

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Silvana Giacomini Collet

**EFEITO DO USO DE MINERAIS TRAÇOS E VITAMINAS A e
E NA SAÚDE DE VACAS HOLANDESAS NO PERÍODO DE
TRANSIÇÃO**

Santa Maria, RS
2018

Silvana Giacomini Collet

**EFEITO DO USO DE MINERAIS TRAÇOS E VITAMINAS A e E NA SAÚDE DE
VACAS HOLANDESAS NO PERÍODO DE TRANSIÇÃO**

**Tese apresentada ao Curso de Doutorado do
Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária, Área de Concentração em
Cirurgia e Clínica Veterinária, da
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,
RS), como requisito parcial para obtenção de
grau de Doutor em Medicina Veterinária.**

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Marta Lizandra do Rego Leal

Santa Maria, RS
2018

Collet, Silvana Giacomini

EFEITO DO USO DE MINERAIS TRAÇOS E VITAMINAS A e E NA
SAÚDE DE VACAS HOLANDESAS NO PERÍODO DE TRANSIÇÃO /
Silvana Giacomini Collet.- 2018.

70 p.; 30 cm

Orientador: Marta Lizandra do do Rego Leal
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2018

1. vacas holandesas 2. período de transição 3. minerais
traços 4. vitamina A 5. vitamina E I. do Rego Leal, Marta
Lizandra do II. Título.

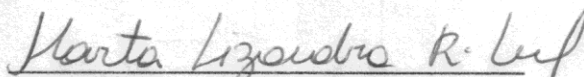
Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Silvana Giacomini Collet

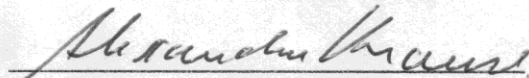
**EFEITO DO USO DE MINERAIS TRAÇOS E VITAMINAS A e E NA SAÚDE
DE VACAS HOLANDESES NO PERÍODO DE TRANSIÇÃO**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Cirurgia e Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção de grau de **Doutor em Medicina Veterinária**.

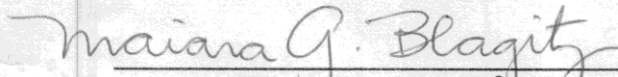
Aprovado em 29 de junho de 2018:



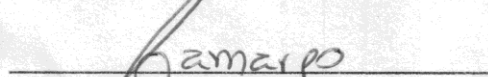
Marta Lizandra do Rego Leal, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



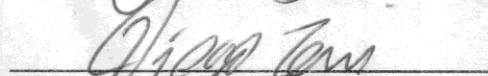
Alexandre Krause, Dr. (UFSM)



Maiara Garcia Blagitz, Dr^a (UFFS)



Emmanuel Veiga de Camargo, Dr. (IFFar)



Diego Zeni, Dr. (IFFar)

Santa Maria, RS
2018

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a meu filho Vicente Giacomini Collet, para que sempre se orgulhe de seus pais.

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas fizeram parte dessa caminhada...

Agradeço a Deus por iluminar meus passos e por ser tão generoso. Agradeço por ter colocado sempre pessoas maravilhosas em minha vida, e principalmente por ter me dado uma família maravilhosa, a qual é a minha estrutura. Sem ela nada disso seria possível!

Agradeço meus queridos pais, Enio e Faizinha Fátima Giacomini, meus irmãos Sandra e Marcos pelo amor e ajuda de todas as formas. Meu marido José Luiz e meu amado filho Vicente pelo amor, compreensão e pela família que formamos, a qual é maior que tudo. Os dois fazem parte disso tudo, , estiveram juntos nas coletas, nas viagens e conviveram com minha ausência em muitos momentos, para esse trabalho estivesse concluído. Serei eternamente grata a meu marido pela paciência e companheirismo! Agradeço também meu cunhado Alessandro e minhas lindas sobrinhas Laura e Alice por todo o carinho. Agradeço imensamente a todas as famílias Fardo, Faitta e Collet, que são minha família, por todo carinho, incentivo e amor.

Tenho que agradecer a cada professor, desde a graduação, mestrado e, claro, no doutorado, pois contribuiu para minha formação e são hoje grandes exemplos. Nesse sentido, agradeço a Professora Marta Lizandra do Rêgo Leal, pelo acolhimento no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria. Tenho sempre que agradecer a ela por toda a compreensão ao longo do caminho. Além dela, uma grande mestre e hoje minha amiga, Maiara Garcia Blagitz, pois dela partiu o incentivo dessa caminhada no doutorado. Nada disso teria acontecido sem vocês duas. Seremos parceiras para toda a vida! Contem comigo. Agradeço a querida Michele dos Santos, sua aluna, pela parceria!

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de aprendizado e a todos os funcionários pelo apoio, especialmente a Secretária Maria, por todo o auxílio. Agradeço meus colegas de pós-graduação, em especial a Valeska Paula Casanova que é uma grande amiga e parceira, e a Cláudia Medeiros Rodrigues. Aos estagiários da Clínica de Grandes Animais da Universidade Federal de Santa Maria pela ajuda em vários momentos, em especial a Alexia Pretto.

Agradeço enormemente a Universidade do Oeste de Santa Catarina, Unoesc Xanxerê. Dela faço parte como docente e dela partiu o apoio financeiro através de verba concedida em edital específico. São muitas as que agradecer. Em nome dos Professores Genésio Téo, Vice-Reitor do Campus de Xanxerê, Cláudio Luiz Orço, Diretor de Graduação da Unoesc

Xanxerê, Marcieli Maccari, Diretora de Pesquisa, Extensão e Pós Graduação da Unoesc Xanxerê, e Realdo Tavares dos Santos, Coordenador Administrativo do curso de Medicina Veterinária da Unoesc Xanxerê, agradeço a todos os colegas pela confiança, companheirismo e amizade. Ainda preciso agradecer aos queridos alunos da UNOESC: José Augusto Ferronato, Thaís Caroline Ferronato, Mateus Alan Demeda, Michèli Cristina Carpeggiani, Letícia Taffarel, Gustavo Tafferal, Louise Schaedler, Marina Gheller, Talita Valentini, Vinícius Scapini e Ana Marquezzan. Vocês foram parceiros maravilhosos! Todos crescemos juntos!

Tenho agradecimentos especiais a fazer à família Taffarel de Faxinal dos Guedes, por ceder a propriedade e animais para o projeto e me auxiliar em todos os momentos: Vilson, Vera, Gustavo e Letícia, serei eternamente grata pela gentileza e carinho que sempre tiveram por mim. Também tenho uma imensa gratidão ao Colégio Agrícola La Salle, em Xanxerê, por também ceder a propriedade e animais para o projeto. Em especial ao Mateus Alan Demeda e Leonardo Seraglio e seus alunos no setor de bovinocultura de leite, que foram fundamentais para a realização deste estudo.

Outra pessoa especial neste projeto foi a Rejane Santos Souza, do Laboratório de Doenças Metabólicas ou Nutricionais, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – FMVZ-USP. Sem a sua participação nada disso teria acontecido. Além dela, agradecimentos se estendem ao Professor Enrico Lippi Ortolani, nosso grande parceiro.

De maneira especial e carinhosa, quero agradecer aos Professores André Thaler Neto e Henrique Mendonça Nunes Ribeiro Filho, pelos ensinamentos e auxílio. São grandes exemplos para mim! Obrigada! Obrigada! Obrigada!

Enfim, são tantas pessoas a agradecer, que faltaria espaço. Obrigada a todos, que de alguma forma, contribuiu para esse trabalho, e acima de tudo para meu crescimento pessoal e profissional. Aos anjos que estão em nossa vida para torná-la mais fácil, divertida e compreensível.

RESUMO

EFEITO DO USO DE MINERAIS TRAÇOS E VITAMINAS A e E NA SAÚDE DE VACAS HOLANDEAS NO PERÍODO DE TRANSIÇÃO

AUTORA: Silvana Giacomini Collet
ORIENTADORA: Marta Lizandra do Rego Leal

O período de transição em vacas leiteiras é o mais crítico em relação à saúde, pois causa grande impacto no metabolismo, imunidade e produção desses animais. Alguns microminerais e vitaminas podem melhorar a resposta imune de animais de produção frente às doenças e situações estressantes. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar o uso de minerais traços e vitaminas A e E, na forma injetável em parâmetros do perfil energético e estresse oxidativo de vacas holandesas em período de transição. Sessenta animais foram divididos em dois grupos: suplementados com minerais traços e vitaminas (GMTV) (n=30) e Controle (GC) (n=30). A suplementação mineral e vitamínica foi realizada por via subcutânea, com cinco ml do produto contendo 10 mg/ml de cobre (como edetato), 40 mg/ml de zinco (como edetato), 10 mg/ml de manganês (como edetato) e 5 mg/ml de selênio (como selenito de sódio) e cinco ml do produto contendo 35 mg/ml de vitamina A (como palmitato) e 50 mg/ml de vitamina E (como acetato). As coletas das amostras de sangue foram realizadas 21 dias pré-parto, 14 pré-parto, sete dias pré-parto, dia do parto, sete dias após o parto, 14 dias após o parto e 21 dias após o parto. No primeiro estudo o objetivo foi avaliar parâmetros do estresse oxidativo e função de neutrófilos em fêmeas da raça holandesa no período de transição. Observou-se diferença significativa entre tratamento X dia para os valores da SOD, com maior atividade dessa enzima em fêmeas GMTV, nas semanas próximas ao parto. Observou-se diferença significativa de dia e tratamento X dia para TBARS, onde fêmeas GMTV mostraram menores valores de TBARS em todos os momentos, exceto sete dias após o parto. Houve efeito significativo de dia para leucócitos, tratamento X dia para neutrófilos, e para fagocitose de neutrófilos, onde as fêmeas GMTV apresentaram valores menores de leucócitos e neutrófilos próximos ao parto, além de maior fagocitose de neutrófilos. No segundo estudo o objetivo foi avaliar o efeito da suplementação sobre parâmetros bioquímicos e hormonais em vacas holandesas no período de transição. Observou-se apenas diferença de dia entre os momentos experimentais dentro dos grupos GMTV e GC. Os valores de AGNES foram maiores no dia do parto, e o de BHBA teve valores crescentes após o parto, alcançando o pico na terceira semana de lactação. A frutossamina apresentou valores crescentes até o dia do parto, com maiores concentrações neste momento experimental. Maiores teores de HDL foram detectados 21 dias após o parto. Os triglicérides mantiveram-se com valores altos no período pré-parto, porém apresentaram redução brusca no dia do parto, mantendo valores mais baixos após o parto. Menores concentrações de cálcio foram observadas no dia do parto, assim como o IGF-1. Os valores de insulina e cortisol foram mais elevados no dia do parto. Em conclusão, animais com dietas adequadas e moderada produção leiteira apresentam pouca resposta ao uso de determinados microminerais e vitaminas, mas pode-se perceber melhora na atividade da SOD e atividade de neutrófilos em animais GMTV. Isso reforça a ligação entre minerais traços e vitaminas ao sistema imune de bovinos, especialmente no período de transição, o qual está ligado à diminuída resposta imune.

Palavras-chave: vacas holandesas; período de transição; minerais traços; vitamina A; vitamina E.

ABSTRACT

EFFECT OF THE USE OF TRACE MINERALS AND VITAMINS A AND E ON THE HEALTH OF HOLSTEIN COWS IN TRANSITION PERIOD

AUTHOR: Silvana Giacomini Collet
ADVISOR: Marta Lizandra do Rego Leal

The transition period is the most critical dairy cows health because it causes great impact on the metabolism, immunity and production of these animals. Some microminerals and vitamins can improve the immune response of production animals against diseases and to stressful situations. Therefore, the aim of this study was to evaluate the parenteral application of trace minerals and vitamins A and E the energy profile and oxidative stress of Holstein cows in transition period. Sixty animals were divided into two groups: supplemented with trace minerals and vitamins (GMTV) (n = 30) and control (CG) (n = 30). Mineral and vitamin supplementation was carried out through subcutaneously with 5 ml of the product containing 10 mg/ml copper (as edetate), 40 mg/ml zinc (as edetate), 10 mg/ml manganese (as edetate) and 5 mg/ml selenium (as sodium selenite) and 5 ml of the product containing 35 mg/ml vitamin A (as palmitate) and 50 mg/ml vitamin E (as acetate). Blood samples were collected 21 days prepartum, 14 days prepartum, 7 days prepartum, 7 days postpartum, 14 days postpartum and 21 days postpartum. In the first study the objective was to evaluate oxidative stress parameters and neutrophilic function in Holstein females in the transition period. A significant difference was observed between treatment X days for SOD values, with a higher activity of this enzyme in GMTV females, in weeks close to calving. Significant day difference and treatment X day were observed for TBARS, in which GMTV females showed lower TBARS values at all times except seven days postpartum. There was a significant day effect for leukocytes, treatment X day for neutrophils, and for neutrophilic phagocytosis, which the GMTV females had leukocytes and neutrophils values lower close to parturition, besides to greater neutrophilic phagocytosis. In the second study the objective was to evaluate the supplementation effect on biochemical and hormonal parameters in Holstein cows in the transition period. The differences observed were only related to the time and not to the treatment. The AGNES values were higher on the parturition day, and the BHBA had increasing values after calving, peaking in the third week of lactation. The fructosamine presented increasing values until the parturition day, with higher concentrations at experimental moment. Higher HDL levels were detected 21 days postpartum. The triglycerides values remained high in the prepartum period, but showed a sudden reduction on the parturition day, maintaining lower values postpartum. Both calcium and IGF-1 concentrations were lower on parturition day. In addition insulin and cortisol values were higher on the parturition day. In conclusion, moderate milk production animals submitted to adequate diets present little response to the use of certain microminerals and vitamins, but it can be noticed an improvement in SOD activity and neutrophilic activity in GMTV animals. This enhances the binding of trace minerals and vitamins to dairy cows immune system, especially in the transitional period, which is linked to impaired immune response.

Key-words: Holstein cows; transition period; trace minerals; vitamin A; vitamin E.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I

- Tabela 1 – Recomendação do National Research Council (NRC, 2001) das dietas de vacas secas e em lactação, e composição química da dieta total no período pré-parto e lactação da propriedade 1.....27
- Tabela 2 – Recomendação do National Research Council (2001) das dietas de vacas secas e em lactação, e composição química da dieta total no período pré-parto e lactação da propriedade 2.....27
- Tabela 3 – Médias dos quadrados mínimos \pm erros-padrão das médias (EPM) e valor de P para: superóxido dismutase (SOD) (Ug/Hb), glutathiona peroxidase (GPx) (Ug/Hb) e teores de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS (μ mol MDA/ml), em fêmeas Holandesas suplementadas com minerais traços e vitaminas A e E injetáveis (GMTV) ou Controle.....30
- Tabela 4 – Médias dos quadrados mínimos \pm erros-padrão das médias (EPM) e valor de P para: leucócitos totais, neutrófilos, bastonetes, eosinófilos, linfócitos, monócitos e basófilos, em fêmeas Holandesas suplementadas com minerais traços e vitaminas A e E injetáveis (GMTV) ou Controle.....31
- Tabela 5 - Médias dos quadrados mínimos \pm erros-padrão das médias (EPM) e valor de P para: Metabolismo oxidativo basal, Metabolismo oxidativo estimulado, Fagocitose de neutrófilos e Fagocitose e metabolismo oxidativo, em fêmeas Holandesas que receberam minerais traços e vitaminas A e E injetáveis (GMTV) e grupo controle (GC).....34

ARTIGO II

- Tabela 1 – Recomendação do National Research Council (NRC, 2001) para dietas de vacas secas e em lactação, e composição química da dieta total no período pré-parto e lactação da propriedade 1.....55
- Tabela 2 – Recomendação do National Research Council (2001) para dietas de vacas secas e em lactação, e composição química da dieta total no período pré-parto e lactação da propriedade 2.....56
- Tabela 3 - Médias dos quadrados mínimos \pm erros-padrão das médias (EPM) e valor de P para: betahidroxiacetato (BHBA), ácidos graxos não esterificados (AGNES), frutossamina, lipoproteínas de alta densidade (HDL), triglicerídeos, ureia, cálcio, cortisol, insulina e fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (IGF-1) em fêmeas Holandesas suplementadas com minerais traços e vitaminas A e E injetáveis (GMTV) ou Controle.....57

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO I

Figura 1 – Valores medianos dos parâmetros oxidativos de vacas Holandesas no período de transição.....32

ARTIGO II

Figura 1 - Valores medianos dos parâmetros bioquímico e hormonal de vacas Holandesas no período de transição.....58

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1	PERÍODO DE TRANSIÇÃO E PERFIL METABÓLICO DE VACAS LEITEIRAS.....	13
2.2	MINERAIS TRAÇOS E VITAMINAS A e E.....	18
2.2.1	Minerais traços.....	18
2.2.2	Vitaminas.....	21
3	ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	23
4	ARTIGO I - EFEITO DO USO DE MINERAIS TRAÇOS (COBRE, ZINCO, SELÊNIO E MANGANÊS) E VITAMINAS (A E E) INJETÁVEIS SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E FUNÇÃO DE NEUTRÓFILOS DE FÊMEAS DA RAÇA HOLANDESA NO PERÍODO DE TRANSIÇÃO.....	24
5	ARTIGO II - EFEITO DO USO DE MINERAIS TRAÇOS (COBRE, ZINCO, SELÊNIO E MANGANÊS) E VITAMINAS A E E SOBRE OS PARÂMETROS METABÓLICOS EM VACAS HOLANDESAS EM PERÍODO DE TRANSIÇÃO.....	38
6	DISCUSSÃO.....	59
7	CONCLUSÕES.....	60
	REFERÊNCIAS.....	62

1 INTRODUÇÃO

Os desafios metabólicos impostos às vacas leiteiras modernas as tornam mais susceptíveis às várias doenças. A produção de leite, que é mais significativa no início da lactação, aumentou ainda mais o dispêndio energético das vacas leiteiras, principalmente às criadas em sistema intensivo. Dentre todas as fases produtivas, o período de transição é o momento mais crítico. Durante esse período a vaca passa por grandes mudanças fisiológicas, endócrinas, anatômicas e comportamentais envolvidas no parto, lactogênese e manutenção da lactação, muitas das quais terão impacto direto na saúde desses animais (CONTRERAS & SORDILLO, 2011).

A alta demanda energética e o excessivo aumento da atividade metabólica associada ao final da gestação, ao parto e ao início da lactação, podem resultar em um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio. O papel do estresse oxidativo no desenvolvimento de afecções agudas e crônicas em várias espécies animais tem sido investigado exaustivamente. O estresse oxidativo está implicado em várias síndromes e doenças, incluindo condições que são relevantes na produção animal e bem-estar do indivíduo (SORDILLO, 2005).

Os custos e perdas relacionados com um período de transição inadequado em vacas leiteiras são ligados a perdas diretas, como queda na produção de leite e, aumento de dias em aberto e indiretas, como redução de qualidade de leite, ocorrência de mastites, deslocamento de abomaso e cetose, bem como baixa imunidade. Os minerais traços e as vitaminas A e E têm sido estudados em várias situações clínicas e de estresse (MACHADO et al., 2013; MACHADO et al., 2014; BICALHO et al., 2014). Para animais de produção tem-se percebido que a administração destes elementos podem melhorar o metabolismo e a capacidade imunológica, o que se reflete na diminuição de doenças nos animais. Nesse sentido, o uso metafilático dos minerais traços e das vitaminas A e E para vacas em período de transição seria uma maneira de melhorar o sistema imune e o metabolismo energético, mantendo o desempenho produtivo destes animais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PERÍODO DE TRANSIÇÃO E PERFIL METABÓLICO DE VACAS LEITEIRAS

O período de transição para as vacas leiteiras compreende as três semanas antes e três semanas depois do parto. O termo “transição” ressalta a importância das mudanças fisiológicas, metabólicas, nutricionais e hormonais que acontecem nesse período de tempo (GRUMMER, 1995; DRACKLEY, 200). Segundo o National Research Council (NRC) (2001), a exigência de energia dobra em uma vaca logo após o parto. Uma vaca adulta produzindo 25 Kg de leite por dia necessita de 28,8 Mcal/dia, nos primeiros dias de lactação, enquanto que a mesma vaca, nos dois dias anteriores ao parto necessita de apenas 14,5 Mcal/dia. A maneira como esta demanda de energia é suprida está intimamente ligada ao desempenho do animal durante a lactação, ao aparecimento de doenças no pós-parto e ao desempenho reprodutivo, podendo afetar significativamente a rentabilidade da atividade leiteira (BLOCK, 2010).

No último terço da gestação ocorre um grande aumento de volume do feto, aumentando a pressão interna dos órgãos digestivos, diminuindo o espaço ocupado pelos alimentos. Nos dois dias que antecedem o parto, há redução de até 30% na ingestão de matéria seca (IMS) (HAYIRLI et al., 2002) e redução na síntese de ácido propiônico, diminuição da glicose e teores séricos de insulina, sendo que o retorno ou o acréscimo na ingestão acontece lentamente, não acompanhando as exigências da vaca (BLOCK, 2010; LEAN et al., 2013). Essa queda da IMS, o aumento da demanda de energia pelo feto e pela glândula mamária faz com que ocorra mobilização de reservas corporais no período periparto levando a vaca a um balanço energético negativo (BEN) (DRACKLEY, 1999; HAYIRLI et al., 2002) e ao estresse oxidativo (SORDILLO & AITKEN, 2009).

Durante o início da lactação são mobilizados entre 30 a 50 Kg de gordura do tecido adiposo (BELYEA & ADAMS, 1990). Isso faz com que nessa fase apareçam transtornos metabólicos que afetam a saúde e a produção das vacas leiteiras de alta produção, favorecendo o desequilíbrio da homeostase, sendo necessário monitoramento clínico e laboratorial do rebanho (LAGO et al., 2004). A alimentação, o estado fisiológico, a raça, a idade, o clima e a condição corporal impõem condições metabólicas que tem como consequência o desempenho produtivo dos animais (HAIDA et al., 1996). O conhecimento do

metabolismo pode ser obtido através do perfil metabólico, tendo grande importância da detecção de várias doenças (GONZÁLEZ, 2009).

A insulina é um hormônio que está envolvido na concentração da glicose na circulação, além de estar relacionado no crescimento celular e desenvolvimento de uma ampla variedade de tipos celulares (FOULADI-NASHTA e CAMPBELL, 2006). É um importante fator na adaptação do metabolismo de vacas leiteiras durante o período de transição (MOORBY et al., 2000). É um hormônio de caráter anabólico (GUYTON e HALL, 1997), que pode atuar em vários tecidos corporais, tais como fígado, músculos, glândulas mamárias e ovário (CUNNINGHAM, 2004). A concentração plasmática de insulina declina durante o período seco e permanece baixa durante as primeiras semanas do pós-parto (MOORBY et al., 2000). A baixa concentração de insulina após o parto, associada à resistência a este hormônio nos tecidos adiposo e muscular inibe a captação e a utilização de glicose por estes tecidos (BELL, 1995).

O fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) é um hormônio liberado pelo fígado e tecidos periféricos, podendo atuar de forma endócrina afetando a glicose, metabolismo de aminoácidos e proteínas, por aumentar a síntese em relação à degradação das mesmas (LOBLEY, 1992). No período de transição, antes do início da diminuição de ingestão de alimentos, as vacas têm concentrações baixas circulantes de hormônio de crescimento (GH) e altas concentrações de insulina e de fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1). Com a proximidade do parto, quando há diminuição da ingestão de alimentos e BEN, a concentração de GH aumenta e as concentrações de insulina e IGF-1 diminuem, indicando uma dissociação do eixo somatotrófico- IGF-1, porque o fígado deveria aumentar a produção de IGF-1 em resposta ao aumento de GH, mas nesse estado de BEN a expressão do receptor de GH 1α diminui, impossibilitando o estímulo de produção de IGF-1 pelos hepatócitos (LUCY, 2008), iniciando o processo de resistência à insulina. Este evento é manifestado pela diminuição da sensibilidade à insulina por várias vias metabólicas associadas com a utilização de glicose por todo o organismo, e diminuição da resposta à insulina em relação à lipólise e mobilização de ácidos graxos não esterificados (AGNE) (PATTERSON et al., 1993).

No final da gestação a concentração de progesterona no plasma, que é alta na gestação, cai rapidamente no parto, e há elevação transitória de estrógeno, de cortisol, da prostaglandina $F2\alpha$ e da prolactina (STEVENSON, 2007). Essas modificações contribuem para diminuição da IMS e favorecem a mobilização de reservas corporais (CHEW et al., 1979; FORBES, 1986; BLOCK, 2010). O estrógeno aumentado influencia diretamente no aumento de mobilização de ácidos graxos do tecido adiposo durante o periparto. O cortisol é o hormônio

chave que regula a diminuição na concentração de progesterona e, conseqüentemente, o aumento do estradiol e da prostaglandina F2 α . Também suprime a resposta imune, por causar a infra-regulação da expressão de L-selectina e integrinas- β 2 (CD18) por neutrófilos, moléculas de adesão envolvidas no tráfego de neutrófilos a partir do endotélio para o local de infecção (BURTON et al., 2005).

A absorção e utilização de glicose pelos tecidos muscular, adiposo, hepático, entre outros, são reduzidos durante o período lactacional, para que mais glicose esteja disponível para sua captação de glicose pela glândula mamária, que é independente de insulina, e produção de lactose, o fator osmótico mais importante para volume de leite produzido (LUCY, 2008). Em ruminantes, especialmente no período de transição, a glicose é substituída por ácidos graxos voláteis e seus derivados, como fontes energéticas para respiração celular de muitos tecidos, mas glicose e glicogênio continuam sendo fundamentais para funções de alguns sistemas (ex. sistema nervoso central e sistema imune) (BAUMAN & CURRIE, 1980). Para fins de avaliação metabólica, pode utilizar a medição da frutosamina, em substituição da glicose. A frutosamina, que é uma proteína glicosilada, é um parâmetro confiável para a avaliação do metabolismo da glicose, pois indica a concentração de glicose de uma a três semanas anterior aos testes (THRALL, 2006). Segundo Jensen et al. (1993), para bovinos, a faixa normal de frutosamina encontra-se entre 213 μ mol/L a 265 μ mol/L.

O aumento do BEN resulta em altas concentrações de ácidos graxos não esterificados (AGNES) (SORDILLO e RAPHAEL, 2013), utilizados como fonte de energia alternativa para uma grande parte dos tecidos, poupando a glicose que passa a ser direcionada em grande proporção para a glândula mamária, para produção de lactose. No fígado, os AGNES podem dirigir-se a rotas, a saber: podem ser completamente oxidados para produção de energia, ser incompletamente oxidados à corpos cetônicos, ou esterificados com o glicerol e armazenados como triglicerídeos (TG) ou podem ser exportados como lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL). No entanto, o fígado dos ruminantes possui capacidade limitada para exportar VLDL, o que associado à intensa mobilização lipídica, pode levar ao acúmulo de triglicerídeos neste órgão (DRACKLEY, 2001), situação conhecida como esteatose hepática (BOBE et al., 2004). De acordo com esses autores, as altas taxas de AGNES circulantes em vacas no periparto poderão predispor a esta síndrome.

As lipoproteínas de alta densidade (HDL) encontram-se diminuída no pré-parto devido à exigência energética para o crescimento do feto e preparação da glândula mamária (CEBALLOS et al., 2002). Apesar da HDL representar mais de 80% do total de lipoproteínas circulantes no plasma dos bovinos, o transporte dos triglicerídeos é realizado por lipoproteínas

de baixa densidade, principalmente, as VLDL e quilomicrons (HOCQUETTE & BAUCHART, 1999).

Também, quando a concentração de AGNES excede a capacidade do fígado em metabolizá-los há aumento na concentração de betahidroxibutirato (BHBA) (GRUMMER et al., 2004), resultando em cetose subclínica ou clínica (DRACKLEY et al., 2001). As concentrações plasmáticas de AGNES aumentam duas vezes ou mais, duas a três semanas antes do parto, com aumento drástico ao parto (SORDILLO & RAPHAEL, 2013). Os efeitos do BEN, experimentado por vacas leiteiras no período de transição, influencia sobremaneira a ocorrência de doenças nesses animais, de tal forma que valores de BHBA superiores a 1000 $\mu\text{mol/L}$ aumentam em 25 vezes as chances de ocorrência de deslocamento de abomaso (SEIFI et al., 2011). De acordo com Leblanc et al. (2005) vacas com teores de AGNES maiores que 1,0 mmol/L no periparto tem 4,6 vezes mais chances de serem descartadas ao longo do seu ciclo produtivo. A determinação da ureia revela informações da atividade metabólica proteica, além da relação entre energia:proteína (LÓPEZ et al., 2004). Para vacas leiteiras, a concentração de ureia tende a ser mais elevada no primeiro mês de lactação (MOORE & VARGA, 1996). Os valores considerados normais para ureia plasmática devem estar dentro do limite de 40 mg/dl de ureia plasmática (18,6 mg/dl de nitrogênio ureico), para não afetar o desempenho reprodutivo de vacas leiteiras (LIMA et al., 2004), pois teores elevados de proteína facilmente degradável tem efeito sobre o ambiente uterino (WITTEWER, 2000).

Hammom et al. (2006) também relatam que além dos transtornos metabólicos no período de transição ocorre redução da resposta imune das vacas. O aumento de AGNES e BHBA pode ser deletério a vários tipos celulares, inclusive células imunes, assim como o BEN tem impacto negativo no sistema imune, pois nesses casos os animais tem diminuição de glicose e glicogênio os quais são fontes primárias de energia para células como neutrófilos e macrófagos, que fazem parte do sistema imune inato (ZERBE et al., 2000; GRINBERG et al., 2008).

A alta demanda energética e o excessivo aumento da atividade metabólica associada ao final da gestação, ao parto e ao início da lactação, podem resultar em um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (SORDILLO, 2005). A produção de ERO e de seus produtos, tais como o malondialdeído, está altamente correlacionada com os teores de BHBA em animais no período periparto (BERNABUCCI et al., 2002). As ERO e ERN são substâncias reativas produzidas continuamente pelos processos metabólicos (ELLAH, 2010). O mecanismo de defesa do organismo contra as espécies reativas são os antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, que

agem tanto no meio extra como no intracelular (WEISS, 2005). O estresse oxidativo ocorre quando a produção de ERO e ERN é maior que a capacidade antioxidante do organismo, ou seja, o estresse oxidativo pode ser definido como o desbalanço entre a presença de substâncias oxidantes e antioxidantes, ou seja, quando a produção de espécies reativas ao oxigênio excede os mecanismos de defesa antioxidante no organismo animal, podendo causar modificação em macromoléculas celulares, morte celular, necrose e danos na estrutura dos tecidos (SPEARS & WEISS, 2008).

As ERO incluem radicais livres, como: superóxido (O_2^-), hidroxil (OH), peroxil (RO_2), hidroperoxil (HRO_2^-), assim como espécies não radicalares, que apesar de não possuírem elétrons desemparelhados são muito instáveis, como por exemplo: peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HOCL). As ERNS incluem radicais livres que incluem o óxido nítrico (ON) e dióxido de nitrogênio (NO_2^-), assim como espécies não radicalares, por exemplo: peroxinitrito ($ONOO^-$), óxido nitroso (HNO_2) e peroxinitrato (RONOO) (TURKO et al., 2001).

As ERO e a ERN são substâncias altamente reativas produzidas continuamente durante os processos metabólicos. Eles participam principalmente em eventos fisiológicos, tais como a resposta imunitária, metabolismo de ácidos graxos insaturados e reação inflamatória (ELLAH, 2010). O excesso de ERO e ERN resulta em modificações de DNA, enzimas e membranas, e induz alterações na atividade do sistema imunitário e na estrutura de biopolímeros de base que, por sua vez, pode estar relacionado com mutagênese e processos de envelhecimento tendo importante papel na patogênese dos danos no tecido em vários distúrbios, tais como disfunção hepática, mastite, dano renal, inflamação, lesões imunes, e carcinogênese (ELLAH, 2010).

Para combater os danos causados pela produção contínua de espécies reativas, o organismo conta com mecanismos de defesa antioxidante, que pode ser enzimático e não enzimático. O mecanismo de defesa antioxidante inclui a superóxido dismutase (SOD), a catalase, a glutaciona peroxidase (GPx) e a glutaciona redutase (GSH). Os antioxidantes não enzimáticos incluem a glutacionatripeptídeo e as vitaminas A, C e E (SORDILLO & AITKEN, 2009).

A enzima SOD converte anion superóxido em peróxido de hidrogênio menos reativo, catalisando a dismutação do superóxido em oxigênio (O_2) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (SORDILLO & AITKEN, 2009). Existem duas SODs no organismo, uma citoplasmática, contendo cobre-zinco na mesma molécula (CuZnSOD) e outra mitocondrial, contendo manganês (MnSOD) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

A enzima GPx atua impedindo o acúmulo de peróxido de hidrogênio em água (uma molécula de H_2O_2 é reduzida para 2 moléculas de H_2O). As células animais contêm dois tipos de glutathiona peroxidase, sendo que um deles é selênio dependente, enquanto o outro não. É a selenoenzima mais estudada e associada a funções antioxidantes em bovinos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

2.2 MINERAIS TRAÇOS E VITAMINAS A e E

2.1.1 Minerais traços

Os minerais fazem parte da maioria das funções no metabolismo animal, como no desempenho reprodutivo, na manutenção do crescimento, no metabolismo energético, na função imune, entre outras tantas funções fisiológicas (LAMB et al., 2008). Contudo, os minerais nem sempre são encontrados em quantidades desejáveis nos alimentos, havendo a necessidade de uma suplementação (PEIXOTO et al., 2005). As exigências de minerais são altamente dependentes do nível de produtividade animal. Maiores taxas de crescimento ou maior produção de leite exigem maiores quantidades de minerais (PEDREIRA & BERCHIELLI, 2006).

Segundo o NRC (2001) os cálculos de exigências nutricionais dos bovinos são baseados no desempenho ponderal e nas quantidades de um mineral específico, como forma de prevenir deficiências, assumindo que os minerais possuem diferentes disponibilidades, que variam de acordo com o alimento (forragens e concentrados) e fontes (orgânicas ou inorgânicas). Esses fatores influenciam no coeficiente de absorção do mineral e, conseqüentemente, na sua exigência.

Os microminerais ou elementos traços são necessários ao organismo em miligramas ou microgramas, sendo alguns deles o cobalto, cobre, zinco, selênio, ferro, iodo, manganês e cromo (NRC, 2001). Participam de várias funções no organismo, pois são componentes de sistemas enzimáticos responsáveis pela resposta imune, além de estarem envolvidos diretamente na função reprodutiva (WEISS, 2005). Os minerais traços desempenham papel importante na função imune de vacas leiteiras (SHANKAR & PRASAD, 1998), fertilidade (RABIEE et al., 2010) e crescimento (ENJALBERT et al., 2006). Nockels et al. (1993) afirmam que novilhas sob estresse reduzem a absorção de minerais traços. Como o período de transição é um momento estressante para a vaca leiteira, nesse período pode haver redução da absorção dos minerais traços (XIN et al., 1993).

A inclusão de minerais na dieta de ruminantes não garante a ingestão ou absorção completa, principalmente no período de transição onde a ingestão de matéria seca está diminuída (ROCHE et al., 2009). Suplementos minerais dietéticos não podem ser absorvidos adequadamente devido a interações com outros nutrientes no rúmen (SUTTLE, 1986). Elementos antagonistas presentes na água de beber (ferro, por exemplo) também pode ter um efeito negativo sobre a absorção dos minerais a partir do trato digestivo (SPEARS, 2003).

O cobre (Cu) está envolvido no desenvolvimento e manutenção do sistema imunitário. É um componente da enzima ceruloplasmina, que é sintetizada no fígado, a qual auxilia na absorção e transporte do ferro, e é também parte importante da enzima SOD (NRC, 2001), e da citocromo-oxidase, enzima oxidase terminal na cadeia respiratória, que catalisa a redução de O₂ para água (MACDOWELL, 2003)

Em ruminantes apenas 1 a 3% do Cu consumido é absorvido, sendo dependente de fatores como idade do animal, fonte fornecida e interação com outros nutrientes da dieta e agentes de transporte intestinal como a bile (NRC, 2001). Após entrar na circulação o cobre é depositado no fígado (MACDOWELL, 2003). Segundo o NRC (2001) a absorção de cobre é reduzida pela presença de enxofre e de molibdênio na dieta. Fontes de enxofre podem ser convertidas em sulfureto dentro do rúmen, levando à formação de cobre sulfureto (precipitados) tornando o cobre indisponível para absorção (BIRD, 1972).

Graves deficiências Cu em bovinos em pastagens foram documentadas desde 1933. Pela sua importância na nutrição e metabolismo dos ruminantes o Cu é estudado há mais de 50 anos. O forte antagonismo entre cobre e molibdênio é conhecido há mais de 40 anos (REID, 1956). Vários grupos têm investigado o efeito do cobre em função dos neutrófilos. Embora os resultados tenham sido variáveis, alguns estudos sugerem que o baixo *status* de cobre resulta em capacidade fagocítica de neutrófilos reduzida (BOYNE e ARTHUR, 1981; XIN et al., 1991). Segundo dados do NRC, novilhas suplementadas com cobre iniciando 60 dias antes do parto e continuando há 30 dias após o parto diminuíram a gravidade de mastite induzida por *Escherichia coli*.

O selênio (Se) foi identificado pela primeira vez em 1930 como um elemento tóxico para algumas plantas e animais, porém MCDOWELL (1992) descreve sua importância para o crescimento e função imune (). O Se pode ser eficaz na redução do estresse oxidativo, e tem um importante efeito sobre o sistema imunológico, pois é componente da enzima GPx que atua no sistema antioxidante celular convertendo peróxido de hidrogênio a água além de fazer parte da iodotironina 5 deiodinase, enzima que converte tetraiodotironina (T4) em triiodotironina (T3) (SORDILLO, 2013).

O selênio (Se) é um micromineral ligado à fertilidade e à prevenção de doenças (UNDERWOOD & SUTTLE, 1999). A deficiência mineral subclínica de Se tem sido associada com imunossupressão (SORDILLHO & AITKEN, 2009), insuficiência reprodutiva (SPEARS & WEISS, 2008) e a crescimento deficiente (ENJALBERT et al., 2006). Segundo o NRC (2001) a digestibilidade aparente de selênio em forragens e concentrados está entre 30 e 60% para ovinos, caprinos e vacas leiteiras não lactantes. Por estar ligado a enzima GPx, o Se está envolvido no metabolismo do ácido araquidônico. Essa relação é provavelmente uma das razões pela qual a suplementação de selênio melhora a capacidade imunológica (NRC, 2001).

O zinco (Zn) foi estabelecido como essencial para animais de laboratório na década de 1930, mas mesmo em 1956 relativamente pouco se sabia sobre sua nutrição e metabolismo em bovinos (REID, 1956). A absorção do Zn ocorre principalmente no intestino delgado, sendo o duodeno o local mais ativo desta absorção (WEISMANN & FLAGSTAD, 1976). O Zn é um componente essencial de numerosas enzimas e faz parte da estrutura de muitas proteínas. O zinco está envolvido no metabolismo de ácido nucléico, na integridade do tecido epitelial, reparação e divisão celular, e no transporte e utilização de vitamina A (KANeko, 1989). Desempenha um papel crucial na função e eficácia de alguns componentes do sistema imunológico. É um elemento essencial componente de várias enzimas envolvidas na síntese de DNA e RNA, e tem um papel antioxidante por fazer parte de um grupo de elementos que induzem a síntese de metalotioneína, que se liga aos radicais livres, como componente da enzima SOD, que pode estabilizar estruturas da membrana celular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

Da mesma forma que o Zn, o manganês está ligado à enzima SOD, trabalha em conjunto com outros antioxidantes para minimizar o acúmulo de espécies reativas ao oxigênio e nitrogênio, o que poderia danificar as células. A deficiência de manganês pode causar crescimento deficiente, modificações esqueléticas, distúrbios reprodutivos, além de anormalidade em recém-nascidos. A proporção de manganês absorvido a partir da dieta é geralmente de 4%. O teor de manganês dos alimentos é bastante variável e é influenciado por tipos de solo, pH do solo, adubação e espécies de plantas (NRC, 2001).

Soluções injetáveis podem ser uma alternativa de fornecimento adicional de minerais durante o período de transição. Pogue et al. (2012) relataram que o uso de uma solução injetável mineral aumentou as concentrações de Cu e Se no fígado, durante pelo menos um período de 15 dias, e aumentou Zn e Mn no plasma durante várias horas. Bicalho et al. (2014) avaliando a suplementação para vacas leiteiras com Zn, Mn, Se e Cu em duas injeções aos 230 e 260 dias de gestação, verificaram aumento da concentração no soro de Cu, Se e Zn e

diminuição dos casos de retenção de placenta dos animais tratados. Machado et al. (2013) observaram que injeções subcutâneas de minerais traços pré parto (300 mg de zinco, 50 mg de manganês, 25 mg de selênio e 75 mg de cobre) tiveram impacto na saúde do úbere, diminuindo a contagem de células somáticas, a incidência de mastite subclínica e clínica, além de diminuir a incidência de nascimento de natimortos e a endometrite nas vacas suplementadas. Machado et al. (2014) avaliaram o efeito da suplementação subcutânea pré-parto de 300 mg de zinco, 50 mg de manganês, 25 mg de selênio, e 75 mg de cobre sobre a atividade dos leucócitos, betahidroxi-butarato e a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em vacas em período de transição e observaram que as vacas que receberam a suplementação aos 230 e 260 dias de gestação e aos 35 dias pós-parto aumentaram a atividade da SOD até 100 de lactação.

2.2.2 Vitaminas

As vitaminas são compostos orgânicos necessários em pequenas quantidades que são essenciais para a vida e devem ser absorvidas a partir do trato gastrointestinal. As vitaminas devem estar na dieta ou ser sintetizadas por microrganismos no sistema digestivo. Quando um animal absorve uma quantidade inadequada de uma determinada vitamina, várias alterações orgânicas são observadas de acordo com a vitamina e o grau e duração da deficiência. Das 14 vitaminas conhecidas, somente duas (vitaminas A e E) tem requerimentos absolutos na dieta de vacas leiteiras e estão ligadas ao sistema imune e antioxidante, respectivamente (WEISS, 2005).

A atividade da vitamina A é definida em equivalentes de retinol. Uma UI de vitamina A corresponde a 0,3 g de all-trans- retinol. Segundo o NRC (2001) o requerimento para suplementação de vitamina A é de 50 UI/lb de peso vivo ou aproximadamente 70,000 a 77,000 UI por dia para uma vaca adulta. Os estudos sobre a biodisponibilidade das formas de vitamina A em bovinos leiteiros são extremamente limitados. A biodisponibilidade da vitamina A é dependente do grau de destruição ruminal e da eficiência de absorção pelo intestino delgado. A destruição ruminal de vitamina A pode ser extensa. Aproximadamente 60% dos suplementos de vitamina A foram destruídos no rúmen de novilhos alimentados com feno e milho em grãos na dieta. Esta vitamina também aumenta a resistência à doença e tem efeitos estimuladores sobre a imunidade mediada por células (NRC, 2001).

A vitamina E é o nome comum para uma série de compostos chamados lipossolúveis, os A, B, G e D tocoferóis e A, B, G e D tocotrienóis. Cada um desses

compostos pode apresentar a mesma ou diferentes atividades biológicas, porém, com especificidades. O teor de vitamina E dos alimentos é altamente variável (com variações de até 50%). O requerimento de vitamina E é de 0,3 UI/lb de peso vivo para vacas em lactação e 0,7 UI/lb de peso vivo para vacas secas. Isso equivale a aproximadamente 500 a 1000 UI por dia para vacas em lactação, e pouca ou nenhuma suplementação de vitamina E é necessária para vacas leiteiras em pastagem. A maior função da vitamina E é atuar como antioxidante lipossolúvel celular, estando envolvida na manutenção de membranas celulares, metabolismo do ácido araquidônico, imunidade e função reprodutiva (NRC, 2001).

Politis et al. (1995) suplementaram vacas leiteiras com vitamina E quatro semanas antes do parto até as oito semanas após o parto com 3000 UI/vaca por dia. Além disso, o mesmo grupo de animais recebeu uma injeção de vitamina E (5000 UI) uma semana antes da data esperada do parto. Os autores verificaram melhor atividade de neutrófilos e macrófagos nas vacas que receberam a suplementação. Weiss et al. (1997) suplementaram vacas leiteiras com 4000 UI de vitamina E por dia durante as últimas duas semanas antes do parto e 2000 UI por dia durante a primeira semana de lactação e verificaram significativa redução de infecções da glândula mamária comparada com a ingestão de 1000 e 500 UI durante o período seco e início da lactação.

É sabido que há relação entre o estresse oxidativo e o aparecimento de doenças em vacas leiteiras, particularmente durante o período de transição (SORDILLO, 2005; SORDILLO & AITKEN, 2009), pois neste período há um grande desafio metabólico pela redução de IMS, aumento da produção de leite e BEN. Neste período também há redução das concentrações de vitaminas e de minerais que atuam como cofatores de algumas enzimas do sistema antioxidantes, como a enzima SOD e a GPx, além de sistemas não enzimáticos, que tem ligação com a imunidade (XIN et al.,1993). Nesse sentido, o uso de minerais traços e vitaminas de maneira metafilarica, em animais sob estresse oxidativo, pelo alto desafio e metabólico e deficiência nutricional ocasionado pela diminuição de consumo do período de transição, pode melhorar a imunidade.

3 ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os resultados desta tese estão sob a forma de dois artigos científicos. Os itens materiais e métodos, resultados, discussão e referências bibliográficas estão descritos nos mesmos.

4 ARTIGO I

Artigo aceito para publicação no periódico Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFMG.

Efeito do uso de minerais traços (cobre, zinco, selênio e manganês) e vitaminas (A e E) injetáveis sobre o estresse oxidativo e função de neutrófilos de fêmeas da raça Holandesa no período de transição

Effect of the use of trace minerals (copper, zinc, selenium and manganese) and vitamins (A and E) injectable on the oxidative stress and neutrophil function of Holstein cows in the transition period

Collet, S. G.^{1*}; Ferronato, J.A.²; Santos, M.³; Blagitz, M. G.³; Enders, M. S. P¹; Müller, E. I.¹; Souza, R. S.⁴; Ortolani, E. L.⁴; Thaler Neto, A.⁵; Leal, M. L. R.¹

¹ Universidade Federal de Santa Maria - UFSM- Santa Maria, RS.

² Universidade do Oeste de Santa Catarina – UNOESC – Xanxerê, SC.

³ Universidade Federal da Fronteira Sul - IFS - Realeza, PR.

⁴ Universidade de São Paulo - USP - São Paulo, SP.

⁵ Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC – Lages, SC.

* Autor para correspondência: silvana.collet@unoesc.edu.br

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito metafilático de minerais traços e vitaminas A e E injetáveis, em parâmetros do estresse oxidativo e na função de neutrófilos em fêmeas da raça holandesa no período de transição. Sessenta animais foram divididos em dois grupos: animais que receberam minerais traços e vitaminas A e E injetáveis (GMTV) (n=30) e grupo controle (GC) (n=30). Não houve diferença significativa entre os grupos nos parâmetros avaliados, porém, observou-se diferença significativa entre tratamento e dia para os valores da SOD, com maior atividade dessa enzima em fêmeas GMTV, nas semanas próximas ao parto. Observou-se diferença de dia e para interação tratamento e dia para o TBARS, onde fêmeas GMTV mostraram menores valores de TBARS em todos os momentos, exceto sete dias após o parto. Houve efeito significativo de dia para leucócitos, interação tratamento e dia para neutrófilos, e interação tratamento e dia para fagocitose de neutrófilos, onde as fêmeas GMTV

apresentaram valores menores de leucócitos e neutrófilos próximo ao parto, além de maior fagocitose de neutrófilos. Pode-se observar que houve melhora no sistema oxidativo e imune de fêmeas GMTV, resposta que provavelmente está relacionada com a administração dos minerais traços e vitaminas A e E.

Palavras-chave: superóxido dismutase, glutationa peroxidase, TBARS, NBT, período de transição.

Abstract

This study evaluates the metaphylactic of the subcutaneous administration of a trace minerals and vitamins A and E, on the oxidative stress and neutrophil function in Holsteins cows under the transition period. Sixty females were divided in two groups: group with trace minerals and vitamins (GMTV) (n=30) and group control (GC) (n=30). There was no significant difference between those groups, however, we find significant difference between treatment and day for Superoxide dismutase (SOD) values with higher activity of this enzyme in females GMTV on the weeks next to the parturition. Still, there was difference on day and, for interactions between treatment and day for TBARS, were females GMTV showed lower values of TBARS in all moments, except on day seven after the parturition. For leucocytes, there is a significant effect by day, interaction on treatment and day on neutrophils, and interaction treatment and day for neutrophil phagocytosis, were females GMTV showed lower values of leucocytes and neutrophils next to the parturition, and an increase of neutrophils phagocytosis. In summary, cows from the GMTV group had an improvement on the immune and oxidative systems, probably correlated with the administration of this supplement.

Key-words: superoxide dismutase, glutationa peroxidase, TBARS, NBT, transition period.

Introdução

Nos últimos anos, as vacas leiteiras têm aumentado à produção de maneira significativa. Nesse sentido, observa-se o aumento de doenças metabólicas, principalmente, no período de transição. Durante essa fase acontecem mudanças fisiológicas, metabólicas, nutricionais e hormonais. Estas são decorrentes de adaptações relacionadas com o aumento da demanda energética para suprir a glândula mamária, com os nutrientes necessários para a síntese do leite (Contreras e Sordillo, 2011). Além disso, esses animais ainda precisam lidar com a diminuição da ingestão de matéria seca e, por consequência, com o balanço energético negativo que dependendo da intensidade, pode causar estresse oxidativo (Sordillo e Aitken, 2009).

O estresse oxidativo ocorre quando a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) é maior que a capacidade antioxidante do organismo. Este pode causar modificação em macromoléculas, morte celular, necrose e danos na estrutura dos tecidos (Spears e Weiss, 2008). Alguns estudos indicam o envolvimento do estresse oxidativo sobre o aparecimento de doenças em vacas leiteiras, estando envolvido em respostas disfuncionais do sistema imune e inflamatórias do animal, particularmente durante o período de transição (Sordillo, 2005; Sordillo e Aitken, 2009). Esse período também coincide com a redução das concentrações de vitaminas e de minerais que atuam como cofatores de algumas enzimas do sistema antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) e a glutathione peroxidase (GPx) (Xin et al.,1993).

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito metafilático da administração subcutânea de minerais traços contendo cobre (Cu), zinco (Zn), selênio (Se), manganês (Mn) e vitaminas A e E, em parâmetros do estresse oxidativo, no leucograma, no metabolismo oxidativo e fagocitose dos neutrófilos em vacas leiteiras no período de transição.

Material e métodos

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM), sob protocolo número 4688090815. Esse estudo foi realizado em duas propriedades comerciais nos municípios de Xanxerê-SC (Propriedade 1) e Faxinal dos Guedes-SC (Propriedade 2) com sistema de semi-confinamento. A propriedade 1 alojava 46 animais de peso médio de 630 kg, com média de produção de 22 litros de leite por dia, e a propriedade 2 alojava 34 animais de peso médio 580 kg, com média de produção de 24 litros de leite por dia. No período de 60 dias antes do parto até os 30 dias antes parto os animais se alimentavam com volumoso e concentrado mineral comercial. No período pré-parto (30 dias antes do parto), os animais recebiam volumoso e concentrado aniônico comercial. No período de lactação as vacas recebiam volumoso e concentrado. A composição química da dieta e a recomendação do National Research Council (NRC, 2001) das dietas das propriedades estão descritas nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Recomendação do National Research Council (NRC, 2001) das dietas de vacas secas e em lactação, e composição química da dieta total no período pré-parto e lactação da propriedade 1

	Recomendação NRC (2001) Dieta 1 ¹	Dieta 1 ² Verão	Dieta 1 ³ Inverno	Recomendação NRC (2001) Dieta 2 ⁴	Dieta 2 ⁵ Verão e Inverno	Recomendação NRC (2001) Dieta 3 ⁶	Dieta 3 ⁷ (Verão)	Dieta 4 ⁸ (Inverno)
MS (%)	30	19,3	18,4	18,4	32,2	35	36,3	29,3
PB (%)	12	14,5	11	12	11,1	15	13,5	16,6
FDN (%)	33	29,1	66	33	42	33	37,4	37
FDA (%)	21	61,3	24,5	21	26,1	21	20,9	21
NDT (%)	51	55	55,3	51	69,6	66	68,9	73,5
CNF (%)	Max.42	17,5	6,1	Max.42	49	37	39,7	39,5
Amido (%)	Max.25	7,6	1,0	Max.25	26	27	29,3	28
Lipídeo (%)	.	2,1	2,6	.	2,6	3,5	2,4	2,6
Cu (mg/kg)	18	8	1	18	21	18	19	20
Zn (mg/kg)	43	65	1	43	26	43	28	35
Se (mg/kg)	0,3	0,5	0,01	0,3	0,66	0,3	0,56	57
Mn (mg/kg)	14	88	2	14	63	14	51	51

¹ Recomendação NRC (2001) para dieta -60 aos -30 dias antes do parto. ² Dieta -60 ao -30 dias antes do parto verão. ³ Dieta -60 ao -30 dias antes do parto inverno. ⁴ Recomendação NRC (2001) para dieta -30 ao dia do parto. ⁵ Dieta -30 ao dia do parto verão e inverno. ⁶ Recomendação NRC (2001) para dieta lactação (vacas de peso médio 630 kg e produzindo 22 litros de leite por dia). ⁷ Dieta lactação verão. ⁸ Dieta lactação inverno.

Tabela 2: Recomendação do National Research Council (2001) das dietas de vacas secas e em lactação, e composição química da dieta total no período pré-parto e lactação da propriedade 2

	Recomendação NRC (2001) Dieta 1 ¹	Dieta 1 ² Verão	Dieta 1 ³ Inverno	Recomendação NRC (2001) Dieta 2 ⁴	Dieta 2 ⁵ Verão	Dieta 2 ⁶ Inverno	Recomendação NRC (2001) Dieta 3 ⁷	Dieta 3 ⁸ Verão	Dieta 3 ⁹ Inverno
MS (%)	30	18,4	22	18,4	32,4	33	32	32,8	26
PB (%)	12	17,7	11,3	12	15,4	13,8	16	14,3	16,4
FDN (%)	33	67,2	68	33	53,5	56,1	32	46	38,3
FDA (%)	21	37	27	21	27	25,5	21	24,8	19,8
NDT (%)	51	58,5	57,3	51	66,7	45,9	72	69,3	70,4
CNF (%)	Max.42	10,7	6	Max.42	25,9	27,2	38	34,3	39,8
Amido (%)	Max.25	3,9	1	Max.25	18	5	28,5	25	25,5
Lipídeo (%)	.	1,8	2,4	.	2,1	2,4	3,5	2,3	2,7
Cu (mg/kg)	18	39	21	18	12	17	18	13	13
Zn (mg/kg)	43	34	9	43	0,61	14	43	68	79
Se (mg/kg)	0,3	0,56	0,58	0,3	0,69	0,47	0,3	0,51	0,53
Mn	14	78	1	14	31	5	14	27	50

(mg/kg)

¹ Recomendação NRC (2001) dieta para -60 aos -30 dias antes do parto. ² Dieta -60 ao -30 dias antes do parto verão. ³ Dieta -60 ao -30 dias antes do parto inverno. ⁴ Recomendação NRC (2001) para dieta -30 ao dia do parto. ⁵ Dieta -30 ao dia do parto verão. ⁶ Dieta -30 ao dia do parto inverno. ⁷ Recomendação NRC (2001) para dieta lactação (vacas de peso médio 580 kg e produzindo 24 litros de leite por dia). ⁸ Dieta lactação verão. ⁹ Dieta lactação inverno.

Os animais foram divididos em dois grupos: grupo animais que receberam minerais traços e vitaminas A e E injetáveis (GMTV) (n=30) e grupo controle (GC) (n=30). A administração injetável mineral e vitamínica foi realizada por via subcutânea, com cinco ml do produto contendo 10 mg/ml de cobre (como edetato), 40 mg/ml de zinco (como edetato), 10 mg/ml de magnésio (como edetato) e 5 mg/ml de selênio (como selenito de sódio) (Adaptador®min, cobre, zinco, selênio, manganês, Biogenesis Bagó, Argentina) e cinco ml do produto contendo 35 mg/ml de vitamina A (como palmitato) e 50 mg/ml de vitamina E (como acetato) (Adaptador®vit, vitamina A, vitamina E, Biogenesis Bagó, Argentina). Os minerais e as vitaminas foram administrados aos 225 dias de gestação, 255 dias de gestação e no dia do parto. O grupo GC recebeu injeções de cinco ml de cloreto de sódio, NaCl 0,9%, por via subcutânea, nos mesmos períodos. As coletas das amostras de sangue foram realizadas: M1 (21 dias pré-parto), M2 (14 pré-parto), M3 (sete dias pré-parto), M4 (dia do parto), M5 (sete dias após o parto), M6 (14 dias após o parto) e M7 (21 dias após o parto).

A atividade sérica das enzimas glutathione peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) foram determinadas em analisador bioquímico automático marca Randox® (modelo RX Daytona®) utilizando-se kits comerciais Randox® (RANSOD® e RANSEL®), como descrito por Woolliams et al. (1983) e Paglia e Valentine (1967), respectivamente. A peroxidação lipídica foi mensurada mediante produção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) de acordo com técnica descrita por Ohkawa et al. (1979). O metabolismo oxidativo dos neutrófilos foi determinado pelo teste de redução do nitrozol de tetrazólio estimulado ou não com partículas de Zymosan, utilizando-se com kit comercial, conforme método citoquímico descrito por Ciarlini et al. (2002). As avaliações do número total de leucócitos e o diferencial de leucócitos foram realizadas por meio de técnicas de macrodiluição preconizadas por Weiss e Wardrop (2006).

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, sendo os tratamentos formados pelos grupamentos: grupo de animais que receberam minerais traços e vitaminas A e E injetáveis (GMTV) e grupo controle (GC). Os dados foram submetidos à análise de variância, com medidas repetidas no tempo dentro da variável aleatória vaca. Utilizando-se o procedimento MIXED do pacote estatístico SAS, com estrutura de covariância autoregressiva, baseado no critério de informação de Akaike (AIC). Os dados foram previamente testados para normalidade dos resíduos pelo Teste de Shapiro-Wilk. Foram consideradas significativas as diferenças ao nível de 5% de significância e tendência ao nível de 10%.

Resultados e Discussão

Não houve diferença significativa do tratamento entre os grupos GMTV e GC para a atividade da enzima SOD ($P=0,1494$). No entanto, observou-se efeito significativo da interação entre tratamento e dia ($P=0,0123$) (Tab. 3). A enzima SOD exibiu maior atividade sete dias antes do parto e 14 dias após o parto no grupo de fêmeas GMTV (Fig. 1a), sendo, provavelmente, um reflexo da administração do Cu e Zn que são co-fatores funcionais da SOD. Sabe-se que o Cu e Zn estão ligados em um mecanismo antioxidante envolvendo a enzima SOD, sendo esta responsável pela dismutação do radical superóxido, que é a primeira espécie reativa envolvida em processos oxidativos (Halliwell e Gutteridge, 2007). Machado et al. (2014) avaliaram o uso de injeções subcutâneas de um multimineral (contendo Zn, Mn, Se e Cu) e verificaram que houve aumento da atividade da enzima SOD até 100 dias após o parto nas fêmeas suplementadas, o que significa melhora na resposta antioxidante, assim como observado em nosso estudo.

Quanto a enzima GPx não observou-se diferença entre os tratamentos GMTV e GC ($P=0,1650$), porém observou-se efeito significativo de dia ($P=0,0366$) (Tab. 3), onde houve redução da atividade desta enzima no dia do parto, chegando ao menor nível na primeira semana após o parto, período em que a mesma se manteve em níveis mais baixos tanto em fêmeas GMTV, quanto nas fêmeas GC (Fig. 1b). No entanto, o decréscimo na atividade da GPx foi mais acentuado nos animais do grupo controle (GC), fato que pode estar relacionado a administração injetável de Se. Nakov et al. (2016) também verificaram que houve redução na atividade sérica tanto da enzima GPx, quanto da enzima SOD próximo ao parto, só ocorrendo seus aumentos aos 21 dias de lactação. Aumentos nas concentrações de Se estão relacionados com maior atividade da enzima GPx, já que este elemento é parte integrante dessa enzima (Rukgauer et al., 2001), a qual atua no sistema antioxidante celular convertendo peróxido de hidrogênio a água. Além de atuar no sistema antioxidante o Se também está relacionado à melhora da função imune (Sordillo, 2013). Weiss et al. (1990) realizaram pesquisa em rebanhos leiteiros comerciais e observaram que bovinos com altas concentrações de Se e de Vitamina E no soro tiveram menor incidência de mastite clínica. De acordo com esses autores, este efeito pode ser devido, em parte, à estreita ligação entre a vitamina E e Se e a função dos neutrófilos.

Os dados referentes ao TBARS podem ser observados na Tab. 3. Não houve diferença significativa entre os tratamentos GMTV e GC ($P=0,2059$), mas houve efeito significativo para interação entre tratamento e dia ($P=0,0482$) e efeito significativo de dia ($P=0,0018$), os quais podem ser observados na Fig. 1c. Fêmeas GMTV mostraram valores

médios menores de TBARS durante os momentos experimentais comparados às GC, exceto, aos sete dias onde se observou um incremento nos valores do TBARS nas fêmeas GMTV. As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico são um indicativo de peroxidação lipídica, e teores aumentados depois do parto podem indicar desbalanço entre substâncias oxidantes e antioxidantes (Bouwstra et al. 2010). Chandra et al. (2013) relataram aumento de TBARS após o parto. Além disso, esses autores verificaram que a concentração de TBARS foi menor em vacas tratadas com vitamina E e Zn comparadas às vacas controle, fato que relacionaram à capacidade da vitamina E e do Zn em neutralizar a formação de ERO durante o pré e pós-parto. Em nosso estudo, apesar de maiores valores numéricos do TBARS aos sete dias pós-parto no GMTV (Fig. 1c) observou-se que houve, neste mesmo momento experimental, uma redução na atividade da SOD e GPx em ambos os grupos (Fig 1a. e 1b). No entanto, esta redução foi bem menos expressiva no GMTV, quando comparado ao GC.

Tabela 3: Médias dos quadrados mínimos \pm erros-padrão das médias (EPM) e valor de P para: superóxido dismutase (SOD) (Ug/Hb), glutathiona peroxidase (GPx) (Ug/Hb) e teores de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS (μ mol MDA/ml), em fêmeas Holandesas que receberam minerais traços e vitaminas A e E injetáveis (GMTV) e grupo controle (GC)

Variável	Grupo	Médias e EPM	<i>P</i> Tratamento	<i>P</i> Dia	<i>P</i> Tratamento*Dia
SOD	GMTV	3076,57 \pm 117,17 ^a	0,1494	0,7877	0,0123
	Controle	2868,08 \pm 102,31 ^a			
GPx	GMTV	417,99 \pm 16,5048 ^a	0,1650	0,0366	0,9440
	Controle	388,43 \pm 15,0065 ^a			
TBARS	GMTV	8,4872 \pm 0,8225 ^a	0,2059	0,0018	0,0482
	Controle	9,8665 \pm 0,7120 ^a			

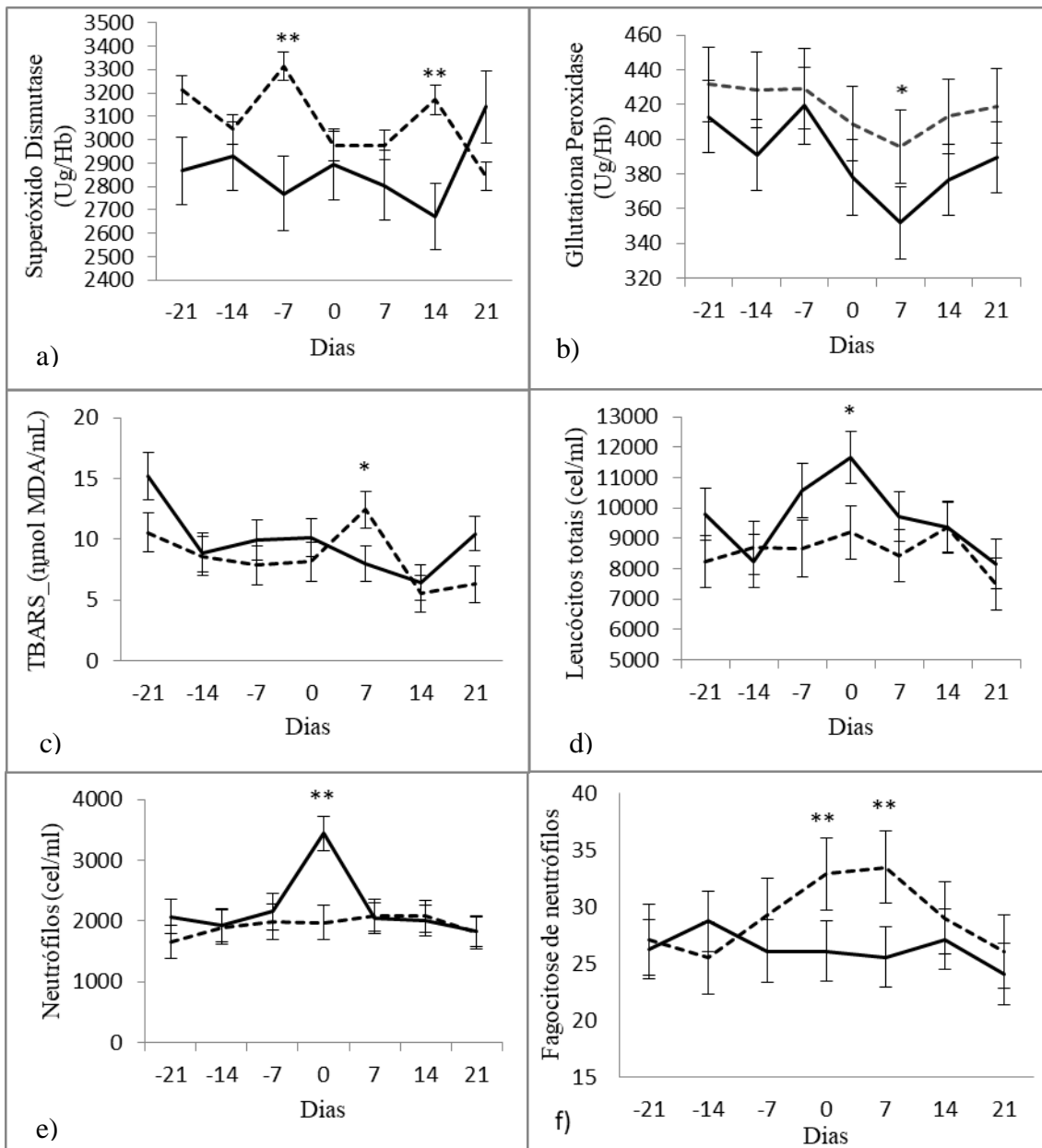
A avaliação de leucócitos totais e diferenciais pode ser visualizada na Tab. 4. Não houve diferença significativa entre os tratamentos GMTV e GC para leucócitos totais ($P=0,1734$), neutrófilos ($P=0,1942$), bastonetes ($0,2453$), eosinófilos ($P=0,1632$), monócitos ($P=0,8272$), linfócitos ($P=0,2614$) e basófilos ($P=0,6917$). Apenas se observou efeito significativo de dia para leucócitos totais ($P=0,0093$), onde no dia parto observou-se expressiva elevação nas fêmeas do GC, (Fig. 2d). Também houve efeito significativo de dia ($P=0,0104$) e para a interação tratamento e dia ($P=0,0195$) para neutrófilos (Fig. 1e), onde houve elevação de neutrófilos nas fêmeas GC, principalmente no dia do parto.

Segundo Sault e Birgel Junior (2006) é sabido que próximo ao parto ocorrem intensas

modificações no leucograma, sendo que essas alterações, são caracterizadas por leucocitose devido a neutrofilia e eosinopenia, decorrentes do aumento da secreção de hormônios da córtex adrenal, interferindo na função imune desses animais, incluindo a função dos neutrófilos, a resposta dos linfócitos à estimulação mitogênica e a resposta de anticorpos (Kehrli et al., 2006). Em nosso estudo pode-se observar que fêmeas do GC tiveram elevação de leucócitos e neutrófilos próximo ao parto, e isso demonstra que houve maior recrutamento de leucócitos e neutrófilos, em relação às fêmeas GMTV (Fig. 1d e Fig. 1e). Este fato pode estar diretamente ligado ao efeito dos minerais traços e vitaminas A e E, sendo que esses elementos foram capazes de modular a resposta imune nas fêmeas GMTV. Torre et al. (1996) verificaram que neutrófilos de novilhas alimentadas com dieta deficiente em Cu apresentaram redução da morte de *Staphylococcus aureus* aproximadamente 35 dias pós-parto. Cebra et al. (2003) observaram que neutrófilos obtidos de vacas com alta concentração sanguínea de Se tinham maior potencial para produzir superóxido e matar bactérias patogênicas. Hogan et al. (1992) observaram que a administração oral ou parenteral de vitamina E em vacas leiteiras periparturientes não afetou a atividade fagocítica dos neutrófilos, mas melhorou sua capacidade em matar bactérias.

Tabela 4: Médias dos quadrados mínimos \pm erros-padrão das médias (EPM) e valor de P para: leucócitos totais, neutrófilos, bastonetes, eosinófilos, linfócitos, monócitos e basófilos, em fêmeas Holandesas que receberam minerais traços e vitaminas A e E injetáveis (GMTV) e grupo controle (GC)

Variável	Grupo	Médias e EPM	P _{Tratamento}	P _{Dia}	P _{Tratamento*Dia}
Leucócitos totais	GMTV	8576,65 \pm 532,98 ^a	0,1734	0,0093	0,3604
	Controle	9644,54 \pm 604,44 ^a			
Neutrófilos	GMTV	1929,86 \pm 166,48 ^a	0,1942	0,0104	0,0195
	Controle	2212,12 \pm 142,17 ^a			
Bastonetes	GMTV	513 \pm 68,2763 ^a	0,2453	0,157	0,7476
	Controle	617,16 \pm 60,0595 ^a			
Eosinófilos	GMTV	360,59 \pm 45,2555 ^A	0,1632	0,3024	0,8213
	Controle	443,64 \pm 39,3602 ^a			
Monócitos	GMTV	1033,00 \pm 75,83 ^a	0,8272	0,3622	0,6852
	Controle	1011,75 \pm 61,70 ^a			
Linfócitos	GMTV	4604,00 \pm 436,65 ^a	0,2614	0,0843	0,6110
	Controle	5241,47 \pm 395,10 ^a			
Basófilos	GMTV	180,32 \pm 22,6703 ^a	0,6917	0,5028	0,1920
	Controle	192,21 \pm 19,7348 ^a			



a) Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD (Ug/Hb) em função das semanas em lactação em fêmeas dos grupos GMTV (- - -) ou GC (—); b) Atividade da enzima Glutathione Peroxidase (GPx (Ug/Hb) em função das semanas em lactação em fêmeas dos grupos GMTV (- - -) ou GC (—); c) Produção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (nmol MDA/ml) em função das semanas em lactação em fêmeas GMTV (- - -) ou GC (—); d) Leucócitos totais (cel/ml) em função das semanas em lactação em fêmeas GMTV (- - -) ou GC (—); e) Neutrófilos (cel/ml) em função das semanas em lactação em fêmeas GMTV (- - -) ou GC (—); f) Fagocitose de neutrófilos com metabolismo ativo em função das semanas em lactação em fêmeas GMTV (- - -) ou GC (—). A barra de erros representa o padrão de erro da média. * Efeito significativo de dia. ** Efeito significatido entre interação tratamento e dia.

Figura 1: Valores medianos dos parâmetros oxidativos de vacas Holandesas no período de transição

Os resultados referentes ao metabolismo oxidativo e fagocitose dos neutrófilos podem ser visualizados na Tab. 5. Não houve diferença entre os tratamentos GMTV e GC para metabolismo oxidativo basal ($P=0,2495$), metabolismo oxidativo estimulado ($P=0,1098$), fagocitose de neutrófilos ($P= 0,7010$) e nem para fagocitose de neutrófilos com metabolismo ativo ($0,4199$). Porém, observou-se efeito da interação tratamento e dia para fagocitose de neutrófilos com metabolismo ativo ($P=0,0462$), onde fêmeas GMTV tiveram maior fagocitose por neutrófilos no dia do parto e sete dia após o parto (Fig. 2f), sugerindo que o uso dos minerais traços e vitaminas A e E melhoraram a função imune dessas fêmeas nesse período.

Boyne e Arthur (1979) avaliaram a função de neutrófilos pelo teste de NBT em bezerros da raça Holandesa e verificaram que o grupo de animais com dieta deficiente em selênio tinham atividade inferior ao grupo com dieta com teores de selênio adequada. Fonquete et al. (2013) estudando avaliaram o leucograma e metabolismo oxidativo de neutrófilos em cabras da raça Saanen e não detectaram diferença no metabolismo oxidativo dos neutrófilos nos períodos de gestação, parto e pós-parto. A redução do NBT tem uma estreita correlação com o metabolismo oxidativo e avalia um importante componente da atividade bactericida do neutrófilo (Roth et al. 1983). A maior produção de substâncias oxidativas no interior do neutrófilo, ocasionada pelo aumento da atividade respiratória desta célula, é importante para a adequada eficiência deste processo de defesa (Tizard, 2000). Desta forma, podemos observar maior atividade de neutrófilos medidos pelo NBT em fêmeas do grupo GMTV e isto associado ao menor número de leucócitos e neutrófilos nesse mesmo período, confere melhor imunidade a estes animais.

Tabela 5: Médias dos quadrados mínimos \pm erros-padrão das médias (EPM) e valor de P para: Metabolismo oxidativo basal, Metabolismo oxidativo estimulado, Fagocitose de neutrófilos e Fagocitose e metabolismo oxidativo, em fêmeas Holandesas que receberam minerais traços e vitaminas A e E injetáveis (GMTV) e grupo controle (GC)

Variável	Grupo	Médias e EPM	$P_{\text{Tratamento}}$	P_{Dia}	$P_{\text{Tratamento} \times \text{Dia}}$
Metabolismo oxidativo basal	GMTV	53,0820 \pm 2,5135 ^a	0,2495	0,1219	0,4691
	C	56,7478 \pm 1,9833 ^a			
Metabolismo oxidativo estimulado	GMTV	21,0165 \pm 1,6250 ^a	0,1098	0,1924	0,5305
	C	21,0165 \pm 1,6250 ^a			
Fagocitose de Neutrófilos	GMTV	26,5300 \pm 2,1221 ^a	0,7010	0,1389	0,5513
	C	25,5049 \pm 1,6623 ^a			
Fagocitose e metabolismo oxidativo	GMTV	29,0363 \pm 2,7298 ^a	0,4199	0,2048	0,0462
	C	26,2700 \pm 2,1317 ^a			

Conclusão

Em conclusão, animais com dietas adequadas e moderada produção leiteira apresentaram pouca resposta ao uso de metafiláticos. No entanto, observamos com esse estudo que fêmeas que receberam administração subcutânea com minerais traços e vitaminas A e E, tiveram incremento da enzima SOD e fagocitose de neutrófilos com metabolismo ativo. Isso reforça a ligação entre minerais traços e vitaminas ao sistema imune de bovinos, especialmente no período de transição, o qual está ligado à diminuída resposta imune.

Referências

- BOYNE, R.; ARTHUR, J.R. Alterations of neutrophil function in selenium-deficient cattle. *J. Comp. Patoh.*, vol. 89, p. 151, 1979.
- BOUWSTRA, R.J.; NIELEN, M.; NEWBOLD, J.R.; JANSEN, E. H.; et al. Vitamin E supplementation during the dry period in dairy cattle. Part II: Oxidative stress following vitamin E supplementation may increase clinical mastitis incidence postpartum. *J. Dairy Scie*, v. 93, p. 5696-5706, 2010.
- CEBRA, C.K.; HEIDEL, J.R.; CRISMAN, R.O.; STANG, B.V. Relationship between endogenous cortisol, blood micronutrients, and netrophil function in postparturient Holstein cows. *Jour. Vet. Int. Med.*, vol. 17, n. 6, p. 902–907, 2003.

CIARLINI, P. C.; CIARLINI, L.D.R.P.; ALENCAR, N.X. et al. Metabolismo oxidativo de neutrófilos em ovelhas naturalmente infectadas por nematóides gastrointestinais e correlação com o nível sérico de cortisol e carga parasitária. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v. 54, n. 3, p. 1-7, 2002.

CHANDRA, G.; AGGARWAL, A.; SINGH, A.K. KUMAR, M. Effect of vitamin E and zinc supplementation on energy metabolites, lipid peroxidation, and milk production in peripartum sahiwal cows. *Asian-Australas J. Ani. Sci.*, v. 26, p. 1569-1576, 2013.

CONTRERAS, G.A.; SORDILLO, L.M. Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, v.34, p. 281-289, 2011.

FONQUETE, J. H.; SAITO, M.R.; BARIONI, G.; VALENTE, A. C. S.; TAKAHIRA, R. K.; KOHAYAGAWA, A. Leucograma e metabolismo oxidativo de neutrófilos em cabras da raça Saanen nos períodos de gestação, parto e pós-parto. *Pes. Vet. Bras.*, v. 33, n. 1, p.63-70, 2013.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in Biology and Medicine. Oxford: CLARENDON PRESS, 2007. 851p.

HAMMON D.S.; EVIEN, I. M.; DHIMAN, T.R. et al. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Vet. Imm. Imm.*, v. 113, p. 21-29, 2006.

HOGAN, J.S., WEISS, W.P., TODHUNTER, D.A. et al. Bovine neutrophil responses to parenteral vitamin E. *J. Dairy Sci* , v.73, p. 399–405,1992.

KEHRLI JR., M.E., NEILL, J.D., BURVENICH, C. et al. Energy and protein effects on the immune system. In: Sejrsen, K., Hvelplund, T., Nielsen, M.O. (Eds.), *Rum. Phy.*, p. 455–471, 2006.

MACHADO, V.S.; OIKONOMOU, G.; LIMA, S.F. et al. The effect of injectable trace minerals (selenium, copper, zinc, and manganese) on peripheral blood leukocyte activity and serum superoxide dismutase activity of lactating Holstein cows. *The Vet. J.*, v. 200, p. 299–304, 2014.

RIKGAUER, M.; NEUGEBAUER, R. J.; PLECKO, T. The relation between selenium, zinc and copper concentration and the trace element dependent antioxidative status. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, v.15, p. 73-78 , 2001.

NAKOV, D.; ANDONOV, S.; TRAJCHEV, M. Antioxidant status in dairy cows during transition period. *J. Agr., Food Env. Sc.*,v. 68, p. 1-8, 2016.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 7.ed. Washington: D.C., 2001. 381 p.

OHKAWA H; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Ana. Bio.*, v. 95, p. 351-358,1979.

PAGLIA D.E., VALENTINE W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Cli. Med.*, v. 70, 158–169, 1967.

ROTH J.A., KAEBERLE M.L., APPELL L.H. & NACHREINER R.F. Association of increased estradiol and progesterone blood values with altered bovine polymorphonuclear leukocyte function. *Am. J. Vet. Res.*, v. 44, p. 247-253, 1983.

SAULT, J.P.E.; BIRGEL JUNIOR, E.H. Influência do período pós-parto sobre o leucograma de fêmeas bovinas da raça holandesa. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, v. 43, p. 588-597, 2006.

SORDILLO, L. M.; S. L. AITKEN. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Vet. Imm. Immunopat.*, v. 128, p. 104–109, 2009.

SORDILLO, L.M. Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Livest. Prod. Sci.*, v. 98, p. 89-99, 2005.

SORDILLO, L.M.; RAPHAEL, W. Significance of metabolic stress, lipid mobilization, and inflammation on transition cow disorders. *Vet. Clin. of North Am.: Food and Prac.*, v. 29, p. 267-278, 2013.

TIZARD, I.R. (Ed). *Veterinary immunology: an introduction*. London: SAUNDERS COMPANY, 2000. 482p.

TORRE, P.M., HARMON, R.J., HEMKEN, R.W.; et al. Mild dietary copper insufficiency depresses blood neutrophil function in dairy cattle. *J. Nut. Imm.*, v. 4, p. 3–24, 1996.

TRALL, M.A. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*, 1^a ed. São Paulo, Roca. 2007. 582 p.

VILLAR, D.; ARTHUR, J.R.; GONZALEZ, J.M.; PALLARES, F.J. Selenium status in cattle: interpretation of laboratory results. *Bov Pract*, v.36, p.73–80, 2002.

XIN, Z., WATERMAN, D.F., HEMKEN, R.W. et al. Copper status and requirement during the dry period and early lactation in multiparous Holstein cows. *J.Dairy Scie.*, v. 76, p. 2711–2716, 1993.

ZERBE, H. Altered functional and immunophenotypical properties of neutrophilic granulocytes in postpartum cows associated with fatty liver. *Theriogenology*, v. 54, p. 771–766, 2000.

WEISS, W.P.; HOGAN, J.S.; SMITH, K.L. et al. Relationships among selenium, vitamin E, and mammary gland health in commercial dairy herds. *J.Dairy Scie*, v. 73, p .81, 1990.

WEISS D.J., WARDROP, J.K. *Schalm's veterinary hematology*. Philadelphia: LEA & FEBIGER, 2006. 1344 p.

WOOLLIAMS J.A.; WIENER G.; ANDERSON P.H. et al. Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood in various breed crosses of sheep. *Res. Vet. Sci.*, v. 34, p. 253–256, 1983.

5 ARTIGO II

Artigo a ser submetido ao periódico Semina – Ciências Agrárias. Universidade Estadual de Londrina (UEL)

Efeito do uso de minerais traços (cobre, zinco, selênio e manganês) e vitaminas A e E sobre o perfil metabólico de vacas Holandesas no período de transição

Effect of the use of trace minerals (copper, zinc, selenium and manganese) and vitamins A and E on the metabolic profile of Holstein cows in transition period

Collet, S. G.^{1*}; Souza, R. S.⁴; Ortolani, E. L.⁴; Thaler Neto, A.⁵; Carpeggiani, M.C.²; Ferronato, T.C.²; Taffarel, G.V.²; Demeda, M. A.²; Leal, M. L. R.¹

¹ Universidade Federal de Santa Maria - UFSM- Santa Maria, RS.

² Universidade do Oeste de Santa Catarina – UNOESC – Xanxerê, SC.

⁴ Universidade de São Paulo - USP - São Paulo, SP.

⁵ Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC – Lages, SC.

* Autor para correspondência: silvana.collet@unoesc.edu.br

Resumo

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito metafilático de doses subcutâneas de minerais traços (cobre, zinco, selênio e manganês) e vitaminas A e E, sobre parâmetros bioquímicos e hormonais de vacas holandesas no período de transição. Sessenta animais foram divididos em dois grupos: animais que receberam doses de minerais traços e vitaminas (GMTV) (n=30) e Controle (GC) (n=30). As coletas das amostras de sangue foram realizadas nos seguintes momentos: M1 (21 dias pré-parto), M2 (14 dias pré-parto), M3 (sete dias pré-parto), M4 (dia do parto), M5 (sete dias após o parto), M6 (14 dias após o parto) e M7 (21 dias após o parto). Não houve diferença entre tratamento e interação tratamento x dia nos parâmetros avaliados. No entanto, para algumas variáveis houve diferença significativa de dia. Os teores de AGNES ($P < 0,0001$) foram maiores no dia do parto. As concentrações de BHBA foram maiores após o parto ($P = 0,0031$), alcançando o pico na terceira semana de lactação. A frutamina exibiu valores crescentes até o dia do parto ($P = 0,0373$), onde se observou maiores concentrações. Os

valores médios de HDL foram mais elevados 21 dias após o parto ($P < 0,0001$). Os teores de triglicérides mantiveram-se com valores altos no período pré-parto, porém apresentaram queda brusca no dia do parto ($P < 0,0001$), mantendo valores mais baixos após o parto. Quanto ao cálcio sérico e ao IGF-1 observaram-se menores valores no dia do parto ($P < 0,001$). O cortisol apresentou diferença de dia com valores mais elevados no dia do parto ($P = 0,0151$). Neste estudo avaliamos o uso de minerais traços e vitaminas A e E em animais com adequado escore corporal e com pouco desafio metabólico. Desta forma observamos que a resposta ao uso de minerais traços e vitaminas nesses animais não foi significativa, porém foi possível observar que no dia do parto alguns parâmetros bioquímicos e hormonais importantes estão alterados mesmo em animais com bom estado nutricional.

Palavras-chave: período de transição, minerais traços, vitamina A, vitamina E, bioquímico, hormonal.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the metaphytic effect of subcutaneous doses of trace minerals (copper, zinc, selenium and manganese) and vitamins A and E on biochemical and hormonal parameters of Holstein cows in the transition period. Sixty animals were divided into two groups: animals receiving trace minerals and vitamins (GMTV) ($n = 30$) and control (CG) ($n = 30$). The collection of blood samples were performed in moment M1 (21 days prepartum), M2 (14 prepartum), M3 (seven days prepartum), M4 (parturition day), M5 (seven days postpartum), M6 (14 days postpartum) and M7 (21 days postpartum). There was no difference between treatment and treatment x day interaction in the evaluated parameters. However, for some variables there was significant difference of day. The AGNES levels ($P < 0.0001$) were higher at parturition day. The BHBA concentrations were higher after delivery ($P = 0.0031$), peaking at the third week of lactation. Fructosamine showed increasing values until the parturition day ($P = 0.0373$), in which higher concentrations were observed. Mean HDL values were higher 21 days postpartum ($P < 0.0001$). The triglycerides levels remained high in the prepartum period but showed a sudden drop on the day of delivery ($P < 0.0001$), maintaining lower values after delivery. Regarding serum calcium and IGF-1, lower values were observed at parturition day ($P < 0.001$) for both parameters. Cortisol presented difference of day with higher values on the parturition day ($P = 0.0151$). This study evaluated the use of trace minerals and vitamins A and E in animals with adequate body condition scoring and

with little metabolic challenge. In this way, we verified that the response in these animals was not significant, but it was possible to observe that some important biochemical and hormonal parameters were altered at parturition day, even in animals with a good nutritional level.

Keywords: transition period, trace minerals, vitamin A, vitamin E, biochemical, hormonal.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the metaphytic effect of subcutaneous doses of trace minerals (copper, zinc, selenium and manganese) and vitamins A and E on biochemical and hormonal parameters of Holstein cows in the transition period. Sixty animals were divided into two groups: animals receiving trace minerals and vitamins (GMTV) (n = 30) and control (CG) (n = 30). The collection of blood samples were performed in moment M1 (21 days prepartum), M2 (14 prepartum), M3 (seven days prepartum), M4 (parturition day), M5 (seven days postpartum), M6 (14 days postpartum) and M7 (21 days postpartum). There was no difference between treatment and treatment x day interaction in the evaluated parameters. However, for some variables there was significant difference of day. The AGNES levels (P <0.0001) were higher at parturition day. The BHBA concentrations were higher after delivery (P = 0.0031), peaking at the third week of lactation. Fructosamine showed increasing values until the parturition day (P=0.0373), in which higher concentrations were observed. Mean HDL values were higher 21 days postpartum (P <0.0001). The triglycerides levels remained high in the prepartum period, but showed a sudden drop on the day of delivery (P <0.0001), maintaining lower values after delivery. Regarding serum calcium and IGF-1, lower values were observed at parturition day (P <0.001) for both parameters. Cortisol presented difference of day with higher values on the parturition day (P =0.0151). This study evaluated the use of trace minerals and vitamins A and E in animals with adequate body condition scoring and with little metabolic challenge. In this way, we verified that the response in these animals was not significant, but it was possible to observe that some important biochemical and hormonal parameters were altered at parturition day, even in animals with a good nutritional level.

Keywords: transition period, trace minerals, vitamin A, vitamin E, biochemical, hormonal.

Introdução

É considerado período de transição para vacas leiteiras as três semanas antes e três semanas depois do parto. O termo “transição” ressalta a importância das mudanças fisiológicas, metabólicas, nutricionais e hormonais que acontecem nesse período de tempo (INGVARTSEN; MOYES, 2012). Nos dois dias que antecedem o parto, há redução na ingestão de matéria seca (IMS), sendo que o retorno ou o acréscimo acontece lentamente, não acompanhando as exigências da vaca (BLOCK, 2010; LEAN et al., 2013). Essa queda da IMS pode ser de até 30% no período periparto (HAYIRLI et al., 2002), levando ao balanço energético negativo (BEN) (ALVES et al., 2009) e ao estresse oxidativo, até quatro a oito semanas pós-parto (SORDILLO; AITKEN, 2009). O estresse oxidativo leva à redução nos mecanismos de proteção antioxidante (ULUTAS et al. 2005).

Os minerais traços desempenham papel importante na função imune de vacas leiteiras (SHANKAR; PRASAD, 1998), fertilidade (RABIEE et al., 2010) e crescimento (ENJALBERT et al., 2006). A inclusão de minerais na dieta de ruminantes não garante a ingestão ou absorção completa, principalmente no período de transição, onde a ingestão de matéria seca está diminuída (ROCHE et al., 2009), havendo a necessidade de compensar as necessidades (PEIXOTO et al., 2005). As vitaminas são compostos orgânicos necessários em pequenas quantidades, porém, quando um animal absorve uma quantidade inadequada de uma determinada vitamina, várias respostas são observadas de acordo com a vitamina e o grau e duração da deficiência. Das 14 vitaminas conhecidas, somente as vitaminas A e E tem requerimentos absolutos na dieta de vacas leiteiras, e estão ligadas ao sistema imune e antioxidante (WEISS, 2005).

Na literatura, são poucos os estudos avaliando a utilização de minerais traços e vitaminas e seu efeito sobre parâmetros metabólicos (AVCI e KIZIL, 2013; OMUR et al. 2016). Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito metafilático de doses subcutâneas de um multimineral e multivitamínico, contendo cobre (Cu), zinco (Zn), selênio (Se), manganês (Mn) e Vitamina A e E, em parâmetros bioquímicos e hormonais em vacas leiteiras no período de transição.

Material e métodos

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) (4688090815). Esse estudo foi

realizado em duas propriedades comerciais nos municípios de Xanxerê-SC (Propriedade 1) e Faxinal dos Guedes-SC (Propriedade 2) com sistema de semi-confinamento. A propriedade 1 alojava 46 animais em lactação de peso médio de 630 kg, com média de produção de 22 litros de leite por dia, e a propriedade 2 alojava 34 animais em lactação de peso médio 580 kg, com média de produção de 24 litros de leite por dia. No período de 60 dias antes do parto até os 30 dias antes parto os animais se alimentavam com volumoso e concentrado mineral comercial.

No período pré-parto (30 dias antes do parto), os animais recebiam volumoso e concentrado aniônico comercial. No período de lactação as vacas eram alimentadas com volumoso e concentrado. A composição química da dieta e a recomendação do National Research Council (NRC, 2001) das dietas das propriedades estão descritas nas Tabelas 1 e 2. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: animais que receberam minerais traços e vitaminas A e E injetáveis (GMTV) (n=30) e grupo controle (GC) (n=30).

A administração de minerais e vitaminas foi realizada por via subcutânea, com cinco ml do produto contendo 10 mg/ml de cobre (como edetato), 40 mg/ml de zinco (como edetato), 10 mg/ml de manganês (como edetato) e 5 mg/ml de selênio (como selenito de sódio) (Adaptador®min, cobre, zinco, selênio, manganês, Biogenesis Bagó, Argentina) e 5 ml do produto contendo 35 mg/ml de vitamina A (como palmitato) e 50 mg/ml de vitamina E (como acetato) (Adaptador®vit, vitamina A, vitamina E, Biogenesis Bagó, Argentina). Os minerais e as vitaminas foram administrados aos 225 dias de gestação, 265 dias de gestação e no dia do parto. O grupo GC recebeu injeções de cinco ml de cloreto de sódio, NaCl 0,9%, por via subcutânea, nos mesmos períodos. As coletas das amostras de sangue foram realizadas: M1 (21 dias pré-parto), M2 (14 pré-parto), M3 (sete dias pré-parto), M4 (dia do parto), M5 (sete dias após o parto), M6 (14 dias após o parto) e M7 (21 dias após o parto).

As amostras de sangue foram coletadas mediante punção da veia coccígea. Após a coleta, o sangue foi centrifugado por 10 minutos a 6000 rotações/minutos para obtenção do soro, que foi congelado a -20°C até o momento das análises. Amostras de soro foram utilizadas para determinar os ácidos graxos não esterificados (AGNES), o beta-hidroxibutirato (BHBA), as lipoproteínas de alta densidade (HDL), os triglicerídeos, a frutossamina, a ureia, o cálcio, a insulina, o cortisol e o fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (IGF-1). Os teores de AGNES, BHBA foram mensurados em analisador bioquímico automático Randox®, utilizando-se kits comerciais Randox®. As análises de HDL, triglicerídeos, frutossamina, cálcio e ureia foram realizadas em analisador bioquímico automático modelo Labmax® Labtest®, utilizando-se kits comerciais Labtest®. As determinações hormonais

(insulina, IGF-1 e cortisol) foram realizadas por ensaio quimiluminescente, utilizando-se kit comercial da marca Siemens® em analisador de imunoenaios Immulite 1000® (Siemens).

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, sendo os tratamentos formados pelos grupamentos: animais que receberam minerais traços e vitaminas A e E injetáveis e grupo controle. Os dados foram submetidos à análise de variância, com medidas repetidas no tempo dentro da variável aleatória vaca. Utilizando-se o procedimento MIXED do pacote estatístico SAS, com estrutura de covariância autorregressiva, baseado no critério de informação de Akaike (AIC). Os dados foram previamente testados para normalidade dos resíduos pelo Teste de Shapiro-Wilk. Foram consideradas significativas as diferenças ao nível de 5% de significância e tendência ao nível de 10%.

Resultados e Discussão

Os dados referentes aos teores de AGNES estão apresentados na Tabela 3 e Figura 1a. Não houve diferença de tratamento para os valores de AGNES ($P=0,3052$), porém observaram-se maiores valores desse metabólito, no dia do parto, em ambos os grupos ($P<0,0001$). Ramos et al. (2012), também não observaram efeito da suplementação de minerais traços nas concentrações plasmáticas de AGNES em vacas em período de transição. Sordillo e Raphael (2013) citaram que as concentrações plasmáticas de AGNES têm aumento drástico no dia do parto, com redução das concentrações séricas após o parto. Semelhante comportamento foi observado nesse estudo no GMTV e GC (Figura 1a).

De acordo com Leblanc et al. (2005), concentrações de AGNES até 0,50 mmol/L são aceitáveis, porém, valores mais elevados estão associados com aumento dos riscos de ocorrência de doenças metabólicas. Os valores médios encontrados em todos os períodos experimentais, nos animais dos dois grupos avaliados, foram inferiores a 0,50 mmol/L. No estudo de Avci e Kizil (2013), vacas que receberam minerais traços, de maneira injetável, no período de transição, tiveram diminuição dos teores de AGNES. Omur et al. (2016) utilizaram minerais traços e vitaminas A, D e E em vacas em período de transição, e observaram valores de AGNES mais elevados no grupo de vacas controle. Esses autores sugerem que os minerais traços combinados com as vitaminas possivelmente afetam a lipomobilização e o balanço energético negativo.

Também não houve diferença nos valores de BHBA entre os grupos ($P=0,7270$). No entanto, maiores valores de BHBA foram detectados na terceira semana pós-parto ($P=0,0031$) nos dois grupos avaliados (Tabela 3 e Figura 1b). Em estudos realizados por Pickett et al.

(2003) e Mecitoğlu et al. (2017), a concentração de BHBA também foi crescente após o parto, alcançando o pico na terceira semana de lactação. Vacas em que a demanda por glicose excede a capacidade gliconeogênica do fígado, tipicamente têm aumentos de BHBA 3-6 semanas pós-parto (CHAPINAL et al. 2011).

Omur et al. (2016) utilizaram minerais traços e vitaminas A, D e E, em vacas em período de transição, e observaram valores de BHBA menores no grupo de vacas tratadas em comparação com aquelas controle. Machado et al. (2014), observaram tendência de menores concentrações de BHBA em vacas que receberam minerais traços (Cu, Zn, Se e Mn) injetáveis, porém apenas em vacas acima de terceiro parto e com alto nível de produção. Não há clareza para explicar como a suplementação com minerais traços e vitaminas diminuem a concentração de BHBA. Estes autores sugerem que o aumento dos valores do BHBA está associado ao estresse oxidativo que pode ser observado em animais com alto escore corporal ao parto, e está relacionado ao estado metabólico do animal.

Os resultados de frutossamina, HDL e triglicerídeos estão exibidos na Tabela 3. Pode-se observar apenas efeito significativo de dia para esses parâmetros ($P=0,0373$, $P<0,0001$ e $P<0,0001$, para frutossamina, HDL e triglicerídeos, respectivamente). A frutossamina apresentou valores crescentes, em ambos os grupos, até o dia do parto (maior valor), com redução nos teores nas semanas subsequentes (Figura 1c). A determinação dos teores da frutossamina, que é uma proteína glicosilada, é um parâmetro confiável para a avaliação do metabolismo da glicose, pois indica a concentração da glicose de uma a três semanas anterior às medidas realizada nestes testes (THRALL, 2006). De acordo com Jensen et al. (1993), para bovinos, a faixa normal de frutossamina encontra-se entre 213 $\mu\text{mol/L}$ a 265 $\mu\text{mol/L}$. Os animais avaliados neste estudo estiveram dentro desses limites em todos os momentos experimentais.

O HDL manteve-se com valores baixos durante o período pré-parto e no dia do parto, com elevação 21 dias após o parto, momento onde houve diferença significativa ($P<0,0001$), tanto no GC, quanto no GMTV (Figura 1d). Este resultado é semelhante ao observado por Ceballos et al. (2002), que observaram valores menores dessa lipoproteína no pré-parto, devido à exigência energética necessária para o crescimento do feto e preparação da glândula mamária para a produção de leite. Omur et al. (2016) utilizaram minerais traços e vitaminas A, D e E em vacas em período de transição, em doses próximas às utilizadas em nosso estudo, e observaram teores baixos de HDL em grupos tratados ou não tanto no pré-parto como no pós parto.

Os triglicerídeos mantiveram-se com valores altos no período pré-parto, porém apresentaram queda brusca no dia do parto, mantendo valores mais baixos após o parto nos dois grupos estudados (Figura 1e). Comportamento semelhante nos valores desta variável bioquímica também foi observado no trabalho de Cupertino et al. (2011). Durante o período pré-parto há aumento da demanda energética e, por isso, aumento da lipomobilização, que acarreta em liberação de triglicerídeos (DUFFIELD e LEBLANC, 2009). Diferente de nosso estudo, Avci e Kizil (2013), observaram que o uso de solução injetável de selênio, cobre, zinco e manganês para vacas leiteiras em período de transição, diminuiu os teores de triglicerídeos. No nosso estudo a concentração de frutamina estava alta do período pré-parto até o momento do parto e, como consequência, as concentrações de glicose estavam elevadas nesse período, suprimindo a demanda energética, reduzindo a lipomobilização. Aos 21 dias após o parto, percebe-se que as concentrações de triglicerídeos aumentaram, fato explicado por Smith et al. (1997), pela lipomobilização ocasionada pelo aumento da produção de leite, que demanda grande quantidade de energia.

Os valores do cálcio sérico podem ser observados na Tabela 3. Não houve diferença significativa para tratamento entre os grupos GMTV e GC ($P=0,2657$), mas pôde-se observar efeito de dia ($P<0,0001$) (Tabela 3) (Figura 1b). Durante o período que antecede o parto, as vacas leiteiras tem maior dificuldade de manutenção da homeostase da calcemia, em particular, a fração do cálcio ionizável (ORTOLANI, 1995). Segundo o NRC (2001), valores de cálcio sérico normal devem estar acima de 8,0 mg/dL no sangue, sendo concentrações menores que 7,5 mg/dL associados a hipocalcemia subclínica.

No presente estudo, observou-se que os resultados médios de cálcio, em ambos os grupos experimentais, estavam dentro dos valores normais para a espécie. Porém, como é possível observar na Figura 1f no dia do parto houve redução dos teores sérios de cálcio No GMTV e GC. Essa diminuição de cálcio próximo ao parto é bastante relatada, pois é sabido que as vacas leiteiras mobilizam grandes quantidades de cálcio, principalmente, para a produção de colostro (GOFF, 2004).

Os valores médios de ureia dos animais do GC e GMTV podem ser observados na Tabela 3. Não houve efeito de tratamento, nem mesmo de dia e interação tratamento e dia. Durante todos os momentos experimentais os teores séricos deste metabólico mantiveram-se dentro do fisiológico para a espécie (GREGORY et al., 2004). A determinação da ureia revela informações da atividade metabólica proteica, além da relação entre energia:proteína (LÓPEZ et al., 2004).

No estudo de Omur et al. (2016) utilizando minerais traços e vitaminas A, D e E em vacas em período de transição, não houve alteração nos valores de ureia durante os momentos experimentais (pré-parto, dia do parto e pós-parto) nos animais tratados. Porém, nos animais do grupo controle houve redução dos valores séricos de ureia no pós-parto. De acordo com os autores acima citados, os animais do grupo controle tiveram essa redução de ureia pós-parto como resultado de diminuição do anabolismo protéico.

As concentrações dos hormônios insulina, IGF-1 e cortisol não diferiram entre os grupos ($p > 0,05$) (Tabela 3), porém observou-se efeito significativo de dia para o IGF-1 ($P < 0,001$) e para o cortisol ($P = 0,0151$) (Figura 1i e 1j, respectivamente), no dia do parto. Sabe-se que os hormônios insulina e fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) estão relacionados com o metabolismo basal ou deposição de nutrientes (CUNNINGHAM, 2004). A insulina é um hormônio essencialmente envolvido na regulação da concentração da glicose na circulação (FOULADI-NASHTA e CAMPBELL, 2006).

Em bovinos leiteiros a concentração plasmática de insulina declina durante o período seco e permanece baixa durante as primeiras semanas do pós-parto (MOORBY et al., 2000), com picos agudos no dia do parto (KUNZ et al., 1985). Neste estudo, não se observou redução significativa nas concentrações séricas de insulina próximo ao parto em ambos os grupos. De acordo com Bell (1995), a baixa concentração de insulina após o parto está associada à resistência a este hormônio no tecido adiposo e muscular para inibir a captação e a utilização de glicose por estes tecidos, sendo a mesma utilizada essencialmente para produção de leite.

O fato de não haver diferença entre os valores da insulina, está estritamente relacionada aos teores fisiológicos de AGNES e BHBA observados durante o período experimental, estes explicados pelo baixo desafio metabólico ao qual estes animais estavam submetidos. Ramos et al. (2012) também não observaram efeito da suplementação com minerais traços nas concentrações de insulina.

Quanto ao IGF-1 detectou-se diferença significativa de dia ($P < 0,001$) (Tabela 3). Nos dois grupos avaliados, o IGF-1 apresentou redução dos valores no dia no parto (Figura 1i). Da mesma forma Ramos et al. (2012) observou diminuição das concentrações de IGF-1 após o parto. Isto reflete a dissociação do eixo somatotrófico-IGF-1, impossibilitando o estímulo de produção de IGF-1 pelos hepatócitos (LUCY, 2008), iniciando o processo de resistência à insulina para que haja mobilização lipídica para produção de leite (PETTERSON et al, 1993). Apesar dos valores diminuídos ao parto, o IGF-1 se manteve dentro dos parâmetros considerados fisiológicos (SPICER et al., 1990), em todos os momentos

experimentais do estudo em ambos os grupos. São poucos os estudos relacionando IGF-1 e suplementação mineral em vacas leiteiras. Ramos et al. (2012) também não observaram efeito do tratamento utilizando minerais traços nesta variável.

Os teores séricos de cortisol apresentaram apenas efeito de dia ($P=0,0151$), como se observa na Tabela 3, com valores mais elevados no dia do parto nos dois grupos experimentais (Figura 1j). Outros pesquisadores também observaram comportamento semelhante deste hormônio (NIKOLIC et al., 2003; FOSBERG, 2004). Nikolic (2003), ainda observaram em seu estudo, no peri-parto de vacas leiteiras, concentrações elevadas de cortisol mesmo na terceira semana de lactação. A gliconeogênese é modulada pelo cortisol e, neste período, há grande síntese de lactose para garantir a produção leiteira, havendo necessidades de liberação de cortisol. É sabido, que no período de transição alterações hormonais e metabólicas comprometem o sistema imune dos animais. O cortisol é o hormônio que suprime a resposta imune, por causar a infra regulação da expressão de L-selectina e integrinas- $\beta 2$ (CD18) por neutrófilos, moléculas de adesão envolvidas no tráfego de neutrófilos a partir do endotélio para o local de infecção (BURTON et al., 2005).

Em nosso estudo, os animais do GMTV apresentaram valores de cortisol altos no parto, mas diminuíram na primeira semana de lactação de maneira significativa em relação ao parto, diferente dos animais do GC. Em estudo realizado pelo grupo, fêmeas do GC tiveram elevação de leucócitos e neutrófilos próximo ao parto, e isso demonstra que houve maior recrutamento de leucócitos e neutrófilos, em relação às fêmeas STMV.

Este fato pode estar diretamente ligado ao uso dos minerais traços e vitaminas A e E, sendo que esses elementos foram capazes de modular a resposta imune nas fêmeas do GMTV, no entanto, não é possível afirmar se essa relação também está envolvida com o cortisol.

Com esse estudo, podemos concluir que não houve influência do uso de minerais traços e vitaminas A e E em parâmetros metabólicos e hormonais em vacas leiteiras no período de transição.

Agradecimentos

A UNOESC (edital N°20/UNOESC-R/2015) pela viabilização dos recursos financeiros.

Referências

ALVES, N. G.; PEREIRA, M.N.; COELHO, R.M. Nutrição e reprodução em vacas leiteiras. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.6, p. 118-124, 2009.

AVCI, C.; KIZIL, O. The effects of injectable trace elements on metabolic parameters in transition cow. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, v. 19 (Suppl A), p. A73-A78, 2013.

BELL, A.W. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of Animal Science*, v.73, p.2804-2819, 1995.

BLOCK, E. Transition Cow Research – What Makes Sense Today? *Nutrition Church & Dwight Co*, v.75, p.98, 2010.

BURTON, J. L.; MADSEN, S.; CHANG, L.C.; WEBER, P.S.; BUCKMAN, K.R.; VAN DORP, R.; HICKEY, M.C.; EARLEY, B. Gene expression signatures in neutrophils exposed to glucocorticoids: A new paradigm to help explain “neutrophil dysfunction” in parturient dairy cows. *Veterinary Immunology Immunopathology*, v. 105, p. 197-219, 2005.

CEBALLOS, A.; VILLA, N.A.; BOHÓRQUEZ, A.; QUICENO, J.; JARAMILLO, M.; GIRALDO, G. Análisis de los resultados de perfiles metabólicos en lecherías del trópico alto del eje cafetero colombiano. *Revista Colombiana Ciencias Pecuária*, vol. 151, p. 26-35, 2002.

CHAPINAL N, CARSON M, DUFFIELD TF, CAPEL M, GODDEN S, OVERTON M, SANTOS JE, LEBLANC SJ. The association of serum metabolites with clinical disease during the transition period. *Journal of Dairy Science*, v. 94, p. 4897-4903, 2011.

CUNNINGHAM, J.G. *Tratado de fisiologia veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004. 579p.

CUPERTINO, C.F.; NETO, E. P.; BARCELLOS, M.P.; SENA, F.P.; LENZ, D.; BARIONI, G. Avaliação do perfil metabólico em vacas leiteiras de alta produção no período de transição. *PUBVET*, Londrina, v. 5, n.18, p. 1112-1117, 2011.

DUFFIELD, T. F.; LEBLANC, S. J. Interpretation of serum metabolic parameters around the transition period. *Southwest Nutrition and Management Conference*, p. 106-114, 2009.

ENJALBERT, F; LEBRETON, P.; SALAT, O.. Effects of copper, zinc and selenium status on performance and health in commercial dairy and beef herds: Retrospective study. *Journal of Animal Physiological Animal Nutritio.*, v. 90, p.459–466, 2006.

FOULADI-NASHTA A.A. & CAMPBELL K.H.S. Dissociation of oocyte nuclear and cytoplasmic maturation by the addition of insulin in cultured bovine antral follicles. *Reproduction*, v. 31, n. 3, p. 449-460. 2006.

FOSBERG N. Recent insights into ruminant immune function: effects of stress and of immunostimulatory feed products. In: FLORIDA RUMINANT NUTRITION SYMPOSIUM. **Proceedings...** [s.l.: s.n.], p. 81-92, 004 2004.

GOFF, J.P. Macromineral disorders of the transition cow. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 20, p.4971-494, 2004.

GREGORY, L. BIRGEL JUNIOR , E.H.; D`ANGELINO, J.L.; BENESI, F.J.; ARAÚJO, W.P.; BIRGEL, E.H. Valores de referência dos teores da uréia e creatinina em bovinos da raça Jersey criados no Estado de São Paulo. Influência dos fatores etários, sexuais e da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos. *Arquivo Instituto Biológico*, v.71, n.3, p, 339-345, 2004.

HAYIRLI, A.; HAYIRLI, A; GRUMMER, R. R.; NORDHEIM, E.V.; CRUMP, P. M. Animal and dietary factors affecting feed intake during the prefresh transition period in Holsteins. *Journal of Dairy Science*, v. 85, n. 12, p. 3430-3443, 2002.

INGVARTSEN, K. L.; MOYES K. Nutrition, immune function and health of dairy cattle. *Animal Journal*, p. 112-122, 2012.

- JENSEN, A.; PETERSEN, M.B.; HOUE, H. Determination of the fructosamine concentration in bovine serum samples. *Journal of Veterinary Medicine*, v. A, n.40, p. 111-117, 1993.
- KUNZ, P. L., J. W. BLUM, I. C. HART, H. BICKEL, AND J. LANDIS. Effects of different energy intakes before and after calving on food-intake, performance and blood hormones and metabolites in dairy cows. *Animal Production*, v. 40, p.219-231. 1985.
- LEBLANC, S.J.; LESLIE, K.E.; DUFFIELD, T.F. Metabolic predictors of displaced abomasum in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 88, v. 159-170, 2005.
- LEAN, I.J; SAUN, R.V., PETER; DEGARIS, J. Energy and protein nutrition management of transition dairy cows. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 29, p. 337-366, 2013.
- LÓPEZ, S. E.; J. LÓPEZ E W. STUMPF JR. Parâmetros séricos de vacas leiteiras na fase inicial de lactação suplementadas com diferentes fontes de gordura. *Archivos latinoamericanos de producción animal*, v.12, p.96-102, 2004.
- LUCY, M. C. Functional differences in the growth hormone and insulin-like growth factor axis in cattle and pigs: implications for post-partum nutrition and reproduction. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 43(Suppl 2), p. 31-39, 2008.
- MACHADO, V.S.; OIKONOMOU, G.; LIMA, S.F.; BICALHO, M.L.S.; KACAR, C.; FODITSCH, C.; FELIPPE, M.J.; GILBERT, R.O.; BICALHO, R.C. The effect of injectable trace minerals (selenium, copper, zinc, and manganese) on peripheral blood leukocyte activity and serum superoxide dismutase activity of lactating Holstein cows. *The Veterinary Journal*, v. 200, p. 299–304, 2014.
- MECİTOĞLU1, Z.; ÇETİN KASAP, S.;ÖZDÜVEN, M.L.; ÖZDER, M.; ENNERMAN, E. Effects of prepartum treatment with monensin or propylene glycol mixed with concentrate on milk yield and blood NEFA and BHBA levels in dairy cows. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, v. 41, p. 667-671, 2017.

MOORBY, J. M., R. J. DEWHURST, J. K. S. TWEED, M. S. DHANOA, N. F. G. BECK.. Effects of altering the energy and protein supply to dairy cows during the dry period. 2. Metabolic and hormonal responses. *Journal of Dairy Science*, v. 83, p. 1795–1805, 2000.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. 7.ed. Washington, D.C. 381 p.

NIKOLIC, J. A.; KULCSÁR, M.; KÁTAI, L.; NEDIĆ, O.; JÁNOSI, S.; HUSZENICZA, G. Periparturient endocrine and metabolic changes in health cows and in cows affected by mastitis. *Journal Veterinary Medicine*, v.50, n.1, p.22-29, 2003.

OMUR, A.; KIRBAS, A.; AKSU, E.; KANDEMIR, F.; DORMAN, E.; KAYNAR, O.; UCAR, O. Effects of antioxidant vitamins (A, D, E) and trace elements (Cu, Mn, Se, Zn) on some metabolic and reproductive profiles in dairy cows during transition period. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, v. 19, p. 697–706, 2016.

ORTOLANI, E. L. Aspectos clínicos, epidemiológicos e terapêuticos da hipocalcemia de vacas leiteiras. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 47, n. 6, p. 799-808, 1995.

OSPINA, P. A.; NYDAM, D.V.; OVERTON, T.R. Evaluation of nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. *Journal of Dairy Science*, v.93, p.546-554, 2010.

PEIXOTO, P. V.; MALAFAIA, P.; BARBOSA, J.D.; TOKARNIA, C.H. Princípios de suplementação mineral em ruminantes. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.25, n.3, p.195-200, 2005.

PETTERSON, J. A. DUNSHEA, F.R.; EHRHARDT, R.A.; BELL, A.W. Pregnancy and undernutrition alter glucose metabolic responses to insulin in sheep. *Journal of Nutrition*, v.123, p. 1286-1295, 1993.

PICKETT, M. M.; PIEPENBRINK, M. S.; OVERTON, T. R. Effects of propylene glycol or fat drench on plasma metabolites, liver composition, and production of dairy cows during the periparturient period. *Journal of Dairy Science*, v. 86, p. 2113-2121, 2003.

RABIEE, A. R.; LEAN, I.J.; STEVENSON, M.A.; SOCHA, M.T. Effects of feeding organic trace minerals on milk production and reproductive performance in lactating dairy cows: A meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, v. 93, p. 4239-4251, 2010.

RAMOS, J. M.; SOSA, C.; RUPRECHTER, G.; PESSINA, P.; CARRIQUIRY, M. Effect of organic trace minerals supplementation during early postpartum on milk composition, and metabolic and hormonal profiles in grazing dairy heifers. *Spanish Journal of Agricultural Research*, v. 10, p. 681-689, 2012.

ROCHE, J.R., FRIGGENS, N.C.; KAY, J.K.; FISHER, M.W.; STAFFORD, K.J.; BERRY, D.P. Invited review: Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *Journal of Dairy Science*, v. 9, p. 5769–5801, 2009.

SCHANKAR, A.H.; PRASAD, A. S. Zinc and immune function: The biological basis of altered resistance to infection. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 68, p. 447-463, 1998.

SMITH, T. R.; HIPPEN, A. R.; BEITZ, D. C.; YOUNG, J. W. Metabolic characteristics of induced ketosis in normal and obese dairy cows. *Journal of Animal Science*, v. 80, p 1569-1581, 1997.

SPICER, L. J.; TUCKER, W. B.; ADAMS, G. D. Insulin-like growth factor-I in dairy cows: relationships among energy balance, body condition, ovarian activity, and estrous behavior. *Journal of Animal Science*, v. 73, p. 929-937, 1990.

SORDILLO, L.M.; RAPHAEL, W. Significance of metabolic stress, lipid mobilization, and inflammation on transition cow disorders. *Veterinary Clinics of North America: Food and Practice*, v. 29, p. 267-278, 2013.

SORDILLO, L. M.; S. L. AITKEN. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 128: 104–109. 2009.

THRALL, M.A. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*, 1ª ed. São Paulo, Roca. 2007. 582 p.

ULUTAS, P.A.; SERIN, Y.; CEYLAN, A. The relationship between seminal plasma lipid peroxidation and extracellular antioxidants with some spermatological features in cock semen. *Istanbul üniversitesi veteriner fakültesi dergisi*, v.31, p. 67-74, 2005.

VASQUE-ANON, M.; BERTICS, S.; LUCK, M.; GRUMMER, R. R. Peripartum liver triglyceride and plasma metabolites in dairy cows. *Journal Dairy Science*, v. 77, p. 1521, 1994.

WEISS, W. P. Antioxidant nutrients, cow health, and milk quality. In: PENN STATE DAIRY CATTLE NUTRITION WORKSHOP. *Department of Animal Sciences*, Grantville, PA. p. 11-18. 2005.

Tabela 1: Recomendação do National Research Council (NRC, 2001) para dietas de vacas secas e em lactação, e composição química da dieta total no período pré-parto e lactação da propriedade 1

	Recomendação NRC (2001) Dieta 1 ¹	Dieta 1 ² Verão	Dieta 1 ³ Inverno	Recomendação NRC (2001) Dieta 2 ⁴	Dieta 2 ⁵ Verão e Inverno	Recomendação NRC (2001) Dieta 3 ⁶	Dieta 3 ⁷ (Verão)	Dieta 4 ⁸ (Inverno)
MS (%)	30	19,3	18,4	18,4	32,2	35	36,3	29,3
PB (%)	12	14,5	11	12	11,1	15	13,5	16,6
FDN (%)	33	29,1	66	33	42	33	37,4	37
FDA (%)	21	61,3	24,5	21	26,1	21	20,9	21
NDT (%)	51	55	55,3	51	69,6	66	68,9	73,5
CNF (%)	Max.42	17,5	6,1	Max.42	49	37	39,7	39,5
Amido (%)	Max.25	7,6	1,0	Max.25	26	27	29,3	28
Lipídeo (%)	.	2,1	2,6	.	2,6	3,5	2,4	2,6
Cu (mg/kg)	18	8	1	18	21	18	19	20
Zn (mg/kg)	43	65	1	43	26	43	28	35
Se (mg/kg)	0,3	0,5	0,01	0,3	0,66	0,3	0,56	57
Mn (mg/kg)	14	88	2	14	63	14	51	51

¹ Recomendação NRC (2001) para dieta -60 aos -30 dias antes do parto. ² Dieta -60 ao -30 dias antes do parto verão. ³ Dieta -60 ao -30 dias antes do parto inverno. ⁴ Recomendação NRC (2001) para dieta -30 ao dia do parto. ⁵ Dieta -30 ao dia do parto verão e inverno. ⁶ Recomendação NRC (2001) para dieta lactação (vacas de peso médio 630 kg e produzindo 22 litros de leite por dia). ⁷ Dieta lactação verão. ⁸ Dieta lactação inverno.

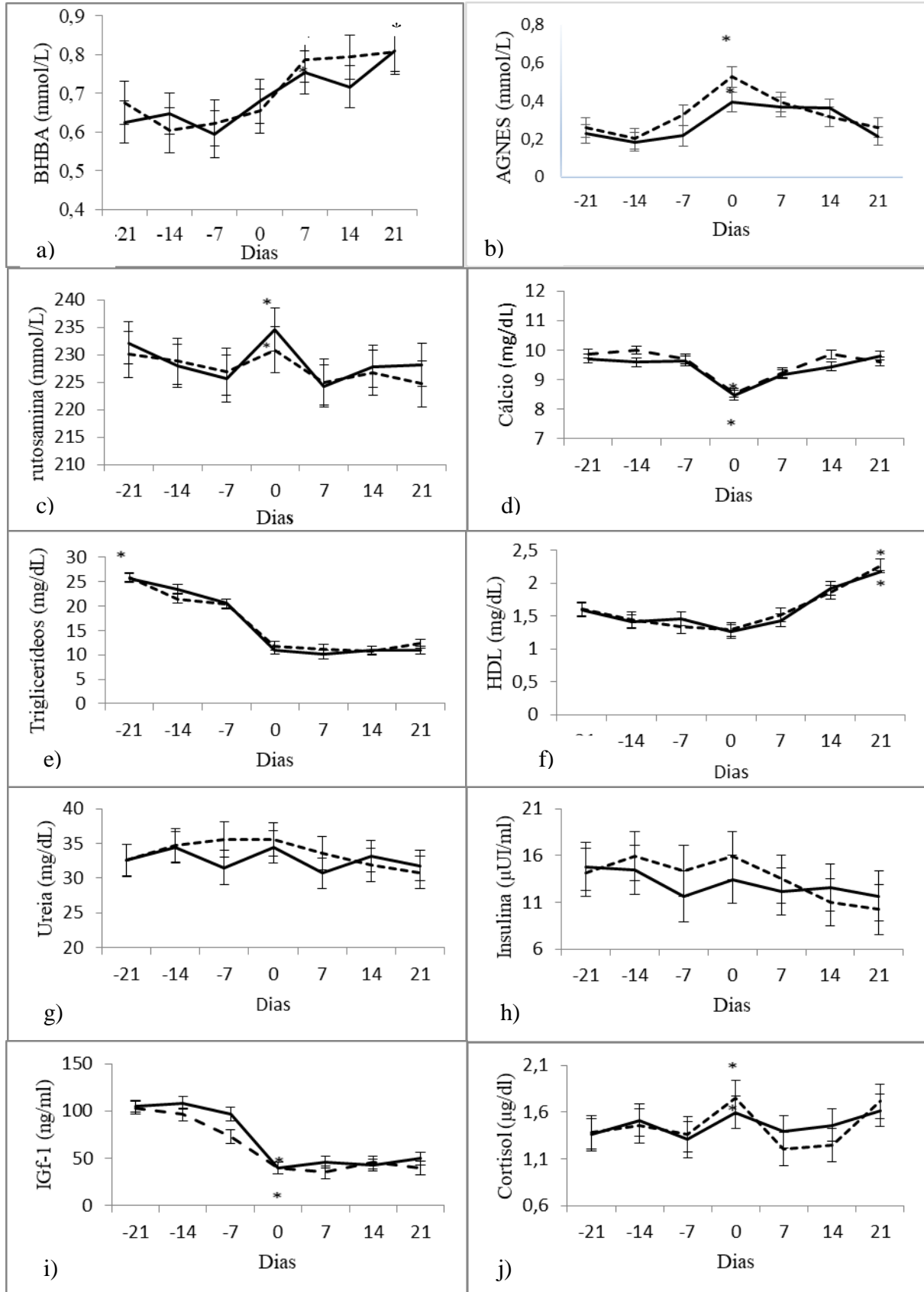
Tabela 2: Recomendação do National Research Council (2001) para dietas de vacas secas e em lactação, e composição química da dieta total no período pré-parto e lactação da propriedade 2

	Recomendação NRC (2001) Dieta 1 ¹	Dieta 1 Verão ²	Dieta 1 Inverno ³	Recomendação NRC (2001) Dieta 2 ⁴	Dieta 2 Verão ⁵	Dieta 2 Inverno ⁶	Recomendação NRC (2001) dieta 3 ⁷	Dieta 3 Verão ⁸	Dieta 3 inverno ⁹
MS (%)	30	18,4	22	18,4	32,4	33	32	32,8	26
PB (%)	12	17,7	11,3	12	15,4	13,8	16	14,3	16,4
FDN (%)	33	67,2	68	33	53,5	56,1	32	46	38,3
FDA (%)	21	37	27	21	27	25,5	21	24,8	19,8
NDT (%)	51	58,5	57,3	51	66,7	45,9	72	69,3	70,4
CNF (%)	Max.42	10,7	6	Max.42	25,9	27,2	38	34,3	39,8
Amido (%)	Max.25	3,9	1	Max.25	18	5	28,5	25	25,5
Lipídeo (%)	.	1,8	2,4	.	2,1	2,4	3,5	2,3	2,7
Cu (mg/kg)	18	39	21	18	12	17	18	13	13
Zn (mg/kg)	43	34	9	43	0,61	14	43	68	79
Se (mg/kg)	0,3	0,56	0,58	0,3	0,69	0,47	0,3	0,51	0,53
Mn (mg/kg)	14	78	1	14	31	5	14	27	50

¹ Recomendação NRC (2001) dieta para -60 aos -30 dias antes do parto. ² Dieta -60 ao -30 dias antes do parto verão. ³ Dieta -60 ao -30 dias antes do parto inverno. ⁴ Recomendação NRC (2001) para dieta -30 ao dia do parto. ⁵ Dieta -30 ao dia do parto verão. ⁶ Dieta -30 ao dia do parto inverno. ⁷ Recomendação NRC (2001) para dieta lactação (vacas de peso médio 580 kg e produzindo 24 litros de leite por dia). ⁸ Dieta lactação verão. ⁹ Dieta lactação inverno.

Tabela 3: Médias dos quadrados mínimos \pm erros-padrão das médias (EPM) e valor de P para: betahidroxibutirato (BHBA), ácidos graxos não estereificados (AGNES), frutosamina, lipoproteínas de alta densidade (HDL), triglicerídeos, ureia, cálcio, cortisol, insulina e fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (IGF-1) em fêmeas Holandesas suplementadas com minerais traços e vitaminas A e E injetáveis (GMTV) ou Controle

Variável	Grupo	Médias e EPM	$P_{\text{Tratamento}}$	P_{Dia}	P
					$\text{Tratamento} \times \text{Dia}$
AGNES (mmol/L)	GMTV	0,3253 \pm 0,03340	0,3052	<0,0001	0,5321
	Controle	0,2810 \pm 0,2798			
BHBA (mmol/L)	GMTV	0,7061 \pm 0,03579	0,7270	0,0031	0,8349
	Controle	0,6898 \pm 0,03001			
Frutosamina (mmol/L)	GMTV	227,61 \pm 3,0819	0,7866	0,0373	0,9451
	Controle	228,69 \pm 2,6411			
HDL (mg/dL)	GMTV	1,6197 \pm 0,08702	0,9385	<0,0001	0,5904
	Controle	1,6111 \pm 0,07789			
Triglicerídeos (mg/dL)	GMTV	16,2649 \pm 0,6044	0,8093	<0,0001	0,3212
	Controle	16,0750 \pm 0,5129			
Ureia (mg/dL)	GMTV	33,5154 \pm 1,6097	0,6842	0,4442	0,7824
	Controle	32,6573 \pm 1,3617			
Cálcio (mg/dL)	GMTV	9,4052 \pm 0,08333	0,2657	<0,0001	0,2055
	Controle	9,5453 \pm 0,097577			
Cortisol (μ g/dl)	GMTV	1,4446 \pm 0,1298	0,9169	0,0151	0,8070
	Controle	1,4626 \pm 0,1131			
Insulina (μ IU/ml)	GMTV	13,4879 \pm 2,5869	0,8730	0,1172	0,7678
	Controle	12,9586 \pm 2,1922			
IGF-1 (ng/ml)	GMTV	61,7617 \pm 4,8645	0,2243	<0,001	0,0658
	Controle	69,6195 \pm 4,2740			



a) Concentrações séricas de AGNES (mmol/L) em função das semanas em lactação em fêmeas dos grupos GMTV (- - -) ou GC (—); b) Concentrações séricas de BHBA (mmol/L) em função das semanas em lactação em fêmeas dos grupos GMTV (- - -) ou GC; c) Concentrações séricas de frutossamina (mmol/L) em função das semanas em lactação em fêmeas dos grupos GMTV (- - -) ou GC; d) Concentrações séricas de HDL (mg/dL) em função das semanas em lactação em fêmeas dos grupos GMTV (- - -) ou GC; e) Concentrações séricas de triglicerídeos (mg/dL) em função das semanas em lactação em fêmeas dos grupos GMTV (- - -) ou GC; f) Concentrações séricas de cálcio (mg/dL) em função das semanas em lactação em fêmeas dos grupos GMTV (- - -) ou GC; g) Concentrações séricas de ureia (mg/dL) em função das semanas em lactação em fêmeas dos grupos GMTV (- - -) ou GC; Concentrações séricas de insulina (μ UI/ml) em função das semanas em lactação em fêmeas dos grupos GMTV (- - -) ou GC; h) Concentrações séricas de IGF-1 (ng/ml) em função das semanas em lactação em fêmeas dos grupos GMTV (- - -) ou GC; Concentrações séricas de cortisol (μ g/dl) em função das semanas em lactação em fêmeas dos grupos GMTV (- - -) ou GC. A barra de erros representa o padrão de erro da média.
* Efeito significativo de dia.

Figura 1: Valores medianos dos parâmetros bioquímico e hormonal de vacas Holandesas no período de transição

6 DISCUSSÃO

Durante o período de transição, onde as vacas leiteiras saem de um momento de baixa demanda metabólica, para um momento de alta demanda metabólica, ocorrem mudanças fisiológicas, metabólicas, nutricionais e hormonais para atender as necessidades nutricionais para a produção de leite (BAUMAN & CURRIE, 1980). Nos dois dias que antecedem o parto, há redução na IMS, sendo que o retorno ou o acréscimo na ingestão acontece lentamente, não acompanhando as exigências da vaca (BLOCK, 2010; LEAN et al., 2013). Essa queda da IMS pode ser de até 30% no período periparto (HAYIRLI et al., 2002), levando a vaca ao balanço energético negativo (BEN) (ALVES et al., 2009) e ao estresse oxidativo (SORDILLO & AITKEN, 2009).

Alguns estudos indicam o envolvimento do estresse oxidativo sobre o aparecimento de doenças em vacas leiteiras, particularmente durante o período de transição (SORDILLO, 2005; SORDILLO & AITKEN, 2009). Esse período também coincide com a redução das concentrações de vitaminas e de minerais que atuam como cofatores de algumas enzimas do sistema antioxidantes, como a enzima SOD e a GPx (XIN et al., 1993). Porém, são poucos os estudos que avaliam o uso de minerais traços e vitaminas sobre a saúde de vacas leiteiras. Desta forma, neste estudo avaliou-se o uso de minerais traços na forma injetável em parâmetros do estresse oxidativo, bioquímico e hormonal de vacas holandesas em período de transição, com administração antes do parto e no dia do parto.

Em todo o estudo não foi possível observar diferença significativa de tratamento, porém, podemos verificar interação tratamento X dia em algumas variáveis analisadas. Houve incremento na atividade das enzimas SOD e GPx, e menor concentração de espécies reativas ao oxigênio em alguns momentos experimentais nos animais que receberam doses subcutâneas de minerais traços e vitaminas A e E (GMTV). No ARTIGO I, pode-se observar melhora na atividade da enzima SOD em animais GMTV, sete dias antes do parto e 14 dias após o parto, sendo, provavelmente, um reflexo da administração do Cu e Zn que são cofatores funcionais da SOD. Sabe-se que o Cu e Zn estão ligados em um mecanismo antioxidante envolvendo a enzima SOD. Machado et al. (2014), já haviam verificado aumento da atividade da enzima SOD até 100 dias após o parto, em vacas leiteiras que receberam injeções subcutâneas de um multimineral (contendo Zn, Mn, Se e Cu), o que pode estar

envolvido em melhora de resposta imune. Este estudo de Machado et al. (2014), assim como o de Machado et al. (2013), nos deu suporte em várias questões do uso de minerais traços injetáveis.

Pode-se verificar em nosso estudo, que o decréscimo da atividade da enzima GPx foi mais acentuado nos animais do grupo controle (GC), fato que pode estar relacionado a administração injetável de Se, pois, segundo Sordillo (2013) aumentos nas concentrações de Se estão relacionados com maior atividade dessa enzima. Os animais GMTV mostraram valores médios menores de TBARS na maior parte dos momentos experimentais. Há estudos na literatura que detectaram concentração de TBARS foi menor em vacas tratadas com vitamina E e Zn comparadas às vacas controle, fato que relacionaram à capacidade da vitamina E e do Zn em neutralizar a formação de ERO durante o pré e pós-parto (CHANDRA et al. 2013). Outros dados importantes observados em nosso estudo foram os aumentos de leucócitos totais e neutrófilos em fêmeas do GC, e a maior atividade de fagocitose por neutrófilos no dia do parto e sete dias após o parto em fêmeas GMTV. Este fato pode estar diretamente ligado à suplementação dos minerais traços e vitaminas A e E, sendo que esses elementos foram capazes de modular a resposta imune nas fêmeas GMTV, como observado em estudos já realizados (HOGAN et al. 1992; TORRE et al. 1996; CEBRA et al. 2003).

Também havia o questionamento quanto à interação do uso de minerais traços e vitaminas A e E nos parâmetros bioquímicos e hormonais, o qual gerou o ARTIGO II. Machado et al. (2014), observaram tendência de menor concentração de BHBA em vacas que receberam minerais traços (Cu, Zn, Se e Mn injetáveis), porém apenas em vacas acima de terceiro parto, sem haver explicação coerente para tal fato. Não se observou em nosso estudo diferenças significativa de tratamento e interação tratamento X dia nos parâmetros bioquímicos e hormonais avaliados. Mas observou-se efeito de dia para AGNESX cálcio e IGF-1 com valores diminuídos no dia do parto, e valores elevados de AGNES, cortisol no dia do parto, além de valor elevado de BHBA a partir do dia do parto, com pico da terceira semana de lactação, o que é normal do período. Também observamos que nossos rebanhos estavam com todas as concentrações dos parâmetros avaliados em concentrações fisiológicas.

As condições nutricionais dos animais desse estudo eram consideradas adequadas ao que recomenda o NRC (2001). As duas propriedades trabalhavam em sistema de semi-confinamento, com produção média que se encontrava próxima aos 25 litros de leite por dia, sendo animais de alto valor genético, e por isso, com baixo desafio nutricional. O escore de condição corporal dos animais sempre se encontrou próximo de 3,25, mesmo nas primeiras semanas após o parto e nenhum animal apresentou doença. Isto justifica a pequena

mobilização corporal e os valores normais de parâmetros metabólicos avaliados, o que dificulta a observação efeito de uso de microminerais e vitaminas como metafiláticos efeito dos elementos testados pelo baixo desafio metabólico dos animais.

7 CONCLUSÕES

Em conclusão, animais com dietas adequadas e moderada produção leiteira apresentarão pouca resposta ao uso de metafiláticos. Porém, observamos com esse estudo que fêmeas suplementadas com minerais traços e vitaminas A e E, tiveram incremento da enzima SOD e fagocitose de neutrófilos com metabolismo ativo. Isso reforça a ligação entre minerais traços e vitaminas ao sistema imune de bovinos, especialmente no período de transição, o qual está ligado à diminuída resposta imune. Nesse sentido, podemos comprovar que mesmo animais em bom *status* nutricional, mostram valores parâmetros bioquímicos e hormonais alterados no período de transição, especialmente no dia do parto.

REFERÊNCIAS

ALVES, N. G.; PEREIRA, M.N.; COELHO, R.M. Nutrição e reprodução em vacas leiteiras. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.6, p. 118-124, 2009.

BAUMAN, D. E; W. B. CURRIE. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. **Journal of Dairy Science**, v. 63, p.1514-1529, 1980.

BELL,A.W. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. **Journal of Animal Science**, v.73, p.2804-2819, 1995.

BELYEA, R. L.; ADAMS, M. W. Energy and nitrogen utilization of high versus low producing dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 73, p. 1023-1030, 1990.

BERNABUCCI, U.; RONCH, B.; LACETERA, N.; NARDONE, A. Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 2173-2179, 2002.

BICALHO, M. L. S.; LIMA, F.S.; GANDA, E.K.; FODITSCH, C.; MEIRA JR, E.B.S.; MACHADO, J.V.; TEIXEIRA, A.G.V.; OIKONOMOU, G.'GILBERT, R.O.'BICALHO, R.C.Effect of trace mineral supplementation on selected minerals, energy metabolites, oxidative stress, and immune parameters and its association with uterine diseases in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 4281-4295, 2014.

BIRD, P. R. Sulfur metabolism and excretion studies in ruminants.X. Sulfide toxicity in sheep.**Australian Journal of Biological Science**, v. 25, p. 1087– 1098, 1972.

BLOCK, E. Transition Cow Research – What Makes Sense Today? **Nutrition Church & Dwight Co., Inc. High Plains Dairy Conference 75 Amarillo, Texas**, v.75, p.98, 2010.

BOBE, G.; YOUNG, J. W.; BEITZ, D. C. Invited review: pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Iowa, v. 87, p. 3105–310, 2004.

BOYNE, R.; ARTHUR, J. R. Effects of selenium and copper deficiency on neutrophil function in cattle. **Journal of Comparative Pathology**, v. 91, p. 271-276, 1981.

BURTON, J. L.; MADSEN, S.A.; CHANG, L.C.; WEBER, P.S.; BUCKHAM, K. R.; VAN DORP, R.; HICKEY, M.C.; EARLEY, B. Gene expression signatures in neutrophils exposed to glucocorticoids: A new paradigm to help explain “neutrophil dysfunction” in parturient dairy cows. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 105, p. 197-219, 2005.

CEBALLOS, A.; VILLA, N.A.; BOHÓRQUEZ, A.; QUICENO, J.; JARAMILLO, M.; GIRALDO, G. Análisis de los resultados de perfiles metabólicos en lecherías del trópico alto del eje cafetero colombiano. *Revista Colombiana Ciências Pecuária*, vol. 151, p. 26-35, 2002.

CEBRA, C.K.; HEIDEL, J.R.; CRISMAN, R.O.; STANG, B.V. Relationship between endogenous cortisol, blood micronutrients, and neutrophil function in postparturient Holstein cows. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, vol. 17, n. 6, p. 902–907, 2003.

CHEW, B. P.; ERB, R.E.; FESSLER, J.; CALLAHAN, C.J.; MALVEN, P.V. Effects of ovariectomy during pregnancy and of prematurely induced parturition on progesterone, estrogens, and calving traits. **Journal of Dairy Science**, v. 62, p. 557-566, 1979.

CONTRERAS, G.A.; SORDILLO, L.M. Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.34, p. 281-289, 2011.

CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. GUANABARA-KOOGAN, Rio de Janeiro, RJ, 3 A ed., 2004

DRACKLEY, J.K.; OVERTON, T.R.; DOUGLAS, G. N. Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. **Journal of Dairy Science**. v. 84, p. 100-112, 2001.

ELLAH, M. R. A. Involvement of free radicals in animal diseases. **Comparative Clinical Pathology**, n. 19, p. 615-619, 2010.

ENJALBERT, F; LEBRETON, P.; SALAT, O.. Effects of copper, zinc and selenium status on performance and health in commercial dairy and beef herds: Retrospective study. **Journal of Animal Physiological Animal Nutrition.**, v. 90, p.459–466, 2006.

FORBES, J. M. The effects of sex hormones, pregnancy, and lactation on digestion,metabolism, and voluntary food intake. In: L. P. MILLIGAN et al. **Control of digestion and metabolism in ruminants**. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, 1986.

GONZÁLEZ, F.; MUINO, R.; PEREIRA, V.; CAMPOS, R.; CASTELLOTE, J. L. B. Indicadores sanguíneos de lipomobilização e função hepática no início da lactação em vacas leiteiras de alta produção. In: VIII Congresso Brasileiro de Buiatria, 6., 2009, Belo Horizonte. **Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria: Ciência Animal Brasileira**. Belo Horizonte, 2009. p. 65–67.

GRINBERG, N.; ELAZAR, S.; ROSENSHINE, I.; SHPIGEL, N.Y. Beta-hydroxybutyrate abrogates formation of bovine neutrophil extracellular traps and bactericidal activity against mammary pathogenic Escherichia coli. **Infection and Immunity**. v. 76, n. 6, p. 2802-2807, 2008.

GRUMMER, R. R.; D. G; MASHEK; A. HAYIRLI. Dry matter intake and energy balance in the transition period. **Veterinary Clinics of North America: Food and Animal Practice**, v. 20, p. 447-470, 2004.

GRUMMER, R.R. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 2820–2833, 1995.

GUYTON, A.C., HALL, J.E **Tratado De Fisiologia Médica** 9. Ed. Rj . Guanabara Koogan, 1997.

HAIDA, K. S.; DIAZ GONZÁLEZ, F.H.; PARZIANLLI, N.; LANGER, C.F.; ZANOLLA, N.; FIGUR, K.C.; BORG, L. Estudo do perfil metabólico de um rebanho leiteiro do Oeste do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.17, n.1, p.72-76, 1996.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Clarendon Press, 1989, 543 p.

HAMMON D.S. et al. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 113, p. 21-29, 2006.

HAYIRLI, A; GRUMMER, R. R.; NORDHEIM, E.V.; CRUMP, P. M. Animal and dietary factors affecting feed intake during the prefresh transition period in Holsteins. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 12, p. 3430-3443, 2002.

HOCQUETTE J.F.; BAUCHART D. Intestinal absorption, blood transport and hepatic and muscle metabolism of fatty acids in preruminant and ruminant animals. **Reproduction Nutrition Developmen** , v. 39, p.27-48, 1999.

HOGAN, J.S., WEISS, W.P., TODHUNTER, D.A., SMITH, K.L., CHOENBERG,P.S., Bovine neutrophil responses to parenteral vitamin E. **Journal of Dairy Science**, v.73, p. 399–405,1992.

JENSEN, A.; PETERSEN, M.B.; HOUE, H. Determination of the fructosamine concentration in bovine serum samples. **Journal of Veterinary Medicine**, v. A, n.40, p. 111-117, 1993.

.KANEKO, J. J. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. Academic Press Inc. San Diego, CA, 1989.

LAGO, E. P.; COSTA, A. P.D.; PIRES, A. V.; SUSIN, I.; FARIAS, V. P. F.; LAGO, L.A. Parâmetros metabólicos em vacas leiteiras durante o período de transição pós-parto. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 11, n. 1/2, p. 98-103, 2004.

LAMB, G. C.; et al. Effect of organic or inorganic trace mineral supplementation on follicular response, ovulation, and embryo production in superovulated Angus heifers. **Animal Reproduction Science**, v.106, p.221-231, 2008.

LEAN, I.J; SAUN, R.V., PETER; DEGARIS, J. Energy and protein nutrition management of transition dairy cows. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 29, p. 337-366, 2013.

LEBLANC, S. J., T. F. DUFFIELD, K. E. LESLIE, K. G. BATEMAN, J. TENHAG, J. S. WALTON, AND W. H. JOHNSON. The effect of prepartum injection of vitamin E on health in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 1416-1426, 2002.

LEBLANC, S.J.; LESLIE, K.E.; DUFFIELD, T.F. Metabolic predictors of displaced abomasum in dairy cattle. **Journal of Animal Science**, v. 88, p. 159-170, 2005.

LIMA, M. L.; BERCHIELLI, T.T.; LEME, P.R.; NOGUEIRA, J.R.; PINHEIRO, M.G. Concentração de nitrogênio uréico plasmático (NUP) e produção de leite de vacas mestiças mantidas em gramíneas tropicais sob pastejo rotacionado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, vol.33, n.6, 2004.

LOBLEY, G. E. Control of the metabolic fate of amino acids in ruminants: a review. **Journal of Animal Science**, p. 3264-3275, 1992.

LÓPEZ, S. E.; J. LÓPEZ E W. STUMPF JR. Parâmetros séricos de vacas leiteiras na fase inicial de lactação suplementadas com diferentes fontes de gordura. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v.12, p.96-102, 2004.

LUCY, M. C. Functional differences in the growth hormone and insulin-like growth factor axis in cattle and pigs: implications for post-partum nutrition and reproduction. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43(Suppl 2), p. 31-39, 2008.

McDOWELL, L.R. **Minerals in animal and human nutrition**. Elsevier, 2003. 660p.

- MACHADO, V. S.; BICALHO, M.L.S.; PEREIRA R.V.; CAIXETA L.S.; KNAUER W.A.; OIKONOMOU, G.; GILBERT, R.O.; BICALHO, R.C. The effect injectable trace minerals (selenium, copper, zinco and manganese) on peripheral blood leukocyte activity and serum superoxide dismtase activity of lactating Holstein cows. **The Veterinary Journal**, v. 197, p. 451–456, 2013.
- MACHADO, V. S.; OIKONOMOU, G.; LIMA S.F.;BICALHO, M.L.S.;KACAR, C.;FODITSCH, C.; FELIPPE, M.J.; GILBERT,R.O.; BICALHO, R.C. Effect af na injectable trace mineral supplement containing selenium, copper, zinc, and manganese on the health and production of lactating Holstein cows. **The Veterinary Journal**, v. 200, p. 299–304, 2014.
- MOORBY, J. M., R. J. DEWHURST, J. K. S. TWEED, M. S. DHANOA, AND N. F. G. BECK.. Effects of altering the energy and protein supply to dairy cows during the dry period. 2. Metabolic and hormonal responses. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1795–1805, 2000.
- MOORE, D.A.; VARGA, G. BUN and MUN: urea nitrogen testing in dairy cattle. **Compendium Continuing Education Practicing Veterinary**, v.18, p. 712-721, 1996.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. Nutrient **requirements of dairy cattle**. 7.ed. Washington, D.C.: 2001.
- NOCKELS, C.F.; DEBONIS, J.; TORRENT, J. Stress induction affects copper and zinc balance in calves fed organic and inorganic copper and zinc sources. *Journal of Animal Science*, v. 71, p.2539-2545, 1993.
- PEDREIRA, M.S.; BERCHIELLI, T.T. Minerais, In: **Nutrição de Ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 583 p., 2006.
- PEIXOTO, P. V.; MALAFAIA, P.; BARBOSA, J.D.; TOKARNIA, C.H. Princípios de suplementação mineral em ruminantes. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, n.3, p.195-200, 2005.
- PETTERSON, J. A. DUNSHEA, F.R.; EHRARDT, R.A.; BELL, A.W. Pregnancy and undernutrition alter glucose metabolic responses to insulin in sheep. **Journal of Nutrition**, v.123, p. 1286-1295, 1993.

POGGE, D.J.; RICHTER, E.L.; DREWNOSKI, M.E.; HANSEN, S.L. Mineral concentrations of plasma and liver following injection with a trace mineral complex differ among Angus and Simmental cattle. **Journal of Animal Science**, v. 90, p. 2692–2698, 2012.

POLITIS, I. M.; HIDIROGLOU, M.; BATRA, T.R.; GILMORE, J.A.; GOREWIT, R.C.; SCHERF, H. Effects of vitamin E on immune function of dairy cows. **American Journal Veterinary Research**, v. 56, p. 179–184, 1995.

RABIEE, A. R.; LEAN, I.J.; STEVENSON, M.A.; SOCHA, M.T. Effects of feeding organic trace minerals on milk production and reproductive performance in lactating dairy cows: A meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 4239–4251, 2010.

REID, J. T. Nutrition and feeding of dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 39, p.735, 1956.

ROCHE, J.R.; FRIGGENS, N.C.; KAY, J.K.; FISHER, M.W.; STAFFORD, K.J.; BERRY, D.P. Invited review: Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 5769–5801, 2009.

SCHANKAR, A.H.; PRASAD, A. S. Zinc and immune function: The biological basis of altered resistance to infection. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, p. 447–463, 1998.

SEIFI, H.A.; LEBLANC, S.J.; LESLIE, K.E.; DUFFIELD, T.F. Metabolic predictors of post-partum disease and culling risk in dairy cattle. **The Veterinary Journal**, v. 188, p. 216–220, 2011.

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

SORDILLO, L. M.; AITKEN, S. L.. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Vet. Imm. Immunopat.*, v. 128, p. 104–109, 2009.

SORDILLO, L.M.; RAPHAEL, W. Significance of metabolic stress, lipid mobilization, and inflammation on transition cow disorders. **Veterinary Clinics of North America: Food and Practice**, v. 29, p. 267-278, 2013.

SPEARS, J.W. Trace mineral bioavailability in ruminants. **The Journal of Nutrition**, v.133, p. 1506S–1509S, 2003.

SPEARS, J. W.; W. P. WEISS. Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. **The Veterinary Journal**, v. 176, p. 70–76, 2008.

STEVENSON, J. S. Clinical reproductive physiology of the cow. **In: Current Therapy in Large Animal Theriogenology**., Saint Louis, MO: Saunders Elsevier, 2 ed., p. 259-270, 2007.

SURIYASATHAPORN W. ; HEUER, C.; NOORDHUIZEN-STASSEN, E.N.; SCHKKEN, Y.H. Hyperketonemia and the impairment of udder defense: a review. **Veterinary Research**. v. 31, n. 4, p. 397-412, 2000.

SUTTLE, N.F. Problems in the diagnosis and anticipation of trace element deficiencies in grazing livestock. **Veterinary Record**, v. 119, p. 148–152, 1986.

TORRE, P.M., HARMON, R.J., HEMKEN, R.W.; et al. Mild dietary copper insufficiency depresses blood neutrophil function in dairy cattle. **Journal of Nutritional Immunology**., v. 4, p. 3–24, 1996.

TURKO, I. V.; MARCONDES, S.; MURAD, F. Diabetes-associated nitration of tyrosine and inactivation of succinyl-Coa:3-oxaacid Coa-transferase. **Americam Journal of Physiology**., v. 281, p. 2289-2294, 2001.

UNDERWOOD, E. J.; SUTTLE, N. **The mineral nutrition of livestock**. 3 ed.. 624 p. Wallingford Oxon: CABI Publishing, 1999.

WEISMANN, K.; FLAGSTAD, T. Hereditary zinc deficiency (Adema disease) in cattle, an animal parallel to acromadermatitis enterophatica. **Acta Dermatovener**, v. 56, p.151-154, 1976.

WEISS, W. P. Antioxidant nutrients, cow health, and milk quality. In: PENN STATE DAIRY CATTLE NUTRITION WORKSHOP. **Department of Animal Sciences**, Grantville, PA. p. 11-18, 2005.

WEISS, W.P., J.S.; HOGAN, J.S.; SMITH, K.L.; HOBLET, K.H. Relationships among selenium, vitamin E, and mammary gland health in commercial dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p .81, 1990.

WEISS, W. P; HOGAN, J.S.; TODHUNTER, D.A.; SMITH, K.L. .Effect of vitamin E supplementation in diets with a low concentration of selenium on mammary gland health of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 1728-1737, 1997.

WITTEWER M. M. V. Diagnóstico dos desequilíbrios metabólicos de energia em rebanhos bovinos. In: GONZÁLEZ, F. H. D.; BARCELLOS, J.; PATINO, H. O.; RIBEIRO, C. A. **Perfil Metabólico em Ruminantes: Seu Uso em Nutrição e Doenças Nutricionais**. Porto Alegre: Gráfica UFRGS, p. 23-24, 2000

XIN, Z.; WATERMAN, D.F.; HEMKERN, R.W.; HARMON, R.J. Copper status and requirement during the dry period and early lactation in multiparous Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 2711-2716, 1993.

XIN, Z., D.F.; XIN, Z.; WATERMAN, D.F.; HEMKERN, R.W.; HARMON, R. Effects of copper status on neutrophil function, superoxide dismutase, and copper distribution in steers. **Journal of Dairy Science**, p. 74, p.3078, 1991.

ZERBE, H. Altered functional and immunophenotypical properties of neutrophilic granulocytes in postpartum cows associated with fatty liver. **Theriogenology**, v. 54, p. 771-766, 2000.