbere, com palpação da glândula mamária, buscando alterações como nódulos, inchaço, vermelhidão, rubor e dor, bem como pelo teste da caneca de fundo preto. O teste da caneca consiste de ordenhar os três primeiros jatos de leite de cada teto em recipiente escuro verificando a formação de grumos ou pus (Santos e Fonseca, 2007). Os casos clínicos de mastite não foram separados por nível de severidade da doença.

As vacas tinham idade média de oito (8) anos, produção média de leite de 8,8 litros por dia, estágio de lactação variando de 105 a 523 dias e contagem de células somáticas média no leite de 5.291.429 células/ml.

O tratamento adotado neste estudo foi o uso do antiinflamatório não-esteróide (AINE) cetoprofeno, por via intramuscular, e o antibiótico a base da associação de flumetasona, espiramicina e neomicina, por via intramamária. O cetoprofeno é licenciado para uso em bovinos, não tem período de carência no leite e já foi testado em estudos de mastite. O antibiótico utilizado é de uso rotineiro adotado pelos produtores para tratar casos de mastite clínica. A dosagem de cetoprofeno aplicada foi de 3 mg por kg de peso vivo (recomendação do fabricante), totalizando 15 ml por animal (peso médio vivo de 500 kg) do produto comercializado na concentração de 10%. Ambos os medicamentos, antibiótico e AINE, foram

aplicados por três (3) dias consecutivos, sendo o AINE aplicado em dose diária única e o antibiótico em duas doses após as ordenhas da manhã e da tarde.

As mensurações de limiar nociceptivo de dor foram realizadas durante a ordenha utilizando dispositivo TTM (*Thermal Threshold Measurer*) desenvolvido por Pinheiro Machado Filho et al. (1998), o qual consistia de aplicar um estímulo térmico ao membro posterior do animal, na região dorsal das falanges médias, logo acima do casco, observando a resposta de retirada do membro. No momento da resposta registrava-se a temperatura em graus Celsius. Para evitar algum dano à pele do animal, foi fixado como limite superior a temperatura de 25°C acima do basal do animal (38°C), ou seja, 63°C. Quando atingida essa temperatura sem ocorrer à resposta, o estímulo era desativado. Cada teste nociceptivo consistiu da média de três medidas consecutivas do limiar térmico, em que a resposta de retirada do membro ocorreu. O teste foi realizado em ambos os membros posteriores. Todos os testes foram realizados pela mesma pessoa conforme metodologia de aplicação descrita por Pinheiro Machado Filho et al. (1998). As medidas de limiar térmico de dor foram realizadas em todas as vacas em três períodos distintos, antes do tratamento (T0), 1 dia após o início (T1) e 2 dias após o início do tratamento (T2).

Os dados coletados foram inicialmente submetidos à comparação dos limiares de dor entre os membros posteriores (direito e esquerdo) apenas de vacas com mastite clínica em um único lado da glândula mamária, nos distintos períodos (T0; T1; T2), buscando verificar se há diferenças na sensibilidade à dor com relação ao lado da glândula mamária acometida de mastite. Não ocorrendo diferença significativa na análise anterior, posteriormente, cada medida de limiar realizada nos membros posteriores, direito e esquerdo, de cada uma das vacas foi considerada uma observação, totalizando 14 observações de limiar de dor. Estes dados foram submetidos à análise da variância, comparando o limiar de dor das vacas entre os tratamentos (T0, T1 e T2) através do teste de Tukey. A significância estatística das comparações foi testada na probabilidade de 5% de erro. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software estatístico Biostat 5.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os limiares de dor entre os membros posteriores, direito e esquerdo, não diferiram ( $P > 0,05$ ), independente do lado da glândula mamária em que ocorreu a mastite. No período anterior ao tratamento, apesar da diferença entre limiares nos membros, direito e esquerdo, não ser significativa, nos resultados individualmente percebe-se que alguns animais apresentam um padrão semelhante de resposta do limiar de dor, sendo este menor, ou seja,

maior sensibilidade a dor, no membro do mesmo lado do quarto mamário afetado. Este aspecto é importante de ser salientado, pois a dor além de ser uma experiência individual, é uma resposta biológica que deve ser analisada como tal.

Os limiares térmicos de dor entre os períodos (T0: antes do tratamento; T1: 1 dia após o início do tratamento; T2: 2 dias após o início do tratamento) diferiram significativamente ( $P=0,0163$ ), o que pode ser verificado na Fig.1.

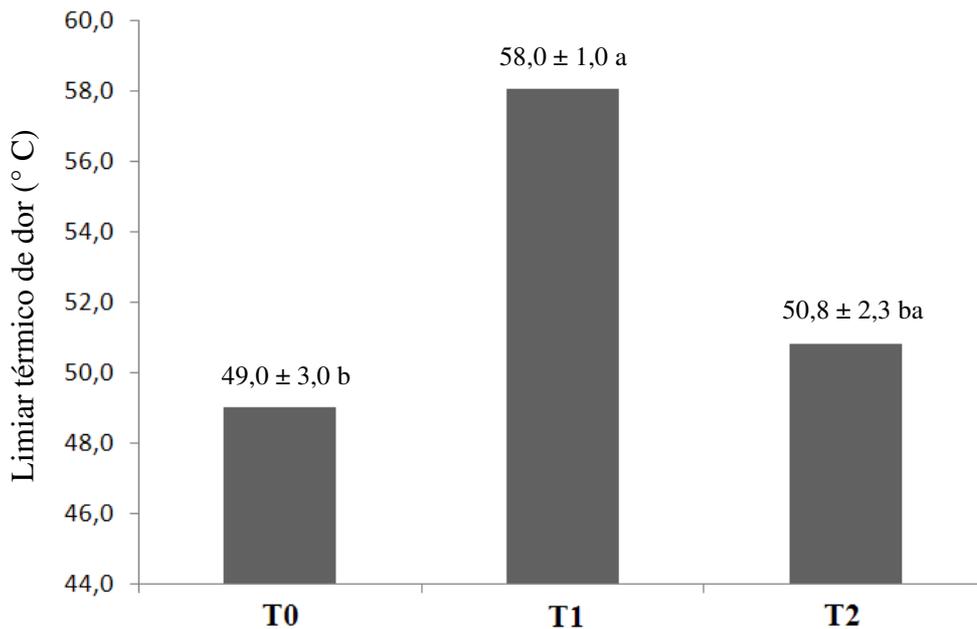


Figura 1. Médias dos limiares de dor em cada um dos três períodos (T0: antes do tratamento; T1: 1 dia após o início do tratamento; T2: 2 dias após o início do tratamento) e respectivos erro padrão. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey ( $P<0,05$ ).

O limiar de dor no período que antecede ao início do tratamento (T0) difere do limiar no primeiro dia após o início do tratamento (T1) e este, por sua vez, não difere do T2 (2 dias após o início do tratamento), conforme Fig.1. No entanto, o T2 também não difere do T0. Estes resultados indicam que o tratamento de casos de mastite clínica com AINE cetoprofeno, em associação com antibiótico, resulta em efeitos benéficos sobre o limiar de dor, reduzindo a sensibilidade à dor no primeiro dia após o início do tratamento. Esta resposta coincide com a atividade clínica do cetoprofeno, no entanto, no segundo dia após o início do tratamento a sensibilidade à dor retornou a um estado de aumento semelhante ao período sem tratamento (T0), mas semelhante também ao primeiro dia após o início do tratamento. Os resultados encontrados são semelhantes aos de Fitzpatrick et al. (1998), em que casos de mastite clínica leve e moderada recebendo tratamento com flunixinina, apresentaram sensibilidade à dor

reduzida um dia após o início do tratamento, quando as vacas foram tratadas com uma única injeção intravenosa do AINE. Os autores sugerem que uma única dose do AINE altera os mecanismos da dor por um tempo curto e indicam que doses repetidas desta droga podem potencialmente manter este efeito benéfico. Entretanto, isto foi testado no presente estudo com o AINE cetoprofeno, não encontrando efeitos significativos sobre o limiar de dor com o prolongamento do tratamento por três (3) dias. Assim, garantidamente, o efeito do AINE cetoprofeno no tratamento da dor associada com mastite clínica em vacas leiteiras indica uma ação analgésica quando administrado por via intramuscular, por pelo menos um dia após o início do tratamento. O uso de drogas antiinflamatórias não-esteróides pode ser útil na redução da hiperalgesia (Fitzpatrick et al., 2006), condição em que o animal responde de maneira exagerada a estímulos dolorosos (Nolan, 2000), como ocorreu neste estudo no período anterior ao início do tratamento (T0). Assim, vacas com mastite clínica são susceptíveis a sentir dor e existe um efeito benéfico dos AINEs em bovinos, como medida para uma redução na hiperalgesia. Contudo, é preciso estudos mais aprofundados para analisar os efeitos dos AINEs sobre as respostas de dor por um período mais longo, com uma sequência de tratamentos, bem como testar a adoção de diferentes dosagens do medicamento.

Na Tab.1 verifica-se maior variação entre os valores de limiares de dor para o T0, em função da maior amplitude e dos maiores valores de coeficiente de variação (CV) e desvio padrão (DP). Já no T1, que apresentou redução significativa na sensibilidade à dor em relação ao T0 (Fig. 1), observa-se que também ocorreu menor variação nos dados, pela menor amplitude e menores DP e CV. No T2, o qual apresentou sensibilidade à dor similar ao T0 e T1 (Fig. 1), verifica-se variação intermediária nas respostas de limiares, entre o T0 e T1, para os valores de amplitude, CV e DP. O CV no T2 foi superior aquele encontrado no T1, mas, ainda, relativamente baixo e inferior ao encontrado no T0.

Assim, vacas com mastite clínica, sem nenhum tratamento apresentam uma variação consideravelmente maior nos valores de limiar de dor. Isto ocorre provavelmente pelo fato da dor ser uma experiência sensorial e emocional individual, a qual varia em sua percepção entre animais. É possível também que o AINE não tenha suprimido a dor totalmente, mas sim, amenizado, o que justificaria uma redução na variação das respostas individuais de limiar de dor no T1 e T2. Pode ser que do primeiro dia de tratamento para o segundo tenha mudado a percepção e/ou sensibilidade a dor nos animais e, por isso, a sensibilidade não continuou diminuindo (maior limiar) e mantendo o mesmo padrão de variação que em T2. Estes aspectos todos podem estar muito relacionados com as respostas individuais.

Tabela 1. Valores máximo e mínimo de limiares de dor para os tratamentos (T0: antes do tratamento; T1: 1 dia após o início do tratamento; T2: 2 dias após o início do tratamento) e seus respectivos coeficientes de variação (CV) e desvio padrão (DP).

	<b>T0</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>
<b>Valor mínimo (°C)</b>	26,1	51,3	38,6
<b>Valor máximo (°C)</b>	63,0	63,0	63,0
<b>CV (%)</b>	23,3	6,6	14,5
<b>DP (°C)</b>	11,4	3,8	7,4

Tendo em vista que o cetoprofeno é um AINE de ação curta, podem ser requeridas várias doses deste medicamento de acordo com a condição do animal (Banting et al., 2008). É possível que no presente estudo, a condição das vacas com mastite clínica seja severa ou ocorra variação na intensidade da doença entre as vacas e por isso fosse necessária uma dose maior do medicamento para estender o efeito analgésico por mais dias. Além disso, a sensação de dor experimentada pela mastite antes de se aplicar o tratamento era elevada, quando tratada com a primeira dose, foi proporcionada uma condição de analgesia a vaca. Já, após dois (2) dias do início do tratamento a sensibilidade à dor voltou a aumentar, provavelmente devido aos animais terem alterado seu mecanismo de percepção da dor relacionada à lesão.

### CONCLUSÕES

O tratamento da dor causada pela mastite, com antiinflamatório não-esteróide cetoprofeno pode ser eficiente. No entanto, é necessária a quantificação da severidade clínica da doença, considerando a variação individual na percepção de dor, bem como a ação analgésica do medicamento em estudo.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, K.L.; SMITH, A.R.; SHANKS, R.D. et al. Efficacy of flunixin meglumine for the treatment of endotoxin-induced bovine mastitis. *Am. J. Vet. Res.*, v. 47, p.1366-1372, 1986.

ATROSHI, F.; PARANTAINEN, J.; SANKARI, S. et al. Changes in inflammation-related blood constituents of mastitic cows. *Vet. Res.*, v.27, p.125-132, 1996.

BANTING, A.; BANTING, S.; HEINONEN, K. et al. Efficacy of oral and parenteral ketoprofen in lactating cows with endotoxin-induced acute mastitis. *Vet. Rec.*, v. 63, p. 506-509, 2008.

BERGH, M.S.; BUDSBERG, S.C. The coxib NSAIDs: potential clinical and pharmacological importance in veterinary medicine. *J. Vet. Intern. Med.*, v.19, p. 633-643, 2005.

BUDSBERG, S. Drogas antiinflamatórias não-esteróides. In: GAYNOR, J.S.; MUIR III, W.W. *Manual de controle da dor em medicina veterinária*. São Paulo: Editora MedVet, 2009. p.183-209.

DIAZ-REVAL, M.L.; VENTURA-MARTINEZ, R.; DÉCIGA-CAMPOS, M.; TERRON, J.A.; CABRÉ, E.; LOPEZ-MUNOZ, E.J. Evidence for a central mechanism of action of S(+) ketoprofen. *Europ. J. Pharm.*, v. 483, p.241-248, 2004.

FIERHELLER, E.E. Reducing pain during painful procedures. *Adv. Dairy Tech.*, v.21, p.129-140, 2009.

FITZPATRICK, J.L.; YOUNG, F.J.; ECKERSALL, D. et al. Recognising and controlling pain and inflammation in mastitis. In: PROCEEDINGS OF BRITISH MASTITIS CONFERENCE, 1998, Stonleigh. *Anais...Stonleigh*: [s.n.] 1998, p. 36-44, 1998.

FITZPATRICK, J.L.; SCOTT, M.; NOLAN, A. Assessment of pain and welfare in sheep. *Small Rum. Res.*, v. 62, p.55-61, 2006.

LADEIRA, S.L.R. Mastite Bovina. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; LEMOS, R.A.A.; BORGES, J.R.J. *Doenças de Ruminantes e eqüídeos*. 3ed. Santa Maria: Palloti, v.1, 2007. p. 359-372.

LANDONI, M.F.; CUNNINGHAM, F.M.; LEES, P. Farmacokinetics and farmacodynamics of ketoprofen in calves applying PK/PD modelling. *J. Vet. Pharmacol.*, v.18, p. 315-324, 1995.

LANGONI, H. *Etiologia da mastite bovina subclínica e clínica: perfil da sensibilidade microbiana, controle e repercussão na produção de leiteira e na saúde pública*. 1995. 200p. Tese (Livre docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

MCDOUGALL, S.; BRYAN, M.A.; TIDDY, R.M. Effect of treatment with the nonsteroidal anti-inflammatory meloxicam on milk production, somatic cell count, probability of re-treatment, and culling of dairy cows with mild clinical mastitis. *J. Dairy Sci.*, v.92, p.4421-4431, 2009.

NOLAN, A.M. Patterns and management of pain in animals. In: MORTON, D. (Ed.), *Pain: its Nature and Management in Man and Animals, International Congress and Symposium Series*. Lord Soulsby of Swaffham Prior, v.246, 2001. p.93-100

PHILPOT, W.; NICKERSON, S.C. Vencendo a luta contra a mastite. São Paulo: Milkbizz, 2002. 188p.

PINHEIRO MACHADO FILHO, L.C.; HURNIK, J.F.; EWING, K.K. A thermal threshold assay to measure the nociceptive response to morphine sulphate in cattle. *Can. J. Vet. Res.*, v. 62, p. 218-223, 1998.

PERSSON, K.; LARSSON, I.; SANDGREN, C.H. Effects of certain inflammatory mediators on bovine neutrophil migration *in vivo* and *in vitro*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.37, p.99-112, 1993.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W.; CONSTABLE, P.D. *Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. Oxford: Saunders, 2007. 2065p.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. *Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite*. São Paulo: Manole, 2007. 314p.

SMITH, G. Supportive therapy of the toxic cows. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, v.21, p.595-614, 2003.

SORDILLO, L.M.; SHAFER-WEAVER, K.; DCROSA, D. Immunobiology of the mammary-gland. *J. Dairy Sci.*, v.80, p. 1851-1865, 1997.

SHPIGEL, N.Y.; CHEN, R.; WINKLER, M. et al. Anti-inflammatory ketoprofen in the treatment of field cases of bovine mastitis. *Res. Vet. Sci.*, v. 56, p. 62-68, 1994.

STOCK, J.L.; SHINJO, K.; BURKHARDT, J. et al. The prostaglandin E2 EP1 receptor mediates pain perception and regulates blood pressure. *J. Clin. Invest.*, v. 107, p. 325-331, 2001.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo da dor em animais de produção é difícil, pois estes não têm a capacidade de expressar com clareza suas sensações e sentimentos, como os humanos, diante de uma situação dolorosa. A linguagem utilizada pelos animais é a corporal, no entanto, muitos não expressam comportamentos de dor, pois isto pode representar uma fraqueza e assim atrair predadores. Além disso, as pesquisas relacionadas à dor em bovinos são incipientes e os indicadores para quantificar a dor experimentada por estes animais, nas diferentes situações dolorosas que podem ocorrer nas unidades produtoras são, na sua maioria, subjetivos. Os indicadores de dor, adotados no presente trabalho revelaram-se apropriados para quantificar dor em bovinos sob condições de afecções da glândula mamária, principalmente, o parâmetro limiar de dor, o qual expressa com clareza a parte sensorial da dor que o animal esta experimentando. Cabe destacar, que a dor tem, além do aspecto sensorial, um caráter emocional atrelado a essa sensação, indicando que cada animal pode sentir a mesma dor de maneira diferente, devido a experiências anteriores e demais aspectos emocionais.

Na atividade leiteira, as principais situações que causam dor aos animais em lactação são as doenças e, entre elas, a mastite. O presente trabalho mostrou que a mastite bovina, quando na sua forma clínica, causa dor em vacas leiteiras, prejudicando o bem-estar do animal e por isso merece uma terapia adequada, com tratamento não só para a infecção, mas também para o processo doloroso em si. O tratamento da dor da mastite clínica adotado neste estudo revelou uma redução na sensação dolorosa, demonstrando que, mesmo a dor sendo uma característica que varia de indivíduo para indivíduo, o seu alívio proporciona ao animal uma sensação de bem-estar.

Este estudo chama a atenção para que a dor em bovinos leiteiros com mastite seja mais estudada, buscando não apenas reconhecê-la, mas também encontrar terapias para tratá-la eficientemente, fazendo com que profissionais e produtores envolvidos na atividade leiteira adotem, sempre que houver dor, um método de aliviá-la. Além disso, a dor não tratada pode trazer efeitos deletérios sobre a capacidade produtiva de toda a vida do animal, sendo necessários estudos que avaliem diferentes doses de medicamentos, adoção de terapias multimodais bem como, os efeitos dos tratamentos por mais de uma lactação em bovinos leiteiros.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, K.L.; SMITH, A.R.; SHANKS, R.D.; DAVIS, L.E.; GUSTAFSSON, B.K. Efficacy of flunixin meglumine for the treatment of endotoxin-induced bovine mastitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, p.1366-1372, 1986.
- ANDERSON, D.E.; MUIR, W.W. Pain Management in Ruminants. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v.21, p.19-31, 2005.
- ARENDT-NIELSEN, L.; CHEN, A.C.N. Lasers and other thermal stimulators for activation of skin nociceptores in humans. **Neurophysiology**, v.33, p. 259-268, 2003.
- ATROSHI, F.; PARANTAINEN, J.; SANKARI, S.; JAERVINEN, M.; LINDBERG, L.A.; SALONIEMI, H. Changes in inflammation-related blood constituents of mastitic cows. **Veterinary Research**, v.27, p.125-132, 1996.
- BANTING, A.; BANTING, S.; HEINONEN, K.; MUSTONEN, K. Efficacy of oral and parenteral ketoprofen in lactating cows with endotoxin-induced acute mastitis. **Veterinary Record**, v. 63, p. 506-509, 2008.
- BARNETT, J.L. Measuring pain in animals. **Australian Veterinary Journal**, v. 75, p.878-879, 1997.
- BAREILLE, N.; BEAUDEAU, F.; BILLON, S.; ROBERT, A.; FAVERDIN, P. Effects of health disorders on feed intake and milk production in dairy cows. **Livestock Production Science**, v.83, p.53-62, 2003.
- BAUMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response. **Today**, v.15, p.74-80, 1994.
- BERGH, M.S.; BUDSBERG, S.C. The coxib NSAIDs: potential clinical and pharmacological importance in veterinary medicine. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.19, p. 633-643, 2005.
- BERRY, E.A.; HILLERTON, J.E.; TORGERSON, P. Use of acute phase proteins in bovine milk. In: PROCEEDINGS OF BRITISH MASTITIS CONFERENCE, 2005, Stoneleigh. **Proceedings...** [s.n.] 2005, p. 25-30.

BILATE, A.M.B. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. **Temas de Reumatologia Clínica**, v.8, n.2, p.47-51, 2007.

BLOWEY, R. W. An assessment of the economic benefits of a mastitis control scheme. **Veterinary Record**, v.119, p. 551-553, 1986.

BRAMLEY, A.J.; CULLOR, J.S.; ERSKINE, R.J.; FOX, I.K.; HARMON, R.J.; HOGAN, J.S.; NICKERSON, S.C.; OLIVER, S.P.; SMITH, K.L.; SORDILLO, I.M. Current concepts of bovine mastitis. In: NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 37, 1996, Madison. **Proceedings...Madison:NMC**, 1996. p.1-3.

BROOM, D. M. Behaviour and welfare in relation to pathology. **Applied Animal Behaviour Science**, v.97, p.73-83, 2006.

BROOM, D.M.; FRASER, A.F. **Comportamento e bem-estar de animais domésticos**. 4.ed. São Paulo: Manole, 2010. 438 p.

BUDSBERG, S. Drogas anti-inflamatórias não-esteróides. In: GAYNOR, J.S.; MUIR III, W. **Manual de Controle da dor em Medicina Veterinária**. São Paulo: Editora MedVet, 2009, p.183-209.

CHAMBERS, J.P.; LIVINGSTON, A.; WATERMAN, A.E. A device for testing nociceptive thresholds in horses. **Journal of the Association of Veterinary Anaesthetists**, v.17, p.42-44, 1990.

CLEMENTS, A.C.A.; MELLOR, D.J.; FITZPATRICK, J.L. Reporting of sheep lameness conditions to veterinarians in the Scottish Borders. **The Veterinary Record**, v.150, p.815-817, 2001.

CODERRE, T.J.; MELZACK, R. Cutaneous hyperalgesia: contributions of the peripheral and central nervous systems to the increase in pain sensitivity after injury. **Brain Research**, v.404, p.95-106, 1987.

CODERRE, T.J.; VACCARINO, A.L.; MELZACK, R. Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. **Brain Research**, v.535, p.155-158, 1990.

COENTRÃO, C.M.; SOUZA, G.N.; BRITO, J.R.F.; PAIVA e BRITO, M.A.V.; LILENBAUM, W. Fatores de risco para mastite subclínica em vacas leiteiras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.2, p.283-288, 2008.

COFFEY, E.M.; VINSON, W.E; PEARSON, R.E. Potential of somatic cell concentration in milk as a sire selection criterion to reduce mastitis in dairy cattle. **Journal Dairy Science**, v.69, n.8, p.2163-2172, 1986.

COLLA, M.F.; VALLE, S.F.; SECCHI, P. et al. Plasma haptoglobina values in cows with different somatic cell counting in milk samples. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, p. 944-949, 2011.

COSTA, E.O.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T.; SILVA, J.A.B.; GARINO JUNIOR, F.; BENITES, N.R.; HORIUTI, A.M. Mastite subclínica: prejuízos causados e os custos de prevenção em propriedades leiteiras. **Revista do Napgama**, v.2, n.2, p.16-20, 1999.

CRUZ, C.E.F.; RAYMUNDO, D.L.; CERVA, C.; PAVARINI, S.P.; DALTO, A.E.C.; CORBELLINI, L.G.; DRIEMEIER, D. Records of performance and sanitary status from a dairy cattle herd in southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.1., p.1-9., 2011.

CULLOR, J.S. The control, treatment and prevention of the various types of bovine mastitis. **Veterinary Medicine Food-Animal Practice**, p. 571-579, 1993.

CULLOR, J.S.; TYLER, J.W.; SMITH, B.P. Distúrbios da glândula mamária. In: SMITH, B.P. **Tratado de Medicina Interna dos Grandes Animais**. São Paulo, v.2, 1994. p.1041-1060.

DANBURY, T.C.; WEEKS, C.A.; CHAMBERS, J.P.; WATERMAN-PEARSON, A.E.; KESTIN, S.C. Self-selection of the analgesic drug carprofen by lame broiler chickens. **Veterinary Record**, v.146, p.307-311, 2000.

DIAZ-REVAL, M.L.; VENTURA-MARTINEZ, R.; DÉCIGA-CAMPOS, M.; TERRON, J.A.; CABRÉ, E.; LOPEZ-MUNOZ, E.J. Evidence for a central mechanism of action of S(+) ketoprofen. **European Journal of Pharmacology**, v. 483, p.241-248, 2004.

DOMINGUES, P.F. **Controle da Produção Leiteira na Mastite Bovina Subclínica**. 1993. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, SP.

DUNCAN, I. J. H.; FRASER, D. Understanding animal welfare. In: APPLEBY, M. C.; HUGHES, B.O. **Animal Welfare**. Wallingford: CAB International, p.19-31. 1997.

ECKERSALL, P.D.; YOUNG, F.J.; MCCOMB, C.; HOGARTH, C.J.; SAFI, S.; FITZPATRICK, J.L.; NOLAN, A.M.; WEBER, A.; McDONALD, T. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. **Veterinary Record**, v.148, p.35-41, 2001.

ECKERSALL, P.D.; YOUNG, F.J.; NOLAN, A.M.; KNIGHT, C.H.; MCCOMB, C.; WATERSTON, M.M. HOGARTH, C.J.; SCOTT, E.M.; FITZPATRICK, J.L. Acute phase proteins in bovine milk in an experimental model of *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.1488-1501, 2006.

ELSON, E.C. Quantitative determination of serum haptoglobin. A simple and rapid method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.62, n.5, p. 655-663, 1974.

FITZPATRICK, J.L.; YOUNG, F.J.; ECKERSALL, D.; LOGUE, D.N.; KNIGHT, C.J.; NOLAN, A. Recognising and controlling pain and inflammation in mastitis. In: PROCEEDINGS OF BRITISH MASTITIS CONFERENCE, 1998, Stonoleigh. **Proceedings...**Stonoleigh: [s.n.] 1998, p. 36-44.

FITZPATRICK, J.L.; SCOTT, M.; NOLAN, A. Assessment of pain and welfare in sheep. **Small Ruminant Research**, v.62, p.55-61, 2006.

FIERHELLER, E.E. Reducing pain during painful procedures. **Advances in Dairy Technology**, v.21, p.129-140, 2009.

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

FRASER, A.F. (Ed.). **World Animal Science**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1985. 500 p.

FRASER, D.; MATTHEWS, L. Preference and motivation testing. In: APPLEBY, M. C.; HUGHES, B. O. **Animal Welfare**. Wallingford: CAB International, p.159-173, 1997.

GAYNOR, J.S.; MUIR, W.W. **Manual de controle da dor em medicina veterinária**. 2. ed., São Paulo: MedVet, 2009. 643p.

GEORGE, L. W. Pain Control in Food Animals. In: STEFFEY, E. P. **Recent Advances in Anesthetic Management of Large Domestic Animals**. Ithaca, New York, International Veterinary Information Service, 2003.

GIRAUDO, J.A.; CALZOLARI, A.; RAMPONE, H.; RAMPONE, A.; GIRAUDO, A. T.; BOGNI, C.; LARRIESTRA, A.; NAGEL, R. Field trials of vaccine against bovine mastitis.1. Evaluation in heifers. **Journal of Dairy Science**, v.80, p. 845-853, 1997.

GRANDIN, T. Assessment of stress during handling and transport. **Journal of Animal Science**, v.75, p.249-257, 1997.

GREGORY, N. **Physiology and behavior of animal suffering**. Oxford: Blackwell, 2004.

GRISNEAUX, E.; PIBAROT, P.; DUPUIS, J.; BLAIS, D. Comparison of ketoprofen ad carprofen administered prior to orthopedic surgery for control f postoperative pain in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.215, p.1105-1110, 1999.

GRØNDAHL-NIELSEN, C.; SIMONSEN, H.B.; DAMKJER LUND, J.; HESSELHOLT, M. Behavioral, endocrine and cardiac responses in young calves undergoing with or without the use of sedation and analgesia. **Veterinary Journal**, v.158, p.14-20, 1999.

HAYES, M.A. Functions of cytokines and acute phase proteins inflammation. In: Vllth CONGRESS OF THE ICACB, 1994, Canadá. **Proceedings...**Canadá: VI ICACB, p.1-7, 1994.

HELLYER, P.W.; ROBERTSON, S.A.; FAILS, A.D. Pain and its management. In: TRANQUILLI, W.J.; THURMON, J.C.; GRIMN, K.A (Ed.). **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**. 4 ed. Iowa: Blackwell Publishing, p. 31-57, 2007.

HELLEBREKERS, L.J. **Dor em animais**. 1.ed.São Paulo: Manole, 2002. 166p.

HORADAGODA, N.U.; KNOX, K.M.G.; GIBBS, H.A.; REID, S.W.J.; HORAGODA, A.; EDWARDS, S.E.R.; ECKERSALL, P.D. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. **Veterinary Record**, v. 144, p.437-441, 1999.

HUGONNARD, M.; LEBLOND, A.; KEROACK, S.; CADORE, J.; TRONEY, E. Attitudes and concerns of French veterinarians towards pain and analgesia in dogs and cats. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v.31, p. 154-163, 2004.

HOUPT, K.A. Fisiologia do Comportamento. In: DUKES, O.R. (Ed). **Fisiologia dos Animais Domésticos**. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p.887-896.

HUMBLET, M.F.; GUYOT, H.; BOUDRY, B.; MBAYAH, F.; HANZEN, C.; ROLLIN, F.; GODEAU, J.M. Relationship between haptoglobina, serum amyloid A, and clinical status in a survey of dairy herds during a 6-month period. **Veterinary Clinical Pathology**, v.35, n.2, p.188-193, 2006.

HUXLEY, J.N.; WHAY, H.R. Current attitudes of cattle practitioners to pain and the use of analgesics in cattle. **The Veterinary Record**, v.159, p.662-668, 2006.

IASP. The need of a taxonomy. **Pain**, v.6, p.247-252, 1979.

JAMES, K. Cellular and Humoral Mediators of Inflammation: Nonspecific Humoral Response to Inflammation. In: MCCLATCHEY, K.D. **Clinical Laboratory Medicine**. 2 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002.

JI, R. R.; WOOLF, C.J. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. **Neurobiology of Disease**, v.8 p.1–10, 2001.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v.413, p.203-210, 2001.

KEELING, L.; JENSEN, P. Behavioural disturbances, stress and welfare. In: JENSEN, P. (Ed). **The Ethology of domestic animals**. UK: CABI Publishing, 2002, p.79-98.

KEMP, M.H.; NOLAN, A.M.; CRIPPS, P.J.; FITZPATRICK, J.L. Animal-based measurements of the severity of mastitis in dairy cows. **Veterinary Record**, v.163, p.175-179, 2008.

KENT, J.E.; MOLONY, V.; ROBERTSON, I.S. Changes in plasma cortisol concentration in lambs of three ages after three methods of castration and tail docking. **Research Veterinary Science**, v.55, p.245-251, 1993.

KUSHNER, I. The phenomenon of the acute phase response. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.389, p.39-48, 1982.

LADEIRA, S.R.L. Mastite bovina. In: RIET-CORREA, F.; SHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.C. **Doenças em ruminantes e equinos**. Pelotas: Universitária/UFPel, 1998, p.248-260.

LADEIRA, S.L.R. Mastite Bovina. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; LEMOS, R.A.A.; BORGES, J.R.J. **Doenças de Ruminantes e eqüídeos**. 3ed. Santa Maria: Palloti, v.1, 2007. p. 359-372.

LAMONT, L.  $\alpha_2$ - agonistas. In: GAYNOR, J.S.; MUIR III, W. **Manual de Controle da dor em Medicina Veterinária**. São Paulo: Editora MedVet, 2009. p.210-230.

LANDONI, M.F.; CUNNINGHAM, F.M.; LEES, P. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ketoprofen in calves applying PK/PD modelling. **Journal of Veterinary Pharmacology**, v.18, p. 315-324, 1995.

LANGONI, H. **Etiologia da mastite bovina subclínica e clínica: perfil da sensibilidade microbiana, controle e repercussão na produção de leiteira e na saúde pública**. 1995. 200p. Tese (Livre docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

LERCHE, P.; MUIR III, W.W. Controle da dor em eqüinos e bovinos. In: GAYNOR, J.S.; MUIR III, W. **Manual de Controle da dor em Medicina Veterinária**. São Paulo: Editora MedVet, 2009. p.437-466.

LEY, S.J.; WATERMAN, A.E.; LIVINGSTON, A. A field study of the effect of lameness on mechanical nociceptive thresholds in sheep. **Veterinary Record**, v.137, p. 85-87, 1995.

LUNA, S.P.L. Dor, seniência e bem-estar em animais. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.11, n.1, p.17-21, 2008.

MAMA, K.R. Anestésicos locais. In: GAYNOR, J.S.; MUIR III, W. **Manual de Controle da dor em Medicina Veterinária**. São Paulo: Editora MedVet, 2009. p.231-248.

MARQUES, L.T.; BALBINOTTI, M.; FISCHER, V. Influência dos sistemas de resfriamento na composição físico-química e microbiológica do leite na bacia leiteira de Santa Vitória do Palmar. In: 39ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2002, Recife. **Anais do...Recife: SBZ**, 2002.

MCDougall, S.; BRYAN, M.A.; TIDDY, R.M. Effect of treatment with the nonsteroidal anti-inflammatory meloxicam on milk production, somatic cell count, probability of re-treatment, and culling of dairy cows with mild clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.4421-4431, 2009.

MOLONY, V.; KENT, E. Assessment of acute pain in farm animals using behavioral and physiological measurements. **Journal of Animal Science**, v.75, p.266-272, 1997.

MUIR III, W. Fisiologia e fisiopatologia da dor. In: GAYNOR, J.S.; MUIR III, W. **Manual de Controle da dor em Medicina Veterinária**. São Paulo: Editora MedVet, 2009. p.13-41.

MUIR III, W. Drogas utilizadas para tratar a dor. In: GAYNOR, J.S.; MUIR III, W. **Manual de Controle da dor em Medicina Veterinária**. São Paulo: Editora MedVet, 2009. p.141-162.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **Veterinary Journal**, v.168, p.24-40, 2004.

NETO, N.S.R.; CARVALHO, J.F. O uso de provas de atividade inflamatória em reumatologia. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.49, n.4, p.413-430, 2009.

NOLAN, A.; LIVINGSTON, A.; MORRIS, R.; WATERMAN, A. Techniques for comparison of thermal and mechanical nociceptive stimuli in the sheep. **Journal Pharmacology Methods**, v.17, p.39-49, 1987.

NOLAN, A.M. Patterns and management of pain in animals. In: MORTON, D. (Ed.), **Pain: its Nature and Management in Man and Animals**, International Congress and Symposium Series. Lord Soulsby of Swaffham Prior,. Royal Society of Medicine Press, v.246, p.93-100, 2000.

NORO, G.; GONZÁLEZ, F.H.D.; CAMPOS, R.; DÜRR, J.W. Fatores ambientais que afetam a produção e a composição do leite em rebanhos assistidos por cooperativas no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n.3, p.1129-1135, 2006.

O'CALLAGHAN, K. Lameness and associated pain in cattle challenging traditional perceptions. **In Practice**, v.24, p.212-219, 2002.

OLIVEIRA, C.M.C.; SOUSA, M.G.S.; SILVA, N.S.; MENDONÇA, C.L.; SILVEIRA, J.A.S; OAIGEN, R.P.; ANDRADE, S.J.T.; BARBOSA, J.D. Prevalência e etiologia da mastite bovina em rebanhos leiteiros na região de Rondon do Pará, estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.2, p.104-110, 2011.

PELEGRINO, R.C.; MELLO, F.C.; AMARAL, G.A.C. Mastite em vacas leiteiras. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.10, 2008.

PETERS, M.D.P.; BARBOSA SILVEIRA, I.D.; PINHEIRO MACHADO FILHO, L.C.; MACHADO, A.A.; PEREIRA, L.M.R. Manejo aversivo em bovinos leiteiros e efeitos no bem-estar, comportamento e aspectos produtivos. **Archivos de Zootecnia**, v.59, p.435-442, 2010.

PERSSON, K.; LARSSON, I.; SANDGREN, C.H. Effects of certain inflammatory mediators on bovine neutrophil migration *in vivo* and *in vitro*. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.37, p.99-112, 1993.

PETERSEN, H.H.; NIELSEN, J.P.; HEEGAARD, P.M. H. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary Research**, v.35, p.163-187, 2004.

PHILLIPS, C.J.C. **Cattle Behaviour**. UK: Farming Press, 1993, 212p.

PHILPOT, W.; NICKERSON, S.C. **Vencendo a luta contra a mastite**. São Paulo: Milkbuzz, 2002. 188p.

PINHEIRO MACHADO FILHO, L.C.; HURNIK, J.F.; EWING, K.K. A thermal threshold assay to measure the nociceptive response to morphine sulphate in cattle. **Canadian Journal Veterinary Research**, v.62, p. 218-223, 1998.

POTTER, L.; MCCARTHY, C.; OLDHAM, J. Algometer reliability in measuring pain pressure threshold over normal spinal muscles to allow quantification of anti-nociceptive treatment effects. **International Journal of Osteopathic Medicine**, v.9, p. 113-119, 2006.

PRESTES, D.S.; FILAPPI, A.; CECIM, M. Susceptibilidade à mastite: fatores que a influenciam-uma revisão. **Revista da FZVA Uruguaiana**, v.9, n.1, p.118-132, 2002.

PRYCE, J. E.; ESSLEMONT, R. J.; THOMPSON, R.; VEERKAMP, R. F.; KOSSAIBATI, M. A.; SIMM, G. Estimation of genetic parameters using health, fertility and production data from a management recording system for dairy cattle. **Animal Science**, v.66, p.577-584, 1998.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. 1 ed. Porto Alegre: ArtMed, 2005, 512p.

RADOSTITS, O.M.; BLOOD, D.C.; GAY, C.C. **Clínica veterinária: Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 1737p.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W.; CONSTABLE, P.D. **Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses**. 10 ed. Oxford: Saunders, 2007. 2065p.

RIBEIRO, M.E.R.; GOMES, J.F.; STUMPF JR., W.; GONZALEZ, H.L.; AITA, M.F. Manejo de ordenha e mastite. In: BITENCOURT, D.; PEGORARO, L.M.C.; GOMES, J.F. et al. **Sistemas de Pecuária de leite: uma visão na região de Clima Temperado**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2000. p.133-174.

RIBEIRO, M.E.R.; PETRINI, L.A.; AITA, M.; BALBINOTTI, M.; STUMPF JR, W.; GOMES, J.F.; SCHRAMM, R.C.; MARTINS, P.R.; BARBOSA, R.S. Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteira na região sul do Rio Grande do Sul. **Revista Agrociência**, Pelotas, v.9, n.3. p. 187-206, 2003.

RIBEIRO, M.G.; GERALDO, J.S.; LANGONI, H.; LARA, G.H.B.; SIQUEIRA, A.K.; SALERNO, T.; FERNANDES, M.C. Microorganismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico.

**Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.1, p.52-58, 2009.

ROLLIN, B. A ética do controle da dor em animais de companhia. In: HELLEBREKERS, L.J. **Dor em animais**. Ed. Manole Ltda, 1ª edição. São Paulo, 2002. p 17-35.

RUEGG, P. Contagem de células somáticas como ferramenta para avaliação, controle e tratamento de mastite. In: **V Curso “Novos enfoques na produção e reprodução de bovinos”**, UNESP-Botucatu – Uberlândia-MG, 2001.

RUPP, R.; BEAUDEAU, F.; BOICHARD, D. Relationship between milk somatic-cell counts in the first lactation and clinical mastitis occurrence in the second lactation of French Holstein cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v.46, p.99-111, 2000.

RUPP, R.; BOICHARD, D. Relationship of early first lactation somatic cell count with risk of subsequent first clinical mastitis. **Livestock Production Science**, v.62, n.2, p.169-180, 2000.

RUSHEN, J. Aversion of sheep to electro-immobilization and physical restraint. **Applied Animal Behaviour Science**, v.15, p.315-324, 1986.

RUSHEN, J.; DE PASSILLE, A. M. B.; MUNKSGAARD, L. Fear of people by cows and effects on milk yield, behavior, and heart rate at milking. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 4, p. 720-727, 1999.

RUSHEN, J.; DE PASSILÉ, A.M.; VON KEYSERLINGK, M.A.G; WEARY, D.M. **The Welfare of cattle**. The Netherlands: Springer, volume 5, 2008.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. 1.ed. Barueri: Manole, 2007, 314p.

SAS Institute INC., SAS Technical Report. Release 8.01 TS Level 01MO. Cary: NC, USA. 2001.

SCHALM, W.; JAIN, N. C.; CARROLL, E.J. **Hematología veterinaria**. Buenos Aires, 1981, 856 p.

SHORT, C.E. Fundamentals of pain perception in animals. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 59, p. 125-33, 1998.

SHORT, C.E. The management of animal pain. Where have we been, where are now and where are we going? **The Veterinary Journal**, v.165, p. 101-103, 2003.

SHPIGEL, N.Y.; CHEN, R.; WINKLER, M.; SARAN, A.; ZIV, G.; LONGO, F. Anti-inflammatory ketoprofen in the treatment of field cases of bovine mastitis. **Research Veterinary Science**, v.56, p.62-68, 1994.

SIIVONEN, J.; TAPONEN, S.; HOVINEN, M.; PASTELL, M.; LENSINK, B.J.; PYÖRÄLÄ, S.; HÄNNINEN, L. Impact of acute clinical mastitis on cow behavior. **Applied Animal Behaviour Science**, v.132, p.101-106, 2011.

SMITH, G. Supportive therapy of the toxic cows. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.21, p.595-614, 2003.

SOUZA, L.F.L. **Atividade antimicrobiana de extratos de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) frente a bactérias relacionadas à mastite bovina**. 2011. 62 f. Monografia (Medicina Veterinária) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília.

SORDILLO, L.M.; SHAFER-WEAVER, K.; ROSA, D. Immunobiology of mammary gland. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.80, p.1851-1865, 1997.

STEWART, M.; STAFFORD, K.J.; DOWLING, S.K.; SCHAEFER, A.L.; WEBSTER, J.R. Eye temperature and heart rate variability of calves disbudded with or without local anaesthetic. **Physiology & Behavior**, v.93, p. 789-97, 2008.

STILWELL, G.T. **Pain evaluation and control after routine interventions in cattle**. 2009. 203f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)- Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

STOCK, J.L.; SHINJO, K.; BURKHARDT, J.; ROACH, M.; TANIGUCHI, K.; ISHIKAWA, T.; KIM, H.; FLANNERY, P.J.; COFFMAN, T.M.; McNEISH, J.D.; AUDOLY, L.P. The prostaglandin E2 EP1 receptor mediates pain perception and regulates blood pressure. **Journal of Clinical Investigation**, v. 107, p. 325-331, 2001.

STUBSJØEN, S.M.; FLO, A.S.; MOE, R.O.; JANCZAK, A.M.; SKJERVE, E.; VALLE, P.S.; ZANELLA, A.J. Exploring non-invasive methods to assess pain in sheep. **Physiology & Behavior**, v. 98, p. 640-648, 2009.

STUBSJØEN, S.M.; VALLE, P.S.; ZANELLA, A.J. The use of a hand-held algometer as a method to measure mechanical nociceptive thresholds in sheep. **Animal Welfare**, v.19, n. 1, p.31-36, 2010.

TABRIZI, A.D.; BATAVANI, R.A.; ASRI REZAEI, S.; AHMADI, M. Fibrinogen and ceruloplasmin in plasma and milk from dairy cows with subclinical and clinical mastitis. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Faisalabad, v.15, p.571-576, 2008.

URIBE, H.A.; KENNEDY, B.W.; MARTIN, S.W.; KELTON, D.F. Genetic parameters for common health disorders of Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.78, p.421-430, 1995.

VEISSER, I.; RUSHEN, J.; COLWELL, D.; DE PASSILLÉ, A.M. A laser-based method for measuring thermal nociception of cattle. **Applied Animal Behaviour Science**, v.66, p.289-304, 2000.

VIÑUELA-FERNÁNDEZ, I.; JONES, E.; WELSH, E.M.; FLEETWOOD-WALKER, S.M. Pain mechanisms and their implication for the management of pain in farm and companion animals. **The Veterinary Journal**, v. 174, p. 227-239, 2007.

VON BORELL, E.; LANGBEIN, J.; DESPRÉS, G.; HANSEN, S.; LETERRIER, C.; MARCHANT-FORDE, J.; MARCHANT-FORDE RUTH.; MINERO, M.; MOHR, E.; PRUNIER, A.; VALANCE, D.; VEISSER, I. Heart rate variability as a measure of autonomic regulation of cardiac activity for assessing stress and welfare in farm animals- a review. **Physiology & Behavior**, v.92, p.293-316, 2007.

WAGNER, A.E. Opióides. In: GAYNOR, J.S.; MUIR III, W. **Manual de Controle da dor em Medicina Veterinária**. São Paulo: Editora MedVet, 2009. p.163-182.

WATANABE, E.T. **Avaliação do uso de antibióticos por via intramamária e sistêmica no tratamento de mastite clínica em vacas em lactação e subclínica na interrupção da lactação**. 1999. 122f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, SP.

WEARY, D.M.; NIEL, L.; FLOWER, F.C.; FRASER, D. Identifying and preventing pain in animals. **Applied Animal Behaviour Science**, v.100, p.64-76, 2006.

WELLS, S. J.; OTT, S. L.; HILLBERG SEITZINGER, A. Key health issues for dairy cattle – new and old. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.3029–3035, 1998.

ZAFALON, L.F.; NADER-FILHO, A.; OLIVEIRA, J.V.; RESENDE, F.D. Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custo benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.3. p. 577-585, 2007.