

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

Adelina Rodrigues Aires

**EFEITO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE SUPLEMENTAÇÃO DE
COLINA PROTEGIDA EM VACAS LEITEIRAS DURANTE O
PERÍODO DE TRANSIÇÃO**

Santa Maria, RS.
2016

Adelina Rodrigues Aires

**EFEITO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE SUPLEMENTAÇÃO DE
COLINA PROTEGIDA EM VACAS LEITEIRAS DURANTE O
PERÍODO DE TRANSIÇÃO**

**Tese apresentada ao Curso de Doutorado do
Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária, Área de Concentração em
Medicina Veterinária Preventiva, 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.
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Rodrigues Aires, Adelina

Efeito de diferentes protocolos de suplementação de colina protegida em vacas leiteiras durante o período de transição / Adelina Rodrigues Aires.-2016.

56 p.; 30cm

Orientadora: Marta Lizandra do Rego Leal

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2016

1. Vacas leiteiras 2. Período de transição 3. Colina protegida 4. Perfil metabólico I. do Rego Leal, Marta Lizandra II. Título.

©2016

Todos os direitos autorais reservados a Adelina Rodrigues Aires. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Endereço: Rua Frontino Rodrigues, n. 822, Bairro Andreatta, São Miguel do Oeste, SC. CEP: 89900-000.

Fone (0xx)49 99348999. E-mail: adelina_ravet@yahoo.com.br.

**EFEITO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE SUPLEMENTAÇÃO DE COLINA
PROTEGIDA EM VACAS LEITEIRAS DURANTE O PERÍODO DE TRANSIÇÃO**

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

Aprovado em 22 de fevereiro de 2016:

Marta Lizandra do Rego Leal, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Emmanuel Veiga de Camargo, Dr. (IFF)

Maiara Garcia Blagitz, Dra. (UFFS)

Marcelo da Silva Cecim, PHD (UFSM)

Raquel Fraga e Silva Raimondo, Dra. (UFRGS)

Santa Maria, RS
2016

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Pedro e Helena, e minha irmã, Fernanda, que me apoiaram e sempre compreenderam minhas ausências.

Ao meu marido Vineton que sempre esteve do meu lado, me dando força quando eu já não tinha mais e “puxando minha orelha” quando necessário.

À UFSM por toda a formação profissional e crescimento pessoal que me proporcionou.

À minha orientadora professora Marta, obrigada por todo o tempo de convivência, pela amizade, ensinamentos, pela paciência e compreensão. Te admiro muito.

Ao amigo e colega Ricardo Xavier da Rocha, por toda a ajuda e amizade. Sem você não seria possível a conclusão dos estudos.

Aos colegas de pós-graduação José Francisco Xavier da Rocha, Felipe Pivotto, Andrassa Schaffer, Valeska Casanova e Sergio Cunha pelos anos de convivência, de muita amizade, parceria, aprendizado e muitas, muitas risadas.

Aos estagiários do colega Ricardo da Universidade do Oeste de Santa Catarina: Scherlon, Willian, Ricardo, Cristina, Max e Tatiana, pelo auxílio durante a realização dos experimentos.

Aos estagiários da Clínica de Ruminantes da UFSM, pelos anos de convivência e amizade. Fico muito feliz em fazer parte um pouquinho da vida de todos.

Aos proprietários e funcionários das propriedades, que cederam os animais e seu tempo para que os estudos fossem realizados.

À secretária do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Maria, por toda a ajuda nos momentos de apuros.

Muito obrigada!

RESUMO

EFEITO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE SUPLEMENTAÇÃO DE COLINA PROTEGIDA EM VACAS LEITEIRAS DURANTE O PERÍODO DE TRANSIÇÃO

AUTORA: Adelina Rodrigues Aires
ORIENTADORA: Marta Lizandra do Rego Leal

O período de transição é a fase mais crítica do sistema de produção leiteira. As drásticas quedas do consumo de matéria seca no periparto e o aumento dos gastos energéticos no início da lactação resultam em balanço energético negativo (BEN). Vacas leiteiras sob BEN obtêm energia de suas reservas de gordura através de mobilização de ácidos graxos não esterificados (AGNE). A elevação desse metabólito e de seus produtos na corrente sanguínea possui consequências drásticas à saúde, produção e reprodução de vacas leiteiras. A busca por estratégias para reduzir esse desbalanço e melhorar o desempenho de vacas em transição é um desafio aos produtores e técnicos da área. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da colina protegida na produção, saúde uterina, metabolismo e reprodução em vacas no período de transição com diferentes tempos de suplementação. No primeiro estudo foram utilizadas 15 vacas no período de transição. O grupo tratado foi suplementado com 80 gramas de colina protegida por 21 dias antes do parto e 40 dias após. Amostras de sangue foram coletadas nos dias 21 e 10 antes do parto e nos dias 10, 20 e 30 do pós-parto para avaliação do perfil metabólico, hepático e oxidativo. A suplementação com colina não alterou os teores de frutossamina, colesterol, AGNE, beta hidroxibutirato (BHB), fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I), aspartato aminotransferase (AST), gama glutamiltransferase (GGT) e total de oxidantes (TOS). A pesagem do leite foi realizada nos dias 10, 20 e 30 de lactação, não havendo efeito do tratamento na produção. Aos 60 dias pós-parto foi realizado exame ginecológico. Aos 60 dias o grupo controle apresentou maior número de casos de endometrite, não havendo efeito do tratamento sobre o intervalo entre partos. Os teores de progesterona apresentaram-se maiores no grupo controle que no grupo tratado aos 60 dias pós-parto. A suplementação de colina de forma não alterou o perfil metabólico, mas reduziu o número de casos de endometrite aos 60 dias pós-parto. No segundo estudo, foram utilizadas 54 vacas, divididas em três grupos: controle, vacas suplementadas por 10 dias pré-parto com colina protegida (T10) e vacas suplementadas por 20 dias pré-parto com colina protegida (T20). Amostras de sangue foram coletadas nos dias 10, 20 e 30 pós-parto para determinação dos teores de frutossamina, colesterol, AGNE, BHB, AST, GGT e TOS. Não houve diferença entre grupos para nenhum dos parâmetros sanguíneos. A produção de leite foi avaliada nos dias 10, 20 e 30 de lactação, não havendo efeito dos tratamentos sobre o volume de leite produzido. O intervalo entre parto e concepção foi menor em animais do grupo T20 em relação aos demais grupos. A colina protegida não alterou o perfil metabólico de vacas leiteiras sob balanço energético negativo moderado. O uso prolongado de colina reduziu o número de casos de endometrite, enquanto que sua suplementação por 20 dias no pré-parto reduziu o intervalo entre parto e concepção.

Palavras-chave: Colina protegida, período de transição, vacas leiteiras, reprodução, perfil metabólico.

ABSTRACT

EFFECT OF DIFFERENT PROTOCOLS OF THE CHOLINE PROTECTED SUPPLEMENT IN DAIRY COWS DURING THE TRANSITION PERIOD

AUTHOR: Adelina Rodrigues Aires
ADVISOR: Marta Lizandra do Rego Leal

The transition period is the most critical phase of the dairy production system. The large drop in dry matter intake peripartum and rising energy costs in early lactation result in negative energy balance (BEN). Dairy cows under BEN obtain energy from their fat reserves through mobilization of non-esterified fatty acids (NEFA). The elevation of this metabolite and its products in the bloodstream has drastic consequences to health, production and reproduction of dairy cows. The search for strategies to reduce this imbalance and improve the transition cow performance is a challenge to producers and experts in the field. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of the choline protected in production, uterine health, metabolism and reproduction in cows during the transition period with different supplementation times. In the first study were used 15 cows in the transition period. The treated group was supplemented with 80 grams of choline protected for 21 days before calving to 40 days. Blood samples were collected on days 21 and 10 before delivery and on days 10, 20 and 30 for postpartum evaluation of metabolic, liver and oxidative profile. The supplementation with choline did not change the fructosamine, cholesterol, NEFA hydroxybutyrate beta (BHB), growth factor similar to insulin (IGF-I), aspartate aminotransferase (AST), gamma glutamyltransferase (GGT) and total oxidants (TOS) levels. Weighing of milk was performed on days 10, 20 and 30 of lactation, and no treatment effect on production. At 60 days postpartum was conducted gynecological examination. After 60 days, the control group had more cases of endometritis, but no effect of treatment on the calving interval. Progesterone levels were larger in the control group than in the group treated at 60 days postpartum. Choline supplementation so it did not change the metabolic profile, but reduced the number of cases of endometritis at 60 days postpartum. In second study were used 54 cows, divided into three groups: control, cows supplemented by 10 antepartum days with protected choline (T10) and cows supplemented by 20 antepartum days with protected choline (T20). Blood samples were collected on days 10, 20 and 30 postpartum for determination of fructosamine, cholesterol, NEFA, BHB, AST, GGT and TOS levels. There was no difference between groups for any of the blood parameters. Milk production was evaluated on days 10, 20 and 30 of lactation, with no effect of treatments on the volume of milk produced. The interval between delivery and conception was lower in animals T20 group than the other groups. The protected choline did not change the metabolic profile of dairy cows under moderate negative energy balance. Prolonged use of choline reduced the number of cases of endometritis, while supplementation for 20 days in antepartum reduced the interval between parturition and conception.

Keywords: Protected choline, transition period, dairy cows, reproduction, milk production.

LISTA DE TABELAS

3 CAPÍTULO I

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Médias ajustadas dos parâmetros sanguíneos e erro padrão da média de vacas no pós-parto e análise de variância de efeitos fixos tratamento, tempo e interação tempo x tratamento..... | 24 |
| Tabela 2 – Ocorrência de endometrite e intervalo entre parto e concepção (média ± erro padrão) de vacas leiteiras suplementadas com colina protegida..... | 27 |

4 CAPÍTULO II

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Médias ajustadas e erro padrão dos parâmetros sanguíneos e produção de leite de vacas no pós-parto. Análise dos efeitos fixos tratamento, tempo e interação tempo x tratamento..... | 46 |
| Tabela 2 – Efeito da suplementação com colina protegida no intervalo entre parto-concepção em vacas leiteiras..... | 47 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Metabolismo dos ácidos graxos não-esterificados em vacas leiteiras..... | 12 |
|--|----|

3 CAPÍTULO I

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Efeito da suplementação com colina protegida sobre os teores de colesterol, fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) e progesterona aos sessenta dias pós-parto..... | 28 |
|---|----|

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 10 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 11 |
| 1.1 Período de transição e alterações metabólicas de vacas no periparto..... | 11 |
| 1.2 Colina..... | 17 |
| 3. CAPÍTULO I | 19 |
| EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM COLINA PROTEGIDA SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE VACAS LEITEIRAS NO PERIPARTO | 19 |
| Resumo | 19 |
| Abstract..... | 20 |
| Introdução | 20 |
| Material e métodos..... | 21 |
| Resultados e discussão | 23 |
| Conclusão..... | 29 |
| Referências..... | 29 |
| 4. CAPÍTULO II..... | 33 |
| EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE COLINA PROTEGIDA NO PRÉ-PARTO SOBRE O PERFIL METABÓLICO DE VACAS LEITEIRAS DURANTE O PÓS-PARTO | 33 |
| Resumo..... | 33 |
| Abstract..... | 34 |
| Introdução | 34 |
| Materiais e métodos | 35 |
| Resultados..... | 37 |
| Discussão | 38 |
| Conclusão..... | 41 |
| Referências..... | 41 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 48 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 50 |
| 7. REFERÊNCIAS | 51 |

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a produção de leite bovino, tem se destacado como importante setor da atividade agropecuária mundial. A aplicação de técnicas modernas e a profissionalização da atividade têm elevado significativamente os índices de produção e reduzido a ocorrência de enfermidades de ordem infecciosa nos rebanhos. No entanto, o aumento na produtividade e sanidade das vacas leiteiras modernas tornaram mais evidentes e severos os transtornos de ordem metabólica experimentados por esses animais, principalmente nas fases mais críticas de seu ciclo produtivo.

O período de transição é conhecido como o intervalo entre as três semanas que antecedem o parto até cerca de três semanas pós-parto e destaca-se como a fase em que ocorrem as maiores alterações metabólicas no ciclo produtivo de vacas leiteiras (LEBLANC, 2010). Durante essa fase, a vaca deve adaptar-se a mudanças de ambiente e de dieta, bem como a uma demanda energética consideravelmente aumentada (HUZZEY et al., 2005). Esse aumento da demanda energética não é compensado pela ingestão de matéria seca, durante o período de transição, levando a um balanço negativo de energia e consequente mobilização de gordura das reservas corporais (DRACKLEY et al., 2001). O balanço energético negativo apresenta consequências distintas, de acordo com sua intensidade. Alterações como cetose e fígado gorduroso, queda na produção de leite e na imunidade e doenças e falhas reprodutivas são as consequências mais relatadas (OSPINA et al., 2010a; OSPINA et al., 2010b; CONTRERAS e SORDILLO, 2011).

Muitos são os estudos, sobre o período de transição, desenvolvidos em busca de técnicas ou tratamentos para reduzir as perdas e problemas oriundos dos transtornos periparto (MINOR et al., 1998; PICKETT et al., 2003; HOEDEMAKER et al., 2004). Dentre eles, o uso de nutrientes como a colina, vem se destacando na suplementação preventiva para os transtornos relacionados a essa fase (COOKE et al., 2007). A colina é bem conhecida por ser efetiva na prevenção de cetose clínica (LIMA et al., 2012), no entanto sua ação sobre os demais transtornos do periparto é bastante controverso. Tanto a dose quanto o tempo de suplementação necessários para reduzir a incidência de cetose subclínica e os transtornos reprodutivos pós-parto ainda não estão definidos na literatura. Dessa forma avaliou-se o efeito de duas formas de suplementação da colina sobre os parâmetros sanguíneos e sobre a reprodução de vacas leiteira no pós-parto.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PERÍODO DE TRANSIÇÃO E ALTERAÇÕES METABÓLICAS DE VACAS NO PERIPARTO

O período de transição corresponde ao intervalo entre as três semanas antes do parto e três semanas pós-parto. Durante esse período a vaca passa por inúmeras mudanças no seu metabolismo para que se adapte para o parto e lactogênese. Uma das principais mudanças decorrentes destas adaptações está relacionada com o aumento da demanda energética (CONTRERAS e SORDILLO, 2011).

Ao longo do tempo as vacas foram selecionadas para que produzissem cada vez mais leite. Essa alta produção, que é mais significativa no início da lactação, aumentou ainda mais o dispêndio energético das vacas criadas em sistemas intensivo e semi-intensivo. Segundo o 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/d, nos primeiros dias de lactação, enquanto que a mesma vaca, nos dois dias anteriores ao parto necessita de apenas 14,5 Mcal/d (NRC, 2001). Essa elevação acentuada nas necessidades energéticas não é devidamente compensada pela vaca no início da lactação já que há uma queda acentuada de ingestão de matéria seca (IMS) nos dois dias que antecedem o parto, com retorno lento na ingestão, não acompanhando as exigências da vaca (LEAN et al., 2013). A queda da IMS pode ser de até 30%, no período periparto (HAYIRLI et al., 2002).

Essa queda na ingestão de matéria seca parece ser fisiológica em vacas leiteiras, no entanto suas consequências para o organismo da vaca podem ser graves. A elevação abrupta das exigências energéticas associada à queda drástica de ingestão de alimento resulta em uma situação metabólica denominada balanço energético negativo (BEN) (DRACKLEY, 1999). O BEN é responsável pelo desencadeamento de inúmeras reações adaptativas no organismo animal, com o objetivo principal de disponibilizar fontes energéticas alternativas, tais como as reservas de gordura corporal (TAMMINGA et al., 1997). Durante o início da lactação é mobilizado algo entre 30 a 50 Kg de gordura do tecido adiposo (BELYEA e ADAMS, 1990). Essa mobilização de gordura resulta em altos teores de ácidos graxos não esterificados (AGNE) no sangue de vacas nesse período (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. Além disso, os AGNE podem originar parte da gordura secretada no leite ou podem ser encaminhados ao fígado para metabolização (EMERY et al., 1992).

Apesar do aporte energético proporcionado pelo AGNE à glândula mamária, altos teores sanguíneos desses metabólitos são relacionados à queda acentuada na produção de leite, de tal forma que Ospina et al. (2010a) descreveram que teores de AGNE acima de 0,57 mEq/L após o parto resultam em redução de cerca de 600kg na produção total de um ciclo de lactação, fato que segundo esses autores, está relacionada com o efeito desse metabólito na função hepática. Os AGNE que chegam ao fígado podem ser diretamente transformados em energia, oxidados até corpos cetônicos ou podem formar triglicerídeos (DRACKLEY et al., 2001), processos que sobrecarregam o fígado (Figura 1).

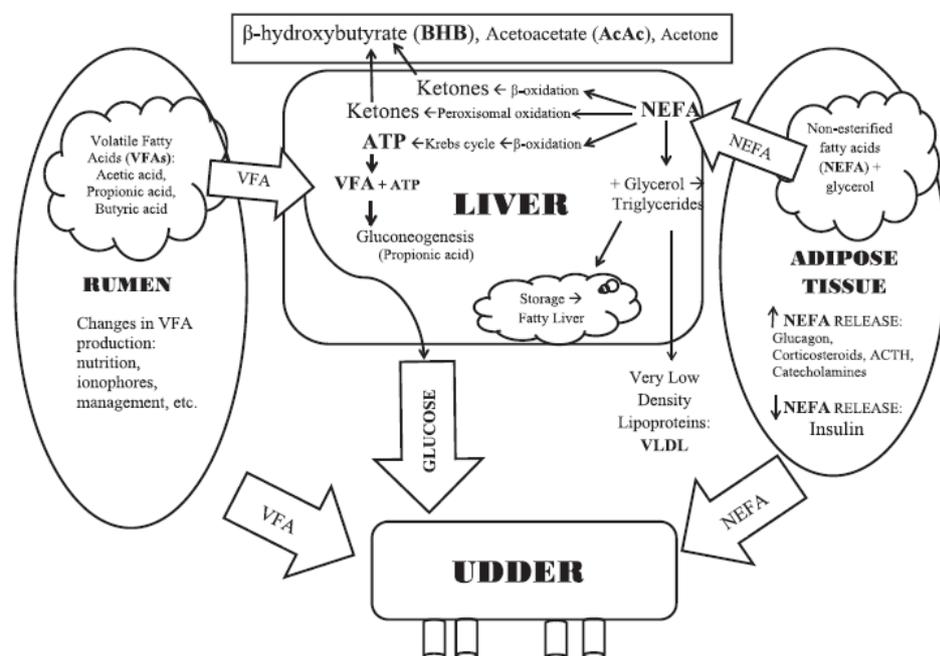


Figura 1 – Metabolismo dos ácidos graxos não-esterificados em vacas leiteiras (Ospina et al., 2013).

Os triglicerídeos, produtos da reesterificação do excesso de AGNE hepático, devem ser retiradas do fígado após sua síntese através de sua conjugação com moléculas denominadas lipoproteínas de muito baixo peso molecular (VLDL) (EMERY et al., 1992). Fisiologicamente, a produção de VLDL é deficitária em ruminantes (KLEPPE et al., 1988), o que possibilita uma rápida acumulação de triglicerídeos do fígado, situação conhecida como esteatose hepática ou fígado gorduroso (GERLOFF et al., 1986). De acordo com Bobe et al. (2004), as altas taxas de AGNE circulantes em vacas no periparto poderão predispor a esta síndrome.

Ruminantes são por natureza menos sensíveis aos efeitos da insulina do que as demais espécies (SASAKI, 2002), principalmente no que se refere à tecidos como o adiposo e

muscular. A molécula transportadora de glicose do tipo 4 (GLUT4), que é responsiva à insulina, está presente em menor quantidade e é menos translocada para a membrana celular em animais ruminantes do que em não-ruminantes, sendo esta a principal causa da baixa ação da insulina nesses animais (DUHLMEIER et al., 2005). Mas é durante o início da lactação que ocorrem as maiores alterações na partição da glicose. De acordo com Kuhla et al. (2011) nas quatro primeiras semanas pós-parto há 40% menos GLUT4 no tecido muscular esquelético, assim como no tecido adiposo há menor produção de transportador de glicose do tipo 1 (GLUT1) e de GLUT4. Essa drástica redução do transporte da glicose para o interior das células ocorre ao mesmo tempo em que a glândula mamária possa a consumir de 50% a 85% da glicose disponível (DRACKLEY et al., 2001), independentemente da ação da insulina (KOMATSU et al., 2005). A redução do transporte de glicose para o interior das células e o aumento da demanda por esse metabólito no início da lactação agravam sobremaneira o balanço energético negativo experimentado pela vaca leiteira no período de transição.

O balanço energético negativo e a insuficiência de energia no fígado, devido à queda da IMS após o parto proporcionam um maior direcionamento dos AGNE para o interior da mitocôndria, onde, sob baixos níveis dos derivados do ácido propiônico, os AGNE são parcialmente oxidados em corpos cetônicos (EMERY et al., 1992). Os corpos cetônicos são basicamente produtos da quebra mitocondrial do AGNE em cetoácidos, acetoacetato e β -hidroxibutirato (BHB), e o aumento desses metabólitos na corrente sanguínea pode desencadear a síndrome conhecida como cetose (DRACKLEY et al., 2001).

A cetose é uma síndrome comum em vacas de alta produção durante o primeiro mês de lactação, podendo apresentar-se de forma clínica ou subclínica. Na cetose clínica são visíveis sinais como produção de leite severamente reduzida, queda no consumo de matéria seca e perda de peso, acompanhados da elevação dos níveis de corpos cetônicos séricos (DETILLEUX et al., 1994). Na cetose subclínica, os sinais clínicos são pouco aparentes, ocorrendo elevação nos teores de corpos cetônicos circulantes e queda moderada na produção de leite (ANDERSSON, 1988).

Para fins de diagnóstico da cetose, além da avaliação da presença de sinais clínicos, faz-se uso da mensuração dos corpos cetônicos circulantes. No entanto devido à natureza lábil da maioria das cetonas (BERGMAN, 1971) é consenso entre os pesquisadores que o corpo cetônico mais estável para mensuração é o BHB sanguíneo, metabólito facilmente determinado através de método colorimétrico (TYOPPONEN et al., 1980). Seus níveis variam sobremaneira de acordo com a gravidade do transtorno e essa variação é utilizada na bovinocultura leiteira moderna como parâmetro ao se classificar a cetose. De acordo com Oetzel (2004), teores séricos

de BHB entre 1,4 e 2,9 mmol/L são encontrados em vacas sob cetose subclínica, enquanto que vacas com mais que 3,0 mmol/L de BHB são consideradas clínicas.

Sabe-se que a cetose clínica acomete entre 2 a 15% das vacas leiteiras durante o início da lactação (SUTHAR et al., 2013) e que os prejuízos referentes a esse transtorno alcançam 60 milhões de dólares por ano nos Estados Unidos (BOBE et al., 2004). Já em relação a cetose subclínica, sua ocorrência vem se destacando como o principal transtorno pós-parto nos rebanhos modernos, com incidência variando entre 11,2% e 43,3% (SUTHAR et al., 2013; MCART et al., 2012). A cetose subclínica pode acometer vacas leiteiras em praticamente todo o período de transição, no entanto, de acordo com McArt et al. (2012) é no quinto dia pós-parto que se concentra o maior número de casos desse transtorno.

A ausência de sinais clínicos visíveis nos casos de cetose subclínica não torna esse transtorno de pouca importância. Muitos são os estudos que comprovam a relação entre casos de cetose subclínica e outros transtornos do periparto (DUFFIELD et al., 2009; MCART et al., 2012; SUTHAR et al., 2013). Entre esses transtornos, o deslocamento de abomaso é frequentemente relatado como consequência da cetose subclínica (LEBLANC et al., 2005). De acordo com Ospina et al. (2010a), vacas com níveis de BHB superiores a 1,0 mmol/L aos 15 dias pós-parto tem 6,9 vezes mais chances de desenvolver deslocamento de abomaso até os 30 dias de lactação. Já LeBlanc et al. (2005) relatam que níveis de BHB acima de 1,4 mmol/L até 7 dias pós-parto podem elevar em até 8 vezes a chance de ocorrer deslocamento.

A cetose subclínica pode afetar a produção de leite de forma moderada, havendo redução na produção entre 2,2 e 4,4 Kg/dia (OSPINA et al., 2010b; CHAPINAL et al., 2012). De acordo com Duffield et al. (2009), níveis de BHB superiores a 1,8 mmol/L, durante a primeira semana pós-parto, reduzem em até 333,7 litros a produção de leite em uma lactação de 305 dias. Para McArt et al. (2012), a queda na produção está associada a redução de energia disponível para a glândula mamária.

Muitas vacas são capazes de resistir aos desafios metabólicos associados com o início da síntese de leite, no entanto, Bigras-Poulin et al. (1990) relataram que mais de 50% das lactações sofrem interferência de alguma doença relacionada com ao período de transição. O balanço energético negativo, a mobilização intensa de TG do tecido adiposo e a cetogenese são altamente associados a desordens no periparto (BOBE et al., 2004; DUFFIELD et al., 2009). Além dos transtornos diretamente ligados ao desbalanço metabólico, Hammon et al. (2006) relatam também a ocorrência de uma redução da resposta imune de vacas no período periparto. Muitos componentes do sistema imune parecem ser afetados negativamente por concentrações elevadas de corpos cetônicos (SURIYASATHAPORN et al., 2000). As altas concentrações de

BHB no sangue e o acúmulo de triglicerídeos no fígado estão relacionados com reduzida ação dos neutrófilos (ZERBE et al., 2000; GRINBERG et al., 2008), o que influencia negativamente a função imune desses animais.

De acordo com Cerone et al. (2007), neutrófilos e macrófagos obtidos de leite bovino, quando incubados sob altas concentrações de BHB apresentam atividade reduzida. De acordo com esses autores, além de uma redução de até 33% na produção de peróxido de hidrogênio por parte dos neutrófilos, ocorre uma significativa redução da atividade fagocitária de macrófagos, alterações atribuídas a mudanças na membrana plasmática dessas células causadas pelos corpos cetônicos. Essas alterações nas células de defesa do tecido mamário têm sido relacionadas ao aumento da susceptibilidade à mastite em vacas no período de transição de tal forma que Kremer et al. (1993) associaram a hipercetonemia à gravidade de infecções intramamárias por *Escherichia coli*.

A presença de corpos cetônicos na circulação de vacas no início da lactação também aumenta a probabilidade de retenção de placenta e processos infecciosos uterinos (SUTHAR et al., 2013). De acordo com Hammon et al. (2006), a atividade fagocitária de polimorfonucleares uterinos é afetada negativamente pelo balanço energético negativo e cetose, o que, durante a fase de involução uterina possibilita a entrada e multiplicação bacteriana. Dessa forma, Reist et al. (2003), descrevem que vacas com concentrações de cetonas no leite superiores à 0,4 mmol/L possuem 3,2 vezes mais chance de desenvolver metrite no pós-parto.

Além de alterar a atividade inflamatória, o balanço energético negativo reduz a atividade imune em vacas leiteiras por reduzir o aporte de glicose para as células de defesa, que são grandes consumidoras dessa fonte de energia (SURIYASATHAPORN et al., 2000).

Animais supercondicionados no pré-parto e que apresentam perda de peso acentuado após o parto têm maiores chances de adoecer no início de lactação (KIM e SUH, 2003; NOGALSKI et al. 2012). Em humanos, a obesidade tem sido associada à ocorrência de processos infecciosos devido a uma condição inflamatória crônica resultante de altas concentrações séricas de AGNE (DE HEREDIA et al., 2012), capaz de exaurir o sistema imune e predispor a infecções. Vacas obesas mobilizam muito mais gordura no pós-parto que vacas em condição corporal moderada, e, assim como nos humanos, os altos teores séricos de AGNE resultantes alteram a atividade das células de defesa, tornando-as menos responsivas à infecção (LACETERA et al., 2004). O efeito dos AGNE na saúde de vacas leiteiras é tão relevante que, segundo Seifi et al. (2011), vacas com teores desse metabólito acima de 1,0 mmol/L no periparto tem 3,6 vezes mais chances de ser descartada ao longo do seu ciclo produtivo.

A alta demanda energética e a 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 (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (SORDILLO, 2005). A produção de EROs e de seus produtos, tais como o malondialdeído, está altamente correlacionada com os teores de BHB em animais no período periparto (BERNABUCCI et al., 2005).

A performance reprodutiva é fortemente influenciada por inúmeras condições inerentes ao animal, tais como genética, ambiente, manejo, nutrição e ocorrência de doenças (LUCY, 2001). No entanto, um dos fatores de maior efeito sobre a reprodução de vacas leiteiras é o manejo nutricional inadequado no final da lactação e no período seco (ROCHE, 2006). Segundo Westwood et al. (2002) as altas concentrações de AGNE presentes após o parto são associadas com a menor probabilidade de concepção nos primeiros 150 dias de lactação. Esses mesmos autores afirmam que o aumento na produção em vacas no início da lactação está negativamente relacionado com a apresentação de cio na primeira ovulação. No estudo realizado por Butler et al. (1981), a primeira ovulação ocorreu após 10 dias do final do período de balanço energético negativo, evidenciando que o retorno a ciclicidade está intimamente associado à disponibilidade de energia.

Segundo Ospina et al (2010b) a intensidade do balanço energético negativo experimentado pela vaca no pós-parto está diretamente relacionado com o retorno a atividade reprodutiva. De acordo com esses autores, quanto menores os níveis séricos de AGNE mais cedo as vacas concebem.

A baixa eficiência reprodutiva resulta em aumento do intervalo entre partos, do descarte involuntário devido à baixa fertilidade, dos custos com inseminação, e redução da produção de leite por vaca e de bezerros por ano (JORRITSMA et al., 2003) o que gera prejuízos econômicos na atividade.

Além dos transtornos referentes à concepção, falhas no manejo durante o periparto e o severo balanço energético negativo, muitas vezes resultam em infecções uterinas. A endometrite é definida como uma infecção uterina inespecífica de aspecto crônico, que acomete vacas a partir de três semanas após o parto (BONDURANT, 1999). De acordo com LeBlanc et al. (2002), a ocorrência de endometrite reduz as chances de concepção, além de aumentar os dias em aberto em vacas leiteiras. Ainda de acordo com esses autores vacas com endometrite tem mais chances de ser descartadas precocemente. Em vacas leiteiras, a elevada produção de leite durante o início da lactação e o balanço energético negativo severo, resultante da alta produção estão intimamente associados ao retardo na involução uterina (WATHES et al., 2009).

Segundo Hammon et al. (2006), vacas que apresentam endometrite até a quinta semana pós-parto possuem teores de AGNE superiores aos animais saudáveis. Ainda de acordo com esses autores a relação entre AGNE e ocorrência de endometrite é explicada pela redução na atividade dos neutrófilos em animais sob severo balanço energético negativo.

2.2 COLINA

Proveniente da metionina, a colina é requerida para síntese de fosfatidilcolina. A fosfatidilcolina é essencial para ruminantes, sendo fundamental para a absorção e transporte de lipídios, fazendo parte da estrutura da membrana celular, sinalização celular e síntese de lipoproteínas (ZEISEL; HOLMES-MCNARY, 2001). A fosfatidilcolina é o fosfolípido mais abundante nas células de animais mamíferos, participando com até 50% do total de fosfolípidos da membrana de todas as células (KUKSIS; MOOKERJEA, 1978). Dessa forma, uma deficiência de colina pode acarretar em danos a integridade das células.

Em vacas leiteiras, uma boa parte dos fosfolípidos produzidos é secretado no leite; em uma produção diária de 25 litros de leite há secreção de cerca de 10g de fosfolípidos (KINSELLA, 1973). No leite os fosfolípidos são parte importante dos glóbulos de gordura. A colina é parte também do neurotransmissor acetilcolina que é sintetizado nos neurônios. A acetilcolina é um sinalizador indispensável no sistema nervoso central e periférico, sendo, neste último, responsável pela contração muscular. Além disso, a colina é doadora de grupos metil para inúmeros processos, incluindo a formação de glutatona.

A deficiência de colina está relacionada com a ocorrência de lipidose hepática (ZEISEL et al., 1993). Os triglicerídeos são transportados para fora do fígado como um constituinte de lipoproteína de baixo peso molecular (VLDL). A colina pode poupar metionina (como um doador de grupo metila), deixando-a disponível para a síntese de proteína (componente de VLDL), além de servir como um substrato para a síntese de fosfatidilcolina, um outro componente de VLDL (PINOTTI, 2002). A quantidade de VLDL em bovinos é muito baixa, principalmente pelo seu grande uso em tecidos extra-hepáticos principalmente durante a lactação (GRUFFAT et al. 1996).

Em vacas leiteiras em período de transição suplementadas com colina protegida foi descrito uma redução no conteúdo de triglicerídeos no fígado (PIEPENBRINK; OVERTON, 2004; ZOM et al., 2011). Cooke et al. (2007) submetem vacas secas à restrição energética, e observaram efeito da colina na redução dos teores de triglicerídeos hepáticos e de AGNE no soro após 10 dias de suplementação com colina. Na alimentação dos ruminantes, a colina é

tipicamente vista como um componente não essencial, apesar de indicações de que apenas até 30% da colina necessárias é fornecida por fluxo duodenal de colina (ERDMAN; SHARMA, 1991). Portanto, a maior parte da colina exigida por vacas leiteiras deve ser produzida por síntese *de novo* através da metilação sequencial de fosfatidiletanolamina, com os grupos metil sendo fornecidos por S-adenosil-L-metionina (ZEISEL; HOLMES-MCNARY, 2001).

Devido à grande atuação e demanda da colina em vacas leiteiras, essa substância tem grande importância para a manutenção da produção leiteira. Dessa forma, alguns estudos descrevem o efeito de colina na produção. Segundo Zahra et al. (2006), vacas suplementadas com colina protegida produziram 1.2 Kg/d de leite a mais nos primeiros 60 dias de lactação que vacas não suplementadas. Brusemeister e Sudekun (2006) relatam que suplementar colina pode aumentar a produção de vacas por elevar a exportação de triglicerídeos do fígado e por poupar metionina com um doador de metil. Lima et al. (2007), encontraram efeito positivo da suplementação de colina também no teor de gordura do leite em vacas em início de lactação. Davidson et al. (2008) relataram maior produção de proteína no leite em vacas suplementadas com colina protegida.

A utilização de colina protegida para vacas em transição tem sido amplamente estudada, no entanto, inúmeros são os protocolos de suplementação e discrepantes são os seus resultados. Dessa forma, o objetivo da presente tese foi avaliar o efeito de diferentes períodos de suplementação de colina protegida sobre o perfil metabólico e produção de vacas no período de transição.

3. CAPÍTULO I

Artigo aceito pela revista Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFMG.

Efeito da suplementação com colina protegida sobre parâmetros bioquímicos, produção e reprodução de vacas leiteiras no periparto

Effect of protected choline supplementation on biochemical parameters, production and reproduction of dairy cows in peripartum

Aires, A.R.^{1*}; Torbitz, V.D.¹, Rocha, X.R.², Moresco, R.¹; Sousa, R.S.³; Severo, S.L.S.²; Naibo, W.²; Sossanovicz, R.A.²; Pretto, A.¹; Ortolani, E.L.⁷; 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 de São Paulo - USP - São Paulo, SP.

⁴ Instituto Federal Catarinense - IFC - Concórdia, SC.

* Autor para correspondência: adelina_ravet@yahoo.com.br.

Resumo

Avaliou-se o efeito da suplementação com colina protegida sobre o perfil energético, enzimas hepáticas e parâmetros reprodutivos de vacas leiteiras no periparto. Quinze vacas leiteiras foram divididas em dois grupos experimentais: 8 receberam 80 gramas de colina protegida por 21 dias pré-parto e 40 dias pós-parto e 7 foram consideradas controle. Amostras de sangue foram coletadas nos dias 10, 20, 30 e 60 pós-parto para avaliação dos perfis energético e hepático. Aos 60 dias pós-parto realizou-se exame ginecológico dos animais para avaliação da saúde reprodutiva. A suplementação com colina protegida não alterou os teores de beta-hidroxibutirato (BHBA), ácidos graxos não esterificados (AGNE), frutossamina, fator de crescimento semelhante a glicose I (IGF-I), status oxidante total (TOS) e as enzimas aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamiltransferase (GGT) no pós-parto. Não se observou diferença quanto à produção de leite. Aos 60 dias pós-parto, vacas suplementadas com colina protegida apresentaram menor número de casos de endometrite em relação às vacas do grupo controle. A suplementação de colina protegida não alterou o perfil bioquímico e a produção de leite, mas reduziu o número de casos endometrite no pós-parto de vacas leiteiras.

Palavras-chave: Período de transição, vacas leiteiras, parâmetros bioquímicos, colina protegida

Abstract

The study aimed to evaluate the effect of supplementation with protected choline on the energy profile, liver enzymes and reproduction in dairy cows in peripartum. Fifteen cows were divided into two groups: 8 received 80 grams of protected choline for 21 days pre-partum and 40 days postpartum and 7 were considered control. Blood samples were collected on days 10, 20, 30 and 60 postpartum to evaluate the energy and hepatic profiles. After 60 days postpartum held gynecological examination of animals for evaluation of reproductive health. The supplementation with choline protected did not alter the beta-hydroxybutyrate levels (BHBA), non-esterified fatty acids (NEFA), fructosamine, like growth factor glucose (IGF-I), total oxidant status (TOS), aspartate aminotransferase (AST) and glutamyltransferase range (GGT) postpartum. No difference for the production of milk. After 60 days postpartum, cows fed protected choline had fewer cases of endometritis than cows in the control group. The protected choline supplementation did not alter the biochemical profile and milk production, but reduced the number of cases endometritis in postpartum dairy cows.

Key words: Transition period; dairy cows; biochemical parameters; rumen protected choline

Introdução

Com o aumento na produção de leite observado nas últimas décadas, as alterações metabólicas, experimentadas pela vaca leiteira no periparto, tornaram-se cada vez mais evidentes, fazendo do período de transição o principal desafio para o animal e para o produtor. Durante o período de transição, que corresponde aos 21 dias antes do parto e os 21 dias de lactação, a ingestão de matéria seca diminui drasticamente, enquanto que as exigências nutricionais da vaca leiteira praticamente dobram (NRC, 2001), principalmente no início da lactação. Como resultado dessa equação, as vacas nesse período, invariavelmente, encontram-se em balanço energético negativo (BEN).

O balanço energético negativo tem como principal consequência metabólica a mobilização das reservas corporais de energia na forma de ácidos graxos não esterificados (AGNEs), sendo este o substrato hepático para produção de energia para praticamente todas as reações do organismo em desbalanço (Drackley *et al.*, 2001). Sabe-se que quanto mais AGNEs

são mobilizados das reservas, maior é a produção de seus metabólitos no fígado e maior são as chances de ocorrência de transtornos no periparto (Duffield *et al.*, 2009).

Um período de transição realizado com sucesso é aquele em que a vaca consegue compensar o BEN sem graves alterações produtivas e de saúde. A colina é uma *quasi*-vitamina que apresenta funções importantes no organismo dos animais. Proveniente da metionina, a colina é requerida para síntese de fosfatidilcolina, fosfolípido abundante em mamíferos, fundamental para ações como absorção e transporte de lipídios, fazendo parte da estrutura da membrana celular, sinalização celular e síntese de lipoproteínas (Zeisel e Holmes-McNary, 2001).

A deficiência de colina está relacionada com a ocorrência de lipidose hepática (Zeisel e Holmes-McNary, 2001), uma vez que os triglicerídeos são transportados para fora do fígado como um constituinte de lipoproteína de baixo peso molecular (VLDL), extremamente dependente de colina (Piepenbrink e Overton, 2003). A suplementação de colina durante o periparto de vacas leiteiras tem sido realizada em intervalos e doses bem variáveis, apresentado efeitos controversos sobre o desempenho produtivo, saúde e reprodução pós-parto (Xu *et al.*, 2006; Cooke *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2012). O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da suplementação com colina protegida sobre o desempenho produtivo, perfil metabólico, enzimas hepáticas e ocorrência de endometrite de vacas no periparto.

Material e métodos

Foram selecionadas 15 vacas leiteiras da raça holandesa, entre a segunda e quarta lactação, criadas em sistema semi-intensivo, alocadas em uma propriedade de médio porte localizada no município de Xanxerê, região Oeste de Santa Catarina. Foram selecionadas para participar do experimento apenas vacas com escore corporal entre 3 e 4. As vacas passaram por exame clínico completo antes do início e durante o experimento, e as que apresentaram alteração clínica foram excluídas. A dieta durante o período pré-parto foi composta por silagem de milho, ração comercial e sal aniônico a base de cloreto de amônia (1% da ração); nessa fase as vacas foram mantidas em área de pouca oferta de pastagem de tifton. No período pós-parto, a alimentação foi à base de silagem de milho (7 Kg de matéria seca por dia), pastagem de milheto (à vontade), ração comercial (22% de proteína) (9 Kg de ração/vaca/dia).

Os animais selecionados foram divididos em dois grupos: controle, composto por 7 vacas e, tratado, composto por 8 vacas. Os animais pertencentes ao grupo tratado receberam diariamente 18g de colina protegida (Toplac Transição – Nutrifarma, Taió, Brasil). O período de tratamento iniciou 21 dias antes do parto até 40 dias após o parto. Durante o pré-parto o

tratamento foi fornecido pela manhã, individualmente, junto a ração e o são aniônico. A colina protegida foi fornecida após a ordenha da manhã, individualmente, adicionada a ração.

No período pré-parto, as vacas foram monitoradas quanto à efetividade da dieta aniônica, mediante mensuração do pH urinário. A urina foi coletada nos dias 21 e 10 anteriores a data prevista para o parto, através de estímulo manual na região do períneo e o pH urinário foi mensurado utilizando-se pHmetro digital portátil (PH1800 – Instrutherm, São Paulo, SP). Para descartar a influência da hipocalcemia sobre o desempenho pós-parto, animais com pH superior a 7 nas duas mensurações foram retirados do experimento.

Nos dias 21 e 10, do período pré-parto, foram realizadas coletas de sangue por punção da veia coccígea, para determinação dos teores de beta-hidroxibutirato (BHBA). Concentrações desse metabólito superiores a 3 mmol/L no pré-parto indicam cetose clínica (Oetzel, 2004) e animais nessa condição foram excluídos do experimento.

Amostras de sangue foram coletadas da veia coccígea nos dias 10, 20, 30 e 60 pós-parto. 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.

Foram determinados, através de métodos colorimétricos, os teores séricos de frutossamina, de colesterol, e das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e gama-glutamilttransferase (GGT), utilizando-se kit comercial (Bioclin), assim como as concentrações séricas dos ácidos graxos não esterificados (kit comercial Wako), e do beta-hidroxibutirato (kit comercial Randox). O status oxidativo total foi determinado de acordo com a técnica descrita por Erel (2005). As análises foram realizadas em analisador automático bioquímico (Cobas Mira - Roche Diagnostics, Montclair, EUA). As concentrações do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) foram determinadas por eletroquimioluminescência em equipamento Immulite 1 (Siemens, modelo 1000, São Paulo, SP, Brasil). Nas amostras coletadas aos 60 dias pós-parto determinaram-se os teores de progesterona, por radioimunoensaio, de beta-hidroxibutirato e de IGF-1, como descrito anteriormente.

A produção de leite individual foi mensurada nos dias 10, 20 e 30 do experimento utilizando-se coletor de leite acoplado ao sistema de ordenha. O exame ginecológico no pós-parto foi realizado aos 60 dias de lactação, mediante técnica descrita por Grunert e Gregory (1989), utilizando-se de palpação retal e vaginoscopia. Informações relativas à data da primeira inseminação e da data de concepção pós-parto foram obtidas nas fichas de acompanhamento individual para avaliação do desempenho reprodutivo.

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (108/2013). Os dados foram testados quanto à

normalidade utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Parâmetros com distribuição não-paramétrica passaram por transformação logarítmica ($\log(10) + 1$). O efeito do tratamento, do tempo e da interação desses dois fatores sobre os parâmetros sanguíneos foram analisados pelo comando `proc mixed` (SAS). As médias ajustadas (LSMeans) dos fatores fixos foram comparadas através da diferença mínima significativa (LSD), obtida pelo teste “t” a um nível de significância de 5%. Para o intervalo entre parto e concepção foi realizada comparação de médias através do teste de Tukey com nível de significância de 5%. Os resultados foram expressos em médias \pm erro padrão. Os dados foram analisados pelo programa estatístico SAS (versão 8.02, programa SAS, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA).

Resultados e discussão

Os valores de pH urinário obtidos foram de $6,7 \pm 0,8$ e $5,5 \pm 0,2$, nos dias 21 e 10 pré-parto, respectivamente, e nenhum animal apresentou duas mensurações consecutivas com valores de pH superiores a 7,0. Em relação à cetonemia, os valores médios de beta-hidroxibutirato foram de $1,97 \pm 0,84$, aos 21 dias pré-parto e de $1,81 \pm 0,80$, aos 10 dias pré-parto. Uma vaca, do grupo controle, foi retirada do experimento por apresentar valor de BHBA superior a 3 mmol/L aos dez dias antes do parto, considerada com cetose clínica de acordo com a definição de Oetzel (2004).

No período pós-parto, os valores de BHBA foram inferiores aos encontrados no pré-parto, não havendo diferença entre os grupos tratado e controle (Tab. 1). Quanto ao efeito da colina, Piepenbrink e Overton (2003) também não detectaram diferença nos teores de BHBA em animais no periparto em nenhuma das doses testadas. A colina diminui a deposição de gordura no fígado (Zom *et al.*, 2011), maximizando a função hepática e, por consequência, reduzindo a formação de corpos cetônicos e o risco de cetose. Os teores de BHBA foram elevados no presente estudo em comparação aos valores encontrados para animais nos primeiros 30 dias de lactação (Alvarenga *et al.*, 2015). No entanto, os teores de AGNE apresentaram-se reduzidos durante o período experimental.

Tabela 1. Médias ajustadas dos parâmetros sanguíneos e erro padrão da média de vacas no pós-parto e análise de variância de efeitos fixos tratamento, tempo e interação tempo x tratamento

| Parâmetros ¹ | | Momentos experimentais | | | Valor de p ⁴ | | |
|--------------------------------|----------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------|-------|--------------------|
| | | Dia 10 PP ³ | Dia 20 PP ³ | Dia 30 PP ³ | Tratamento | Tempo | Tratamento x Tempo |
| Colesterol (mg/dL) | C ² | 63,20 ± 5,60 ^{Aa} | 62,00 ± 9,90 ^{Aa} | 95,50 ± 12,58 ^{Aa} | 0,46 | 0,07 | 0,59 |
| | T ² | 77,43 ± 4,68 ^{Aa} | 64,75 ± 8,18 ^{Aa} | 113,20 ± 18,02 ^{Aa} | | | |
| Frutosamina (µmol/L) | C | 132,55 ± 11,74 ^{Aa} | 102,36 ± 11,20 ^{Aa} | 122,76 ± 10,81 ^{Aa} | 0,59 | 0,24 | 0,54 |
| | T | 138,82 ± 13,76 ^{Aa} | 95,82 ± 12,89 ^{Aa} | 109,70 ± 6,13 ^{Aa} | | | |
| BHBA (mmol/L) | C | 1,12 ± 0,21 ^{Aa} | 1,55 ± 0,21 ^{Aa} | 1,17 ± 0,10 ^{Aa} | 0,21 | 0,15 | 0,2 |
| | T | 0,90 ± 0,08 ^{Aa} | 1,46 ± 0,27 ^{Aa} | 1,59 ± 0,28 ^{Aa} | | | |
| AGNE (mEq/L) | C | 0,24 ± 0,03 ^{Aa} | 0,19 ± 0,04 ^{Aa} | 0,21 ± 0,07 ^{Aa} | 0,58 | 0,049 | 0,66 |
| | T | 0,32 ± 0,05 ^{Aa} | 0,15 ± 0,04 ^{Ab} | 0,16 ± 0,02 ^{Ab} | | | |
| AST (U/L) | C | 79,80 ± 5,30 ^{Aa} | 84,00 ± 4,75 ^{Aa} | 73,50 ± 5,17 ^{Aa} | 0,86 | 0,04 | 0,40 |
| | T | 89,43 ± 5,08 ^{Aa} | 62,67 ± 7,30 ^{Ab} | 78,40 ± 9,64 ^{Aab} | | | |
| GGT (U/L) | C | 22,20 ± 1,84 ^{Aa} | 22,50 ± 3,49 ^{Aa} | 12,25 ± 2,12 ^{Aa} | 0,69 | 0,20 | 0,82 |
| | T | 24,57 ± 1,51 ^{Aa} | 18,50 ± 2,60 ^{Aa} | 15,40 ± 1,01 ^{Aa} | | | |
| IGF-1 (ng/mL) | C | 41,98 ± 10,35 ^{Aa} | 45,34 ± 11,51 ^{Aa} | 113,00 ± 26,82 ^{Aa} | 0,29 | 0,15 | 0,87 |
| | T | 60,04 ± 10,50 ^{Aa} | 58,27 ± 9,41 ^{Aa} | 75,60 ± 13,12 ^{Aa} | | | |
| TOS (mmol Trolox Equivalent/L) | C | 58,04 ± 3,93 ^{Aa} | 60,65 ± 4,17 ^{Aa} | 68,15 ± 5,05 ^{Aa} | 0,67 | 0,41 | 0,66 |
| | T | 64,09 ± 8,77 ^{Aa} | 53,00 ± 6,37 ^{Aa} | 66,36 ± 2,84 ^{Aa} | | | |

¹ Variáveis: BHB= Beta hidroxibutirato; AGNE= Ácido graxo não esterificado; AST= Aspartato aminotransferase; GGT= Gama - glutamiltransferase; IGF= Fator de crescimento semelhante à insulina; TOS= Status oxidante total.

² Grupos experimentais: C= controle; T= tratado (80g de colina protegida).

³ Momentos experimentais: coletas realizadas após 10, 20 e 30 da data do parto.

⁴ Nível de significância para o teste de variância dos efeitos fixos tempo, tratamento e tempo x tratamento.

Dados expressos em média ± erro padrão da média; letras maiúsculas diferentes representam significância estatística (p<0,05) na coluna; letras minúsculas diferentes representam significância estatística (p<0,05) nas linhas.

Os ácidos graxos não esterificados (AGNE), precursores do BHBA, são derivados das reservas corporais de energia e a mensuração de seus teores séricos tem sido utilizada para determinar a grau de balanço energético negativo (BEN) em que o animal se encontra (Ospina *et al.*, 2010). Neste estudo, as concentrações desse metabólito foram semelhantes entre os grupos, em todos os tempos experimentais. Entretanto, a colina foi capaz de reduzir os valores dos AGNE nos tempos 20 e 30 do pós-parto em relação aos teores encontrados no dia 10 (Tab. 1). Nenhum animal apresentou teores de AGNE superiores a 0,7 mEq/L, valor associado ao maior risco para ocorrência de doenças no pós-parto de vacas leiteiras (Ospina *et al.*, 2010). Os estudos sobre a suplementação de colina apresentam resultados discrepantes, Xu *et al.* (2006) não observaram diferença nos teores de AGNE, mesmo ao suplementar diferentes doses de colina. No entanto, Pinotti *et al.* (2003) e Cooke *et al.* (2007) relataram redução significativa nos teores de AGNE no pós-parto de vacas suplementadas com colina, assim como observado ao longo do tempo, no presente estudo, em animais tratados com colina protegida.

Não houve diferença entre os grupos nos teores de frutamina e de colesterol (Tab. 1). De acordo com Mostafavi *et al.* (2014), os teores desses dois metabólitos tem relação direta com o metabolismo hepático das gorduras, de tal forma que vacas com teores de frutamina inferiores a 213 $\mu\text{mol/L}$ tem 4,5 vezes mais chance de apresentar lipidose hepática do que animais com concentrações mais elevadas. Destaca-se que, neste estudo, os valores desse metabólito no pós-parto foram menores que 213 $\mu\text{mol/L}$, em todos os animais, assim como os teores de BHBA apresentaram-se elevados, o que poderia indicar uma predisposição a transtornos do metabolismo lipídico neste rebanho.

Não há estudos sobre a ação da colina nos teores de frutamina em vacas leiteiras, no entanto sabe-se que esta glicoproteína está diretamente relacionada com os teores de glicose sanguíneos (Ropstad, 1987). De acordo com essa relação, os resultados do presente estudo foram similares ao observados por Zom *et al.* (2011), que também não detectaram efeito da suplementação com colina nos teores de glicose em vacas leiteiras.

Guretzky *et al.* (2006) descreveram uma correlação positiva entre os teores de colesterol sérico e o consumo de matéria seca, sendo este um marcador metabólico confiável de ingestão para ruminantes. Não houve influência nas concentrações de colesterol do tratamento com colina protegida (Tab. 1). Em estudo realizado por Xu *et al.* (2006), os pesquisadores não relataram mudanças nos teores de colesterol em vacas tratadas com colina protegida. Este comportamento pode estar relacionado ao consumo de matéria seca, que parece não ser influenciado pela suplementação de colina protegida (Xu *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2012). Os teores de colesterol tenderam a variar de acordo com o tempo ($p=0,07$), com teores

apresentando decréscimo no vigésimo dia e aumento aos 30 dias pós-parto, comportamento semelhante foi descrito por Stengärde *et al.* (2008).

As enzimas aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamiltransferase (GGT) são utilizadas como importantes marcadores da atividade hepática. Vacas no período de transição, quando sob intenso BEN, apresentam teores elevados dessas enzimas, alteração associada a grande mobilização de gordura corporal e sobrecarga hepática por triglicerídeos (González *et al.*, 2011). No presente estudo, de acordo como os teores de AGNE encontrados, o BEN foi moderado, havendo, portanto, menor mobilização de gordura. Os teores de AST mantiveram-se abaixo daqueles descritos para vacas em transição (Alvarenga *et al.*, 2015), indicando que o BEN moderado não proporcionou alteração hepática expressiva. Não houve diferença nos valores de AST e GGT entre os grupos experimentais (Tab. 1), assim como descrito por Jorritsma *et al.* (2003). No entanto, em relação ao tempo experimental maiores valores de AST foram observados no dia 10 em relação ao vigésimo dia pós-parto ($p=0,04$).

O fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) é produzido pelo fígado, através da ação da somatotropina, possuindo relação direta com o metabolismo energético hepático e com a atividade reprodutiva (Jorritsma *et al.*, 2003) em vacas. De acordo com Kobayashi *et al.* (1999) os teores de IGF-1 encontram-se reduzidos, em vacas leiteiras, desde o dia do parto até cerca de 20 dias pós-parto, quando passa a ser produzido em maior quantidade pelo fígado. Esta mesma tendência foi observada neste estudo com os maiores teores de IGF-1 aos 30 dias pós-parto. A suplementação com colina não alterou as concentrações séricas de IGF-1 (Tab. 1). De acordo com Betschart *et al.* (1986), o fornecimento de dieta deficiente em colina reduz o número de receptores de insulina nos hepatócitos, o que por sua vez reduz a síntese de IGF-1 pelo fígado. Os teores de IGF-1 mantiveram-se dentro dos limites de referência, mesmo nos animais do grupo controle, o que indica síntese adequada desse hormônio e, conseqüentemente, presença de teores mínimos de colina para sua produção, não havendo, portanto, efeito ao se suplementar esse nutriente.

De acordo com Schönfeld e Wojtczak (2008), as concentrações de AGNE, possuem estreita relação com a quantidade de espécies reativas ao oxigênio (EROs) produzida pelo organismo de vacas leiteiras, de tal forma que vacas sob grave BEN apresentam altos teores desses metabólitos. Os EROs são responsáveis por alterações na imunidade e na saúde da vaca leiteira (Sordillo *et al.*, 2009). Não houve diferença no status oxidativo entre grupos e nem entre os momentos de coleta (Tab. 1). Como os teores de AGNE mantiveram-se baixos, pode-se dizer que não houve desafio suficiente para alterar o perfil oxidativo dos animais.

Não houve influência do tratamento na produção de leite. A média de produção para os dois grupos ao final dos primeiros trinta dias de lactação foi de $26,7 \pm 1,1$ L/dia para o grupo controle e de $25,7 \pm 0,6$ L/dia para o grupo tratado. Resultados semelhantes foram descritos por Davidson *et al.* (2008) e por Zom *et al.* (2011). No entanto, Zahra *et al.* (2006) detectaram um aumento médio de 1,2 Kg nos primeiros 60 dias pós-parto quando os animais foram suplementados com colina e Pinotti *et al.* (2003) descreveram um aumento médio de 2,9 Kg no primeiro mês de lactação em vacas tratadas com colina. Tanto no estudo de Pinotti *et al.* (2003), quanto no estudo de Zahra *et al.* (2006) os teores de AGNE do grupo controle estavam acima de 0,5 mEq/L; entretanto, os valores de AGNE obtidos neste estudo e nos experimentos realizados por Davidson *et al.* (2008) e Zom *et al.* (2011) foram inferiores a 0,5mE/L o que pode indicar que a colina protegida apresenta-se mais eficaz em indivíduos que experimentam um BEN mais grave, melhorando inclusive o desempenho produtivo desses animais, como ocorreu nos estudos citados.

Tabela 2. Ocorrência de endometrite e intervalo entre parto e concepção (média \pm erro padrão) de vacas leiteiras suplementadas com colina protegida.

| Grupos experimentais | Endometrite aos 60 dias | |
|----------------------|-------------------------------------|---|
| | (número de casos/número de animais) | Intervalo parto-concepção (dias) ¹ |
| Controle | 4/7 | 120 \pm 21 ^a |
| Tratado | 1/8 | 140 \pm 34 ^a |

¹Número de dias entre o parto e a data da inseminação com prenhes confirmada.

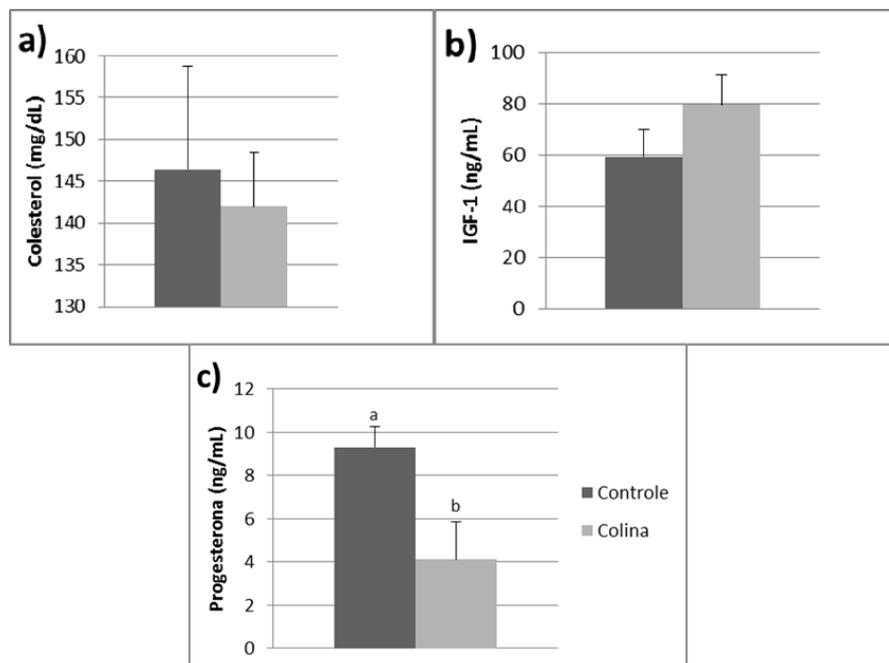
Letras diferentes na coluna denotam diferença estatística ($p < 0,05$).

Quanto à saúde uterina, as vacas do grupo tratado apresentaram menor número de casos de endometrite aos 60 dias pós-parto em comparação aos animais do grupo controle (Tab. 2). Apesar de menor número de problemas reprodutivos em animais suplementados, não houve diferença quanto ao intervalo entre o parto e a concepção entre os grupos. Resultados semelhantes foram obtidos por Lima *et al.* (2012). A endometrite é responsável por considerável aumento no custo de produção levando a gastos com tratamento medicamentoso e redução da eficiência reprodutiva do rebanho. A relação do tratamento com colina e o menor número de casos de endometrite aos 60 dias de lactação não está clara no presente estudo. No entanto, sugere-se que esta relação esteja associada ao efeito da colina sobre a resposta imune.

Estudos realizados em outras espécies mostraram que a suplementação de colina aumenta a resposta imune humoral e modula a resposta inflamatória inespecífica (Swain e Johri, 2000; Mehta et al., 2010).

Aos 60 dias pós-parto foram mensurados os teores de IGF-I, colesterol e progesterona, não havendo diferença estatística entre os grupos para os dois primeiros parâmetros (Fig. 1). Alterações no status energético, como BEN intenso, elevados teores de AGNE e BHBA retardam o retorno da atividade ovariana no pós-parto de vacas leiteiras (Jorritsma *et al.*, 2003). Quanto à progesterona, os animais do grupo controle apresentaram maior concentração sérica desse hormônio em comparação ao grupo suplementado ($p=0,04$). Levando-se em consideração o resultado dos exames ginecológicos, com maior número de animais com endometrite no grupo controle aos 60 dias, maiores valores de progesterona obtidos neste grupo podem estar relacionados com a presença de corpo lúteo persistente (Bulman e Wood, 1980). Portanto, pode-se dizer que a suplementação com colina reduz a ocorrência de corpo lúteo persistente, reduzindo os teores de progesterona aos 60 dias pós-parto.

Figura 1. Efeito da suplementação com colina protegida sobre os teores de colesterol, fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) e progesterona aos sessenta dias pós-parto.



a) Teores de colesterol sérico aos 60 dias de lactação em animais suplementados ou não com colina protegida. b) Teores de fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) aos 60 dias de lactação em animais suplementados ou não com colina protegida. c) Teores de progesterona sérico aos 60 dias de lactação em animais suplementados ou não com colina protegida.

Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística ($p<0,05$).

Conclusão

A suplementação de colina protegida no pré e pós-parto não altera os parâmetros bioquímicos de vacas leiteiras nos primeiros 30 dias de lactação. No entanto, reduz o número de casos de endometrite aos 60 dias.

Referências

- ALVARENGA, E.A.; MOREIRA, G.H.F.A.; FACURY FILHO, E.J. *et al.* Avaliação do perfil metabólico de vacas da raça Holandesa durante o período de transição. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 35, n. 3, p. 281-290, 2015.
- BETSCHART, J.M.; VIRJI, M.A.; PERERA, M.I.R.; SHINOZUKA, H. Alterations in hepatocyte insulin receptors in rats fed a choline-deficient diet. *Cancer Res.*, v. 46, p. 4425-4430, 1986.
- BULMAN, D.C.; WOOD, P.D.P. Abnormal patterns of ovarian activity in dairy cows and their relationships with reproductive performance. *Anim. Prod.*, v. 30, p.177-188, 1980.
- COOKE, R.F.; DEL RIO, N.S.; CARAVIELLO, D.Z. *et al.* Supplemental choline for prevention and alleviation of fatty liver in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, v. 90, p. 2413-2418, 2007.
- DAVIDSON, S.; HOPKINS, B.A.; ODLE, J. *et al.* Supplementing limited methionine diets with rumen-protected methionine, betaine, and choline in early lactation Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, v. 91, p. 1552-1559, 2008.
- 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. *J. Dairy Sci.*, v. 84, Supl. E, p. 100-112, 2001.
- DUFFIELD, T.F.; LISSEMORE, K.D.; MCBRIDE, B.W.; LESLIE, K.E. Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *J. Dairy Sci.*, v. 92, n. 2, p. 571-580, 2009.

EREL, O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin. Biochem.*, v. 37, p. 112-119, 2004.

GONZÁLEZ, F.D.; MUIÑO, R.; PEREIRA, V. *et al.* Relationship among blood indicators of lipomobilization and hepatic function during early lactation in high-yielding dairy cows. *J. Vet. Sci.*, v. 12, n. 3, p. 251-255, 2011.

GRUNERT, E.; GREGORY, R. (Ed.) *Obstetrícia Veterinária*. 2. ed., Brasil: Sulina, 1989. p. 323.

GURETZKY, N.A.J.; CARLSON, D.B.; GARRETT, J.E.; DRACKLEY, J.K. Lipid metabolite profiles and milk Production for Holstein and Jersey cows fed rumen-protected choline during the periparturient period. *J. Dairy Sci.*, v. 89, p. 188-200, 2006.

JORRITSMA, R.; WENSING, T.; KRUIP, T.A.M. *et al.* Metabolic changes in early lactation and impaired reproductive performance in dairy cows. *Vet. Res.*, v. 34, p. 11-26, 2003.

KOBAYASHI, Y.; BOYD, C.K.; BRACKEN, C.J. *et al.* Reduced growth hormone receptor (GHR) messenger ribonucleic acid in liver of periparturient cattle is caused by a specific down-regulation of GHR 1^a that is associated with decreased insulin-like growth factor-I. *Endocrinol.*, v. 140, p. 3947-3954, 1999.

LIMA, F.S.; SÁ FILHO, M.F.; GRECO, L.F.; SANTOS, J.E.P. Effects of feeding rumen-protected choline on incidence of diseases and reproduction of dairy cows. *The Vet. J.*, v. 193, p. 140-145, 2012.

MEHTA, A.K.; SINGH, B.P.; ARORA, N.; GAUR, S.N. Choline attenuates immune inflammation and suppresses oxidative stress in patients with asthma. *Immunobiol.*, v. 215, p. 527-534, 2010.

MOSTAFAVI, M.; SEIFI, H.A.; MOHRI, M.; JAMSHIDI, A. Evaluation of fructosamine as a new biomarker for diagnosis of hepatic lipidosis in dairy cows. *Anim. Prod. Sci.*, v. 55, n. 8, p. 1005-1010, 2014.

NATIONAL research council (NRC). Nutrient requirements of dairy cattle. EUA: National Academy Press. Ed. 7, 2001.

OETZEL, G.R. Monitoring and testing dairy herds for metabolic diseases. *Vet. Clin. Food Anim. Pract.*, v. 20, n. 3, p. 651-674, 2004.

OSPINA, P.A.; NYDAM, D.V.; STOKOL, T. *et al.* Evaluation of nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: critical thresholds for prediction of clinical diseases. *J. Dairy Sci.*, v. 93, n. 2, p. 546-554, 2010.

PIEPENBRINK, M.S.; OVERTON, T.R. Liver metabolism and production of cows fed increasing amounts of rumen-protected choline during the periparturient period. *J. Dairy Sci.*, v. 86, p. 1722-1733, 2003.

PINOTTI, L.; BALDI, A.; POLITIS, I. *et al.* Rumen-protected choline administration to transition cows: effects on milk production and vitamin E status. *J. Vet. Med.*, v. 50, p. 18-21, 2003.

ROPSTAD, E. Serum fructosamine levels in dairy cows related to metabolic status in early lactation. *Acta. Vet. Scand.*, v. 28, p. 291-298, 1987.

SCHÖNFELD, P.; WOJTCZAK, L. Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 45, p. 231-241, 2008.

SORDILLO, L.M.; CONTRERAS, G.A.; AITKEN, S.L. Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows. *Anim. Health Res. Rev.* v. 10, n. 1, p. 53-63, 2009.

STENGÄRDE, L.; TRÅVÉN, M.; EMANUELSON, U. *et al.* Metabolic profiles in five high-producing Swedish dairy herds with a history of abomasal displacement and ketosis. *Acta Vet. Scandinavica*, v. 50, n. 31, p. 1-11, 2008.

SWAIN, B.K.; JOHRI, T.S. Effect of supplemental methionine, choline and their combinations on the performance and immune response of broilers. *Br. Poult. Sci.*, v. 41, n.1, p. 83-88, 2000.

XU, G.; YE, J.; LIU, J.; YU, Y. Effect of rumen-protected choline addition on milk performance and blood metabolic parameters in transition dairy cows. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, v. 19, n. 3, p. 390-395, 2006.

ZAHRA, L.C.; DUFFIELD, T.F.; LESLIE, K.E. *et al.* Effects of rumen-protected choline and monensin on milk production and metabolism of periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v. 89, p. 4808-4818, 2006.

ZEISEL, S.H.; HOLMES-McNARY, M. Choline. In: RUCKER, R.B.; SUTTIE, J.W.; MCCORMICK, D.B. (Ed.) *Handbook of Vitamins*. 3^a ed., EUA: Marcel Dekker Inc., 2001, p.513-528.

ZOM, R.L.G.; VAN BAAL, J.; GOSELINK, R.M.A. Effect of rumen-protected choline on performance, blood metabolites, and hepatic triacylglycerols of periparturient dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, v. 94, p. 4016-4027, 2011.

4. CAPÍTULO II

Artigo a ser enviado para o periódico Semina – Ciências Agrárias. Universidade Estadual de Londrina (UEL).

Efeito da suplementação de colina protegida no pré-parto sobre o perfil metabólico de vacas leiteiras durante o pós-parto

Effect of prepartum supplementation of protected choline on metabolic profile of dairy cows during of the postpartum

Aires, A.R.^{1*}; Rocha, R.X.²; Menegat, C.²; Berto, T.²; Torbitz, V.D.²; Moresco, R.²; Leal, M.L.R.²

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

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

* Autor para correspondência: adelina_ravet@yahoo.com.br.

Resumo

Durante o periparto as vacas leiteiras experimentam uma grande demanda de energia, ao mesmo tempo em que reduzem sua ingestão de matéria seca. O balanço energético negativo, resultante dessa equação, acarreta severos transtornos metabólicos, a produção e, principalmente, a reprodução. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da colina protegida sobre os parâmetros metabólicos, a performance reprodutiva e a produção de leite em vacas no período de transição. Cinquenta e quatro vacas no pré-parto foram divididas em três grupos: controle, suplementação com colina por 10 dias pré-parto (T10) e suplementação com colina por 20 dias pré-parto (T20). Após o parto foram mensurados os teores de frutamina, colesterol, ácidos graxos não esterificados (AGNE), beta-hidroxibutirato (BHB), aspartato aminotransferase (AST), gama glutamiltransferase (GGT) e total de oxidantes (TOS), nos dias 10, 20 e 30. Ainda foram avaliadas produção de leite e intervalo entre parto e concepção. Não houve efeito da suplementação com colina sobre os parâmetros sanguíneos e produção. O intervalo entre parto e concepção foi menor no grupo T20. A colina suplementada por 20 durante o pré-parto melhorou a performance reprodutiva de vacas leiteiras, apesar de não alterar o perfil metabólico.

Palavras-chave: Colina protegida, pré-parto, vacas leiteiras, reprodução, produção de leite.

Abstract

During the periparturient dairy cows undergo a large energy demand, at the same time reducing their intake of dry matter. The negative energy balance resulting from this equation leads severe metabolic disorders, production and mainly reproduction. The aim of this study was to evaluate the effect of protected choline on metabolic parameters, reproductive performance and milk production in cows during the transition period. Fifty-four cows during prepartum were divided into three groups: control, supplementation with choline for 10 days prepartum (T10) and supplementation with choline for 20 days prepartum (T20). After delivery we have been measured fructosamine levels, cholesterol, non-esterified fatty acids (NEFA), beta-hydroxybutyrate (BHB), aspartate aminotransferase (AST), gamma glutamyltransferase (GGT) and total oxidant (TOS) on days 10, 20 and 30 were also evaluated milk production and interval between calving and conception. There was no effect of supplementation with choline on blood and production parameters. The interval between calvin and conception was lower in T20 group. Choline supplemented by 20 during the antepartum improved reproductive performance of dairy cows, although not change the metabolic profile.

Keywords: protected choline, prepartum, dairy cows, reproduction, milk production.

Introdução

O período de transição compreende a fase do ciclo produtivo em que as vacas leiteiras são submetidas às mais severas alterações em seu metabolismo. O aumento da demanda por energia ocasionada pelo final da gestação e início da lactação, bem como a redução no consumo de matéria seca modificam o balanço energético das vacas nessa fase tornando-o negativo. O balanço energético negativo (BEN) desencadeia uma série de reações no organismo com o intuito de disponibilizar mais energia, principalmente através da mobilização de gordura das reservas corporais. O BEN e a consequente mobilização de gordura predis põem as vacas em transição a transtornos metabólicos e de saúde que reduzem sua produtividade e causam inúmeros prejuízos ao sistema produtivo leiteiro (ESPOSITO et al., 2014).

A colina é classificada como uma vitamina do complexo B por sua semelhança a esses compostos e tem sido estudada como alternativa para minimizar os efeitos do BEN em vacas no período de transição. A colina atua no metabolismo da gordura a nível hepático, desempenhando importante papel na remoção do excesso desse metabólito através de sua

participação como componente essencial das moléculas de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) (PINOTTI et al., 2002). Seu uso como suplemento para vacas leiteiras tem sido estudado, para tratamento e prevenção de lipidose hepática e cetose (COOKE et al., 2007), com bons resultados.

A comercialização de colina protegida por empresas de nutrição e sua inclusão em rações comerciais para vacas no periparto vem crescendo no Brasil. No entanto, ainda há grande discussão quanto ao retorno financeiro oriundo desse manejo; e o ponto mais crítico está associado ao tempo de suplementação. Alguns estudos têm comprovado que a suplementação de colina durante o pré e pós-parto apresenta efeito benéfico na produção, na saúde e atividade reprodutiva (ARDALAN et al., 2009; XU et al., 2006; MOHSEN et al., 2011). No entanto, a suplementação de colina apenas no pré-parto ainda é pouco estudada e apresenta efeitos discrepantes (LIMA et al., 2012). O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação de colina protegida, apenas no pré-parto, sobre os principais parâmetros metabólicos e intervalo entre parto-concepção em vacas leiteiras.

Materiais e métodos

O presente estudo foi conduzido em uma propriedade leiteira comercial de grande porte, localizada na cidade de Xanxerê, Santa Catarina, entre os meses de maio e outubro de 2014. Foram selecionadas 54 vacas holandesas com escore corporal entre 3 e 4, pertencentes ao grupo de animais no período seco. De acordo com o manejo utilizado na propriedade, as vacas, durante o período seco foram mantidas em piquete com baixa oferta de pastagem de tifton (*Cynodon dactylon*) e receberam silagem de milho (9 Kg de matéria seca), bem como ração específica para o período pré-parto (5 Kg por vaca por dia), produzida na propriedade com inclusão de 1% de sais aniônicos.

As vacas selecionadas foram divididas em três grupos, onde o primeiro grupo, com 21 animais, recebeu 80 gramas de colina protegida diariamente (Toplac Transição – Nutrifarma, Taió, Brasil) por 20 dias até a data do parto (T20), o segundo (15 animais) recebeu a mesma dose de colina por 10 dias pré-parto (T10) e o terceiro grupo foi composto por 18 animais controle, sem suplementação. A colina foi fornecida de forma individual, juntamente com a ração.

Amostras de sangue foram coletadas no dia 20 pré-parto, no grupo T20 e no grupo controle; e no dia 10 pré-parto em todos os grupos para avaliação dos teores de beta-hidroxi-butirato através da punção dos vasos coccígeos. Concentrações desse metabólito superiores a 3 mmol/L no pré-parto indicam cetose clínica (Oetzel, 2004) e animais nessa

condição foram excluídos do experimento. Foram coletadas ainda amostras de urina mediante estímulo manual na região do períneo e o pH urinário foi mensurado utilizando-se pHmetro digital portátil (Instrutherm). Para descartar a influência da hipocalcemia sobre o desempenho pós-parto, animais com pH superior a 7 foram retirados do experimento.

Após o parto os animais foram encaminhados para o galpão de confinamento onde passaram a receber dieta a base de silagem de milho (12 Kg de matéria seca), feno de azevém e aveia (2 kg de matéria seca) e ração para lactação formulada na propriedade (10 Kg). Amostras de sangue foram coletadas nos dias 10, 20 e 30 pós-parto (PP) 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.

Foram determinados os teores séricos de frutamina, de colesterol, e das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e gama-glutamilttransferase (GGT), utilizando-se kits comerciais (Bioclin), assim como as concentrações séricas dos ácidos graxos não esterificados (kit comercial Wako), e do beta-hidroxibutirato (kit comercial Randox). Os oxidantes totais (TOS) foram mensurados de acordo com a técnica descrita por Erel (2005). Todas as análises foram realizadas em analisador bioquímico automático (Cobas Mira - Roche Diagnostics). A ordenha foi realizada três vezes ao dia, através de ordenhadeira tipo carrocel e a produção de leite individual foi mensurada nos dias 10, 20 e 30 do experimento, utilizando-se sistema automático de pesagem de leite. Através das fichas de acompanhamento individual obteve-se as informações de intervalo entre parto e concepção.

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (108/2013). Os dados foram testados quanto à normalidade utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Parâmetros com distribuição não-paramétrica passaram por transformação logarítmica ($\log(10) + 1$). O efeito do tratamento, do tempo e da interação desses dois fatores sobre os parâmetros sanguíneos foram analisados através do comando proc mixed (SAS). As médias ajustadas (LSMeans) dos fatores fixos foram comparadas através da diferença mínima significativa (LSD), obtida pelo teste “t” a um nível de significância de 5%. Para o intervalo entre parto e concepção foi realizada comparação de médias através do teste de Tukey com nível de significância de 5%. Os resultados foram expressos em médias \pm erro padrão. Os dados foram analisados pelo programa estatístico SAS (versão 8.02, programa SAS, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA).

Resultados

O pH urinário médio permaneceu dentro dos teores recomendados nos dias 20 e 10 pré-parto, $6,22 \pm 0,15$ e $6,41 \pm 0,24$, respectivamente. Três animais foram retirados do experimento ao apresentar pH superior a 7,0 nas duas mensurações. Durante o pré-parto, todos os animais permaneceram com os teores de BHB abaixo de 3,0 mmol L. Os teores médios de BHB foram de $1,08 \pm 0,22$ (mmol L) aos 20 dias pré-parto e de $1,12 \pm 0,28$ mmol L aos 10 dias. Outros cinco animais foram retirados do experimento após o parto. Dois deles morreram em decorrência de complicações do parto e os outros apresentaram hipocalcemia clínica (1 vaca) e deslocamento de abomaso (2 vacas).

Não houve influência da suplementação com colina nos teores de colesterol. No entanto, dentro dos grupos observou-se aumento nos teores deste metabólico ao longo do tempo. Os animais do grupo T10, apresentaram maiores valores médios de colesterol no dia 30 PP em relação ao dia 10 ($p=0,02$) (Tabela 1)

A suplementação com colina não alterou as concentrações de frutossamina. Quanto ao efeito do tempo, nos grupos controle e T10, a frutossamina apresentou comportamento crescente (Tabela 1). Os animais do grupo controle apresentaram maiores valores de frutossamina aos 30 dias pós-parto em relação aos demais momentos experimentais ($p=0,004$). No grupo T20 observaram-se maiores teores de frutossamina no dia 20 PP em relação à primeira coleta (dia 10).

Quanto ao BHB e os AGNE, não foram observados efeitos dos tratamentos ou do tempo nos teores séricos destes metabólitos (Tabela 1). Em relação ao ponto de corte para cetose clínica, apenas dois animais apresentaram teores de BHB acima de 3,0 mmol /L, durante o pós-parto, sendo então excluídos dos grupos experimentais.

Não houve efeito do tratamento sobre a atividade das enzimas AST e GGT. No entanto, numericamente, as concentrações de AST e GGT permaneceram menores no grupo T20 em todos os momentos experimentais em comparação aos demais grupos (Tabela1). Quanto ao efeito do tempo, observou-se redução dos teores de AST no dia 30 em comparação ao dia 10 no grupo T10 ($p=0,002$). O total de oxidantes (TOS) séricos não sofreu influência da suplementação com colina. Em relação ao tempo, a concentração de TOS foi maior no dia 10 em relação ao dia 20 ($p=0,001$) no grupo controle (Tabela 1).

Não houve influência da suplementação com colina na produção de leite. Ao longo do tempo observou-se aumento numérico na produção de leite em todos os grupos experimentais. Em relação ao intervalo entre parto e concepção, observou-se que vacas suplementadas com colina por 10 dias no período pré-parto demoraram mais para conceber em comparação às vacas

que foram suplementadas por 20 dias ($p=0,04$) (Tabela 2), não havendo diferença entre os grupos tratados e o grupo controle ($p>0,05$) para esse parâmetro.

Discussão

No presente estudo, os teores de colesterol apresentaram padrão crescente em todos os grupos, comportamento que acompanha a ingestão de matéria seca, que de acordo com Grummer et al. (2004) aumenta gradativamente após o parto. Em estudo realizado por Xu et al. (2006), os teores de colesterol elevaram-se ao longo das semanas pós-parto, de forma semelhante entre animais suplementados com colina ou não. O colesterol é um conhecido marcador de ingestão de matéria seca (EMERY, 1992), e teores reduzidos desse lipídio estão associados à baixa ingestão de alimento. A suplementação pré-parto com colina parece não afetar as concentrações de colesterol, assim como descrito para estudos com suplementação prolongada até o pós-parto (GURETZKY et al., 2006).

A glicose é a principal fonte de energia para as reações do organismo e em vacas no período de transição os teores desse carboidrato encontram-se drasticamente reduzidos, principalmente em decorrência do BEN (GARCÍA et al., 2011). O marcador mais estável para a atividade da glicose é a frutosamina, composto formado pela conjugação da glicose à albumina (STOJEVIC et al., 2010). De acordo com Mostafavi et al. (2014), animais com teores de frutosamina abaixo de $213 \mu\text{mol L}$ no pós-parto tem maior chance de desenvolver lipidose hepática. Os animais dos 3 grupos experimentais apresentaram teores médios desse metabólito inferiores ao ponto de corte estabelecido pelos autores citados, indicando risco para ocorrência de esteatose hepática neste rebanho.

No entanto, a frutosamina apresentou padrão crescente ao longo do tempo nos grupos experimentais, assim como observado nos estudos de Zahra et al. (2006) e García et al. (2011), para a glicose. Sabe-se que este comportamento está relacionado ao aumento gradativo da ingestão de matéria seca, observado a partir da segunda semana de lactação (GRUMMER et al., 2004). Em estudo realizado por Hartwell et al. (2000), vacas suplementadas com colina durante o pré e pós-parto, tenderam a apresentar teores de glicose superiores aos encontrados em animais não tratados, o que não foi observado nos teores de frutosamina neste estudo.

Fisiologicamente, os teores de AGNE são drasticamente modificados pelo período de transição, apresentando elevação gradativa até o parto e decrescendo ao longo da lactação (PUSHPAKUMARA et al., 2003). Neste estudo não se observou efeito significativo do tempo de lactação sobre esse parâmetro. Alvarenga et al. (2015), também não observaram efeito do tempo sobre os teores de AGNE durante os primeiros 20 dias PP. Em relação o tratamento com

colina, alguns estudos demonstraram o efeito benéfico da colina sobre o BEN, com consequente redução de AGNE, quando utilizado durante o PP (PINOTTI et al., 2001; XU et al., 2006), no entanto, o fornecimento de colina apenas no pré-parto em vacas leiteiras sob BEN moderado não apresentou o mesmo resultado.

A colina atua como doadora de grupamentos metil para a formação de carnitina (HEGARDT, 1999), substância indispensável para o transporte dos ácidos graxos para o interior da mitocôndria, onde ocorre a oxidação desses lipídios. De acordo com Carter e Frenkel (1978), em situações de BEN acentuado, a deficiência de colina na dieta leva a rápida redução dos teores de carnitina, o que resulta em severas alterações no metabolismo da gordura e menor eficiência na sua utilização como fonte de energia. Neste estudo o balanço energético negativo, não foi acentuado, portanto, sugere-se que no geral os teores de carnitina mantiveram-se dentro do fisiológico não havendo demanda de colina suplementar para sua produção.

De acordo com Oetzel (2004), animais com mais de 0,4 mEq L de AGNE encontram-se sob acentuado balanço energético negativo. Durante o período experimental apenas dois animais apresentaram teores desse metabólito acima de 0,4 mEq L. O primeiro animal, pertencente ao grupo controle, apresentou 0,66 mEq L de AGNE, no dia 10 PP, enquanto que no segundo animal, pertencente ao grupo T10, os teores de AGNE foram de 1,18 mEq L, no dia 30 PP. De acordo com a ficha individual, o segundo animal apresentou quadro de mastite clínica aos 25 dias de lactação, o que explica a alta concentração de AGNE. García et al. (2011), detectaram que 12,1% das vacas estavam sob balanço energético severo (ponto de corte 0,7 mEq L), durante o pós-parto. Neste estudo, observou-se apenas 4,9% dos animais com teores de AGNE acima de 0,4 mEq L, indicando um BEN menos acentuado.

A cetose subclínica é um dos transtornos mais frequentes em vacas leiteiras sob severo BEN no pós-parto, e suas consequências na vida produtiva e reprodutiva podem ser bastante graves (SUTHAR et al., 2013). A colina quando suplementada antes e após o parto foi apontada como uma excelente estratégia para a prevenção da hipercetonemia (LIMA et al., 2012). No entanto, a suplementação apenas no período pré-parto não influenciou a ocorrência de cetose subclínica. Em estudo realizado por Cooke et al. (2007), a suplementação de colina durante o pré-parto não afetou os teores de BHB de vacas submetidas à restrição alimentar, mas observou-se redução das concentrações de AGNE.

A AST e a GGT são os principais marcadores de lesão hepática aguda em bovinos, e durante o período de transição seus teores apresentam-se relativamente elevados (STOJEVIC et al., 2005). A atividade média de AST e GGT neste estudo foi inferior ao descrito por González et al. (2010) para vacas no primeiro mês de lactação. Essa variação deve estar

relacionada à diferença na produção de leite e na demanda energética observada entre os dois estudos. No estudo de González et al. (2010) a produção de leite foi de 41,1 litros enquanto a produção média das vacas dos três grupos experimentais foi muito inferior (27,4 litros), o que resulta em grande diferença na demanda de energia e, conseqüentemente, de teor de gordura nos hepatócitos.

Neste estudo, os teores de AST reduziram gradativamente desde o dia 10 até o dia 30 pós-parto em todos os grupos, assim como observado por Oliveira et al. (2014). De acordo com González et al. (2010), a atividade da AST é correlacionada com os teores de AGNE, portanto a redução do BEN gradativo que ocorre após o parto, resulta em redução também da atividade dessa enzima.

Em estudo realizado por Bonomi et al. (1996), vacas suplementadas com colina durante a lactação apresentaram atividade da enzima GGT reduzida em relação aos animais do grupo controle. Rahmani et al. (2012) observaram apenas uma redução numérica nos teores de AST e GGT para animais suplementados durante a lactação. Não foi relatado efeito da suplementação de colina durante o pré e pós-parto na atividade dessas enzimas no estudo realizado por Zahra et al. (2006).

O balanço energético negativo experimentado pela vaca durante o período de transição, de acordo com Bernaducci et al. (2005), está diretamente associado à ocorrência de estresse oxidativo. O estresse oxidativo é o resultado da equação entre a produção de espécies reativas ao oxigênio (ERO) e ao nitrogênio (ERN) e atividade dos antioxidantes (SPEARS e WEISS, 2008). O excesso de ERO e ERN passa a atuar sobre inúmeras moléculas causando danos moleculares às estruturas celulares, com conseqüente alteração funcional e prejuízo nas atividades vitais (DRÖGE, 2002). Segundo Sordillo et al. (2007), após o parto a atividade metabólica acelerada, em decorrência do BEN, intensifica a produção de hidroperóxidos lipídicos (produtos da ação dos ERO sobre lipídios), o que resulta em maior pré-disposição à doenças metabólicas e infecciosas (SHARMA et al., 2011). No presente estudo, a produção total de oxidantes foi mais acentuada aos 10 dias após o parto, reduzindo nas coletas seguintes. Ao contrário dos resultados descritos por Bernaducci et al. (2005), que descreveram um aumento gradativo de espécies reativas ao oxigênio desde o parto até os 30 dias de lactação.

Não há relatos dos efeitos da colina sobre o status oxidativo em vacas leiteiras. De acordo com Zhu et al. (2014), em tecido hepático humano, a colina age diretamente como doadora de grupamentos metil durante a expressão de genes específicos da cascata antioxidante e de genes associados à degradação de gordura no fígado, o que poderia estar associado à ação antioxidante da colina em humanos.

A produção de leite não foi influenciada pela suplementação com colina durante o pré-parto. Em estudos com suplementação prolongada, os resultados são discrepantes. Xu et al. (2006) e Mohsen et al. (2011) observaram que a colina aumentou a produção de leite em vacas holandesas. No entanto, Zom et al. (2011) não detectaram efeito da colina protegida na performance produtiva. A grande variação entre dose e tempo de tratamento pode estar associada com a discrepância dos resultados. No estudo de Lima et al. (2012), vacas suplementadas apenas no pré-parto tenderam a maior produção em relação aquelas do grupo controle, nos primeiros 80 dias de lactação.

O intervalo entre parto e concepção foi menor em animais do grupo T20 quando comparados ao grupo T10. Vacas do grupo T20 tenderam a apresentar um menor intervalo entre parto e concepção em comparação ao grupo controle ($p=0,08$). No estudo de Lima et al. (2012), a suplementação de colina por 22 dias pré-parto não afetou o intervalo entre parto e concepção. A reprodução é drasticamente afetada pelo balanço energético (JORRITSMA et al., 2003), de tal forma que Garverick et al. (2013) relatam que vacas com maiores concentrações de AGNE no início da lactação concebem mais tarde. O grupo T10 apresentou o maior intervalo entre parto e concepção, bem como os maiores valores numéricos de AGNE aos 30 dias PP, sugerindo o efeito negativo desse metabólito sobre a performance reprodutiva.

Conclusão

A suplementação com colina protegida durante o pré-parto não altera o perfil metabólico de vacas sob balanço energético negativo moderado, durante os primeiros 30 dias de lactação. O fornecimento de colina por 20 dias pré-parto reduz em 38 dias o intervalo entre o parto e a concepção.

Referências

ALVARENGA, E.A.; MOREIRA, G.H.F.A.; FACURY FILHO, E.J.; LEME, F.O.P.; COELHO, S.G.; MOLINA, L.R.; JULIANA A.M. LIMA, J.A.M.; CARVALHO, A.U. Avaliação do perfil metabólico de vacas da raça Holandesa durante o período de transição. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 35, n. 3, p. 281-290, 2015.

ARDALAN, M.; REZAYAZDI, K.; DEGHAN-BANADAKY, M. Investigation on the effect of supplementing rumen-protected forms of methionine and choline on health situation and reproductive performance of Holstein cows. **Pakistan Journal of Biological Sciences**. v. 12, n. 1, p. 69-73, 2009.

BERNABUCCI, U.; RONCHI, B.; LACETERA, N.; NARDONE, A. Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 88, p. 2017-2026, 2005.

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**. v. 87, p. 3105-3124, 2004.

BONOMI, A.; QUARANTELLI, A.; BONOMI, B.M.; SABBIONE, A.; SUPERCHI, P. Dairy cattle ration integration with rumen protected choline. Effects on productions and reproductive efficiency. **La Revista di Scienza Dell'alimentazione**. v. 25, n. 4, p. 413-434, 1996.

CARTER, A.L.; FRENKEL, R. The Relationship of choline and carnitine in the choline deficient rat. **Journal of Nutrition**. v. 108, n. 11, p. 1748-1754, 1978.

COOKE, R.F.; SILVA DEL RI' O, N.; CARAVIELLO, D.Z.; BERTICS, S.J.; RAMOS, M.H.; GRUMMER, R. R. Supplemental choline for prevention and alleviation of fatty liver in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**. v. 90, p. 2413-2418, 2007.

DE VRIES, M.J.; VAN DER BEEK, S.; KAAL-LANSBERGEN, L.M.T.E.; OUWELTJES, W.; WILMINK, J.B.M. Modeling of energy balance in early lactation and the effect of energy deficits in early lactation on first detected estrus postpartum in dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 82, n. 9, p. 1927-1934, 1999.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Na**. v. 82, p. 47-95, 2002.

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

EMERY, R.S; LIESMAN, J.S.; HERDT, T.H. Metabolism of long chain fatty acids by ruminant liver. **Journal of Nutrition**. v. 122, supl. 3, p. 832-837.

EREL, O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. **Clinical Biochemistry**. v. 37, p. 112-119, 2004.

ESPOSITO, G.; IRONS, P.C.; WEBB, E.C.; CHAPWANYA, A. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. **Animal Reproduction Science**. v. 144, n. 3-4, p. 60-71, 2014.

GARCÍA, A.M.B; CARDOSO, F.C.; CAMPOS, R.; THEDY, D.X. GONZÁLEZ, F.H.D. Metabolic evaluation of dairy cows submitted to three different strategies to decrease the effects of negative energy balance in early postpartum. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 31, supl.1, p. 11-17, 2011.

GARVERICK, H.A.; HARRIS, M.N.; VOGEL-BLUEL, R.; SAMPSON, D.; BADER, J.; LAMBERSON, W.R.; SPAIN, J.N.; LUCY, M.C.; YOUNGQUIST, R.S. Concentrations of nonesterified fatty acids and glucose in blood of periparturient dairy cows are indicative of pregnancy success at first insemination. **Journal of Dairy Science**. v. 96, n. 1, p. 181-188, 2013.

GOFF, J.P.; HORST, R.L. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. **Journal of Dairy Science**. v. 80, p. 1260-1268, 1997.

- GONZÁLEZ, F.D.; MUIÑO, R.; PEREIRA, V.; CAMPOS, R.; BENEDITO, J.L. Relationship among blood indicators of lipomobilization and hepatic function during early lactation in high-yielding dairy cows. **Journal of Veterinary Science**. v. 12, n. 3, p. 251-255, 2010.
- GRUMMER, R.R.; MASHEK, D.M.; HAYIRLI, A. Dry matter intake and energy balance in the transition period. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. v. 20, p. 447-470, 2004.
- GRUNERT, E.; GREGORY, R. (Ed.) **Obstetrícia Veterinária**. 2. ed., Brasil: Sulina, 1989. p. 323.
- GURETZKY, N.A.J.; CARLSON, D.B.; GARRETT, J.E.; DRACKLEY, J.K. Lipid metabolite profiles and milk Production for Holstein and jersey cows fed rumen-protected choline during the periparturient period. **Journal of Dairy Science**. v. 89, p. 188-200, 2006.
- HARTWELL, J.R.; CECAVA, M.J.; DONKIN, S.S. Impact of dietary rumen undegradable protein and rumen-protected choline on intake, peripartum liver triacylglyceride, plasma metabolites and milk production in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 83, p. 2907-2917, 2000.
- HEGARDT, F. G. Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase: A control enzyme in ketogenesis. **Biochemistry Journal**. v. 338, p. 569-582, 1999.
- JORRITSMA, R.; WENSING, T.; KRUIP, T.A.; VOS, P.L.; NOORDHUIZEN, J.P. Metabolic changes in early lactation and impaired reproductive performance in dairy cows. **Veterinary Research**. v. 34, n. 1, p. 11-26, 2003.
- LIMA, F.S.; SÁ FILHO, M.F.; GRECO, L.F.; SANTOS, J.E.P. Effects of feeding rumen-protected choline on incidence of diseases and reproduction of dairy cows. **The Veterinary Journal**. v. 193, p. 140-145, 2012.
- MILLER, J. K.; BRZEZINSKA-LEBODZINSKA, E. Oxidative Stress, Antioxidants, and Animal Function. **Journal of Dairy Science**. v. 76, p. 2812-2823, 1993.
- MOHSEN, M.K.; GAAFAR, H.M.A.; KHALAFALLA, M.M.; SHITTA, A.A; YOUSIF, A.M. Effect of rumen protected choline supplementation on digestibility, rumen activity and milk yield in lactating friesian cows. **Slovak Journal of Animal Science**. v. 44, n. 1, p. 13-20, 2011.
- MOSTAFAVI, M.; SEIFI, H.A.; MOHRI, M.; JAMSHIDI, A. Evaluation of fructosamine as a new biomarker for diagnosis of hepatic lipidosis in dairy cows. **Animal Production Science**. v. 55, n. 8, p. 1005-1010, 2014.
- OETZEL, G.R. Monitoring and testing dairy herds for metabolic diseases. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. v. 20, n. 3, p. 651-674, 2004.
- OLIVEIRA, R.S.B.R.; MOURA, A.R.F.; PÁDUA, M.F.S.; BARBON, I.M.; SILVA, M.E.M.; SANTOS, R.M.; MUNDIM, A.VSAUT, J.P.E. Perfil metabólico de vacas mestiças leiteiras

com baixo escore de condição corporal no periparto. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 34, n. 4, p. 362-368, 2014.

OSPINA, P.A.; NYDAM, D.V.; STOKOL, T.; OVERTON, T.R. (a) Evaluation of nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: critical thresholds for prediction of clinical diseases. **Journal of Dairy Science**. v. 93, n. 2, p. 546-554, 2010.

OSPINA, P.A.; NYDAM, D.V.; STOKOL, T.; OVERTON, T.R. (b) Associations of elevated nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the northeastern United States. **Journal of Dairy Science**. v. 93, n. 4, p. 1596-1603, 2010.

PINOTTI, L.; BALDI, A.; SAVOINI, G.; DELL'ORTO, V. Effects of rumen protected choline on lipid metabolism in periparturient high yielding dairy cows. **Livestock Production Science**. v. 70, p. 176, 2001.

PINOTTI, L.; BALDI, A.; DELL'ORTO, V. Comparative mammalian choline metabolism with emphasis on the high-yielding dairy cow. **Nutrition Research Reviews**. v. 15, p. 315-331, 2002.

PUSHPAKUMARA, P.G.A.; GARDNER, N.H.; REYNOLDS, C.K.; BEEVER, D.E.; WATHES, D.C. Relationships between transition period diet, metabolic parameters and fertility in lactating dairy cows. **Theriogenology**. v. 60, p. 1165-1185, 2003.

RAHMANI, M.G.; KAMALYAN, R.G.; DEHGHAN-BANADAKY, M.J.; MARMARYAN, G.Y. The effect of oral administration of choline on some liver function characterized blood plasma enzymes of early lactating dairy cows. **Biology Journal of Armenia**. v. 3, n. 64, p. 83-86, 2012.

SHARMA, N.; SINGH, N.K.; SINGH, O.P.; PANDEY, V.; VERMA, P.K. Oxidative stress and antioxidant status during transition period in dairy cows. **Asian-Australian Journal of Animal Science**. v. 24, n. 4, p. 479-484, 2011 .

SORDILLO, L.M.; O'BOYLE, N.; GANDY, J.C.; CORL, C.M.; HAMILTON, E. Shifts in thioredoxin reductase activity and oxidant status in mononuclear cells obtained from transition dairy cattle. **Journal of Dairy Science**. v. 90, p. 1186-1192, 2007.

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

STAPLES, C.R.; BURKE, J.M.; THATCHER, W.W. Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows. **Journal of Dairy Science**. v. 81, n. 3, p. 856-871, 1998.

STOJEVIĆ, Z.; PIRŠLJIN, J.; MILINKOVIĆ-TUR, S.; ZDELAR-TUK, M.; LJUBIĆ, B.B. Activities of AST, ALT and GGT in clinically healthy dairy cows during lactation and in the dry period. **Veterinarski Arhiv**. v. 75, n. 1, p. 67-73, 2005.

STOJEVIC', Z.; DAUD, J.; FILIPOVIC', N. The influence of metabolic adaptation during transition period on blood HbA1c and fructosamine concentration in dairy cows. **Tierärztliche Umschau**. v. 65, n. 10, p. 370-375, 2010.

SUTHAR ,V.S.; CANELAS-RAPOSO, J.; DENIZ , A.; HEUWIESER, W. Prevalence of subclinical ketosis and relationships with postpartum diseases in European dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 96, p. 2925-2938, 2013

WATHES, D.C.; FENWICK, M.; CHENG, Z.; BOURNE, N.; LLEWELLYN, S.; MORRIS, D.G.; KENNY, D.; MURPHY, J.; FITZPATRICK, R. Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. **Theriogenology**. v. 68, supl. 1, p. S232-S241, 2007.

XU, G.; YE, J.; LIU, J.; YU, Y. Effect of rumen-protected choline addition on milk performance and blood metabolic parameters in transition dairy cows. **Asian- Australasian Journal of Animal Sciences**. v. 19, n. 3, 390-395, 2006.

ZAHRA, L.C.; DUFFIELD, T.F.; LESLIE, K.E.; OVERTON, T.R.; PUTNAM, D.; LEBLANC, S.J. Effects of rumen-protected choline and monensin on milk production and metabolism of periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 89, p. 4808-4818, 2006.

ZEMPLINI, J.; RUCKER, R.B.; MCCORMICK, D.B.; SUTTIE, J.W. Handbook of vitamins. 4th ed. EUA:CRC Press, 2007. 608 p.

ZHU, J.; WU, Y.; TANG, Q.; LENG, Y.; CAI, W. The Effects of choline on hepatic lipid metabolism, mitochondrial function and antioxidative status in human hepatic c3a cells exposed to excessive energy substrates. **Nutrients**. v. 6, p. 2552-2571, 2014.

Tabela 1 – Médias ajustadas e erro padrão dos parâmetros sanguíneos e produção de leite de vacas no pós-parto. Análise dos efeitos fixos tratamento, tempo e interação tempo x tratamento.

| Parâmetros ¹ | | Momentos experimentais | | | Valor de p ⁴ | | |
|--------------------------------|------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------|-------|--------------------|
| | | Dia 10 PP ³ | Dia 20 PP ³ | Dia 30 PP ³ | Tratamento | Tempo | Tratamento x Tempo |
| Colesterol (mg dL) | C ² | 67,00 ± 2,68 ^{Aa} | 95,14 ± 7,67 ^{Aa} | 109,29 ± 18,89 ^{Aa} | | | |
| | T10 ² | 72,25 ± 9,47 ^{Aa} | 111,33 ± 13,00 ^{Aab} | 116,67 ± 4,25 ^{Ab} | 0,66 | 0,02 | 0,52 |
| | T20 ² | 77,00 ± 12,52 ^{Aa} | 90,33 ± 17,56 ^{Aa} | 97,00 ± 19,86 ^{Aa} | | | |
| Frutosamina (µmol L) | C | 97,54 ± 10,53 ^{Aa} | 99,55 ± 8,90 ^{Aa} | 144,38 ± 13,07 ^{Ab} | | | |
| | T10 | 103,55 ± 10,24 ^{Aa} | 111,58 ± 17,97 ^{Aa} | 178,23 ± 9,53 ^{Aa} | 0,63 | 0,004 | 0,71 |
| | T20 | 70,42 ± 4,00 ^{Aa} | 156,66 ± 19,80 ^{Ab} | 128,34 ± 15,19 ^{Aab} | | | |
| BHBA (mmol L) | C | 0,98 ± 0,11 ^{Aa} | 1,09 ± 0,22 ^{Aa} | 1,11 ± 0,18 ^{Aa} | | | |
| | T10 | 1,02 ± 0,24 ^{Aa} | 1,15 ± 0,21 ^{Aa} | 1,19 ± 0,28 ^{Aa} | 0,48 | 0,75 | 0,39 |
| | T20 | 1,05 ± 0,09 ^{Aa} | 1,12 ± 0,16 ^{Aa} | 1,08 ± 0,23 ^{Aa} | | | |
| AGNE (mEq L) | C | 0,29 ± 0,08 ^{Aa} | 0,17 ± 0,03 ^{Aa} | 0,15 ± 0,03 ^{Aa} | | | |
| | T10 | 0,14 ± 0,01 ^{Aa} | 0,17 ± 0,02 ^{Aa} | 0,48 ± 0,19 ^{Aa} | 0,10 | 0,87 | 0,09 |
| | T20 | 0,26 ± 0,04 ^{Aa} | 0,20 ± 0,05 ^{Aa} | 0,15 ± 0,04 ^{Aa} | | | |
| AST (U L) | C | 91,33 ± 7,11 ^{Aa} | 76,00 ± 11,58 ^{Aa} | 58,57 ± 5,92 ^{Aa} | | | |
| | T10 | 94,00 ± 5,23 ^{Aa} | 87,67 ± 8,04 ^{Aab} | 63,33 ± 1,11 ^{Ab} | 0,99 | 0,002 | 0,96 |
| | T20 | 82,00 ± 1,34 ^{Aa} | 66,00 ± 5,22 ^{Aa} | 53,60 ± 5,88 ^{Aa} | | | |
| GGT (U L) | C | 25,83 ± 2,95 ^{Aa} | 32,57 ± 5,16 ^{Aa} | 16,57 ± 2,61 ^{Aa} | | | |
| | T10 | 30,00 ± 1,77 ^{Aa} | 28,67 ± 1,32 ^{Aa} | 23,33 ± 2,87 ^{Aa} | 0,86 | 0,74 | 0,87 |
| | T20 | 22,00 ± 1,34 ^{Aa} | 24,33 ± 2,87 ^{Aa} | 16,00 ± 2,21 ^{Aa} | | | |
| TOS (mmol Trolox Equivalent L) | C | 83,70 ± 4,15 ^{Aa} | 46,89 ± 6,50 ^{Ab} | 60,11 ± 6,60 ^{Aab} | | | |
| | T10 | 80,42 ± 4,85 ^{Aa} | 75,23 ± 13,26 ^{Aa} | 62,40 ± 7,22 ^{Aa} | 0,42 | 0,001 | 0,36 |
| | T20 | 87,20 ± 1,70 ^{Aa} | 43,33 ± 7,52 ^{Aa} | 71,86 ± 5,57 ^{Aa} | | | |
| Produção de leite (litros) | C | 29,10 ± 3,29 ^{Aa} | 28,57 ± 2,84 ^{Aa} | 30,51 ± 3,52 ^{Aa} | | | |
| | T10 | 28,05 ± 3,47 ^{Aa} | 28,81 ± 5,10 ^{Aa} | 29,43 ± 4,84 ^{Aa} | 0,83 | 0,29 | 0,95 |
| | T20 | 23,86 ± 4,43 ^{Aa} | 24,57 ± 3,34 ^{Aa} | 29,03 ± 4,86 ^{Aa} | | | |

¹ Variáveis: BHB= Beta hidroxibutirato; AGNE= Ácido graxo não esterificado; AST= Aspartato aminotransferase; GGT= Gama - glutamiltransferase; IGF= Fator de crescimento semelhante à insulina; TOS= Status oxidante total.

² Grupos experimentais: C= controle; T10= suplementado por 10 dias pré-parto; T20= suplementado por 20 dias pré-parto.

³ Momentos experimentais: coletas realizadas após 10, 20 e 30 da data do parto.

⁴ Nível de significância para o teste de variância dos efeitos fixos tempo, tratamento e tempo x tratamento.

Dados expressos em média ± erro padrão da média; letras maiúsculas diferentes representam significância estatística (p<0,05) na coluna; letras minúsculas diferentes representam significância estatística (p<0,05) nas linha

Tabela 2 – Efeito da suplementação com colina protegida no intervalo entre parto-concepção em vacas leiteiras.

| Grupos experimentais | Intervalo parto-concepção (dias) ¹ |
|----------------------|---|
| Controle | 121,67 ± 20,96 ^{ab} |
| T10 | 235,5 ± 56,33 ^a |
| T20 | 83,67 ± 18,94 ^b |

¹Dias entre o parto e a data da inseminação com prenhes confirmada e erro padrão. Letras diferentes na coluna denotam diferença estatística entre grupos ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

O período de transição representa a fase mais complexa do ciclo produtivo de vacas leiteiras. O desenvolvimento final do feto, o parto e o início da lactação são processos extremamente distintos e que ocorrem em um curto intervalo de tempo. A adaptação das vacas leiteiras a essas mudanças está vinculada basicamente aos mecanismos de obtenção de energia (DRACKEY et al.; 1999). Falhas nessa adaptação são as principais causas de transtornos durante os primeiros meses pós-parto e pelo descarte precoce de vacas (SEIFI et al., 2011).

A colina tem se destacado na literatura como objeto de inúmeros estudos devido a sua importância para o metabolismo energético de vacas leiteiras (PIEPENBRINK e OVERTON 2003; XU et al., 2006; LIMA et al., 2012). E seu uso na prática vem aumentando atualmente. Uma breve revisão dos estudos a cerca da suplementação de colina em vacas durante o período de transição desperta muitas dúvidas quanto à melhor dose e período de suplementação. O presente estudo utilizou-se de três intervalos bem distintos de suplementação com o intuito de visualizar o quão diferente poderia ser a atuação da colina em decorrência de seu tempo de uso.

Nos CAPÍTULOS I e II, os teores de AGNE apresentaram-se inferiores a 0,7 mEq/L em todos os momentos experimentais, indicando que o BEN e, por consequência, o estresse metabólico enfrentado pelas vacas leiteiras foram de baixa intensidade (OSPINA et al., 2010). De acordo com estes autores há uma estreita relação entre os teores desse metabólito e a ocorrência de transtornos pós-parto. Na literatura a colina tem sido suplementada em animais sob estresse metabólico mais grave do que o experimentado nos animais dos presentes estudos, apresentando resultados satisfatórios (HARTWELL et al., 2000; XU et al., 2006; ZAHRA et al., 2006). Já em ambos os estudos apresentados, a suplementação com colina não modificou o perfil metabólico de vacas sob estresse metabólico moderado.

A prevalência de endometrite apresenta relação direta com a adaptação energética de vacas leiteiras. De acordo com Hammon et al. (2006), o BEN é um dos principais fatores envolvidos na ocorrência dessa infecção, dessa forma, quanto mais severo o BEN maiores são as chances de desenvolvimento de endometrite. O estresse metabólico desencadeado pelo período de transição atua diretamente no sistema imune, principalmente em decorrência do aumento da atividade oxidativa do organismo, reduzindo significativamente sua capacidade de resposta frente a processos infecciosos (SPEARS e WEISS, 2008).

A colina tem sido relacionada à melhora da resposta imune em inúmeras espécies, principalmente devido seu efeito sobre o estresse oxidativo. Pinotti et al. (2003) descrevem que a suplementação com colina durante o período de transição aumentou os teores de vitamina E

no plasma, um dos principais antioxidantes lipídicos do organismo. CAPÍTULO I, apesar dos efeitos positivos da colina sobre a redução no número de casos de endometrite não foi verificado efeito da suplementação sobre total de oxidantes dos animais.

6. CONCLUSÕES

A suplementação de colina protegida em animais sob balanço energético negativo moderado não alterou o perfil metabólico em vacas leiteiras. O uso prolongado de colina protegida na dieta de vacas durante o período de transição possibilitou a redução nos índices de endometrite aos 60 dias pós-parto. Já a suplementação de colina por 20 dias no pre-parto reduziu o intervalo entre parto e concepção.

Levando-se em consideração os diferentes protocolos de suplementação, conclui-se que a suplementação durante o pré e pós-parto gerou resultados mais satisfatórios. A partir desse estudo sugere-se que a suplementação prolongada de colina apresente maiores vantagens ao produtor.

7. REFERÊNCIAS

- ANDERSSON, L. Subclinical ketosis in dairy cows. **The Veterinary Clinics North America. Food Animal Practice.** v. 4, p. 233-251, 1988.
- 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.
- BERGMAN, E.N. Hyperketonemia-ketogenesis and ketone body metabolism. **Journal Dairy Science.** v. 54, p. 936-948, 1971.
- BERNABUCCI, U. et al. Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. . **Journal Dairy Science.** v.88, n. 6, p. 2017–2026, 2005.
- BIGRAS-POULIN, M. et al. Health problems in selected Ontario Holstein cows: frequency of occurrences, time to first diagnosis and associations. **Preventive Veterinary Medicine.** v. 10, p. 79-89, 1990.
- 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.** v. 87, p. 3105-3124, 2004.
- BONDURANT, R.H. Inflammation in the bovine female reproductive tract. **Journal of Animal Science.** v. 77, p. 101-110, 1999.
- BRUSEMEISTER, F.; SUDEKUM, K. Rumen-protected choline for dairy cows. The *in situ* evaluation of a commercial source and literature evaluation of effects on performance and interactions between methionine and choline metabolism. **Animal Research.** v. 55, p. 93-104, 2006.
- BUTLER, W.R.; EVERETT, R.W.; COPPOCK, C.E. The relationships between energy balance, milk production and ovulation in postpartum Holstein cows. **Journal of Animal Science.** v. 53, n. 3, p.742-748, 1981.
- CERONE, S.I.; SANSINANE, A.S.; GARCÍA, M.C. Effects of beta-hydroxybutyric acid on bovine milk leukocytes function in vitro. **General Physiology and Biophysics.** v. 26, n. 1, p. 14-19, 2007.
- CHAPINAL, N. et al. Herd-level association of serum metabolites in the transition period with disease, milk production, and early lactation reproductive performance. **Journal of Dairy Science.** v. 95, n. 10, p. 5676-5682, 2012.
- CONTRERAS, G.A; SORDILLO; L.M. Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.** v. 34, n. 3, p. 281-289, 2011.
- COOKE, R.F. et al. Supplemental choline for prevention and alleviation of fatty liver in dairy cattle. **Journal of Dairy Science.** v. 90, n. 5, p. 2413-2418, 2007.

- DAVIDSON, S. et al. Supplementing limited methionine diets with rumen-protected methionine, betaine and choline in early lactation Holstein cows. **Journal of Dairy Science**. v. 91, p. 1553-1559, 2008.
- DE HEREDIA, F.P.; GOMEZ-MARTINEZ, S.; MARCOS, A. Obesity, inflammation and the immune system. **Proceedings of the Nutrition Society**. v. 71, n. 2, p. 332- 338, 2012.
- DETILLEUX, J.C.; GRÖHN, Y.T.; QUAAS, R.L. Effects of clinical ketosis in finnish ayrshire cattle on test day milk yields. **Journal of Dairy Science**. v. 77, p.3316-3323, 1994.
- DRACKLEY, J. K. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? **Journal of Dairy Science**. v. 82, p. 2259-2273, 1999.
- 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, suplemento, p. E100-E112, 2001.
- DUFFIELD, T.F.; LISSEMORE, K.D.; MCBRIDE, B.W.; LESLIE, K.E. Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. **Journal of Dairy Science**. v. 92, n. 2, p. 571-580, 2009.
- DUHLMEIER, R. et al. Mechanisms of insulin-dependent glucose transport into porcine and bovine skeletal muscle. **American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v. 289, n. 1, R187-R197, 2005.
- EMERY, R.S.; LIESMAN, J.S.; HERDT, T.H. Metabolism of long chain fatty acids by ruminant liver. **Proceedings...** Conference: Hepatic Metabolism of Organic Acids in Ruminants. p. 832-837, 1992.
- ERDMAN, R.A.; SHARMA, B.K. Effect of dietary rumen-protected choline in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 74, p. 1641-1647, 1991.
- GERLOFF, B.J. et al. Relationship of hepatic lipidosis to health and performance in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 188:845-850, 1986.
- GRINBERG, N. et al. Beta-hydroxybutyrate abrogates formation of bovine neutrophil extracellular traps and bactericidal activity against mammary pathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** v. 76, n. 6, p. 2802-2807, 2008.
- GRUFFAT, D. et al. Regulation of VLDL synthesis and secretion in the liver. **Reproduction Nutrition Development**. v. 36, p. 375-389, 1996.
- HAMMON, D.S. et al. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 113, n 1-2, p. 21-29, 2006.
- HARTWELL, J.R.; CECAVA, M.J.; DONKIN, S.S. Impact of dietary rumen undegradable protein and rumen-protected choline on intake, peripartum liver triacylglyceride, plasma metabolites and milk production in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 83, p. 2907-2917, 2000.

- HAYIRLI, A. et al. Animal and dietary factors affecting feed intake during the prefresh transition period in Holsteins. **Journal of Dairy Science**. v. 85, p. 3430-3443, 2002.
- HOEDEMAKER, M. et al. Peripartal propylene glycol supplementation and metabolism, animal health, fertility, and production in dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 87, n. 7, p. 2136-2145, 2004.
- HUZZEY, J.M. et al. Changes in feeding, drinking, and standing behavior of dairy cows during the transition period. **Journal of Dairy Science**. v. 88, p. 2454-2461, 2005.
- JORRITSMA, R. et al. Metabolic changes in early lactation and impaired reproductive performance in dairy cows. **Veterinary Research**. v. 34, p. 11-26, 2003.
- KIM, I.H.; SUH, G.H. Effect of the amount of body condition loss from the dry to near calving periods on the subsequent body condition change, occurrence of postpartum diseases, metabolic parameters and reproductive performance in Holstein dairy cows. **Theriogenology**. v. 60, n. 8, p. 1445-1456, 2003.
- KINSELLA, J.E. Preferential labelling of phosphatidylcholine during phospholipid synthesis by bovine mammary tissue. **Lipids**. v. 8, p. 393-400, 1973.
- KLEPPE; B.B. et al. Triglyceride accumulation and very low density lipoprotein secretion by rat and goat hepatocytes in vitro. **Journal of Dairy Science**. v. 71, p. 1813-1822, 1988.
- KOMATSU, T. et al. Changes in gene expression of glucose transporters in lactating and nonlactating cows. **Journal of Animal Science**. v. 83, n. 3, p. 557-564, 2005.
- KREMER, W.D.J. et al. Severity of experimental *Escherichia coli* mastitis in ketonemic and nonketonemic dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 76, n. 11, p. 3428-3436, 1993.
- KUHLA, B. et al. Involvement of skeletal muscle protein, glycogen, and fat metabolism in the adaptation on early lactation of dairy cows. **Journal of Proteome Research**. v. 10, n. 9, p. 4252-4262, 2011.
- KUKSIS, A.; MOOKERJEA, S. Choline. **Nutrition Reviews**. v. 36, p. 201-207, 1978.
- LEAN, I.J. et al. Energy and protein nutrition management of transition dairy cows. **The Veterinary Clinics North America. Food Animal Practice**. v. 29, p. 337-366, 2013.
- LACETERA, N. et al. Effects of nonesterified fatty acids on lymphocyte function in dairy heifers. **Journal of Dairy Science**. v. 87, n. 4, p. 1012-1014, 2004.
- LEBLANC, S.J. et al. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 85, n. 9, p. 2223-2236, 2002.
- LEBLANC, S.J.; LESLIE, K.E.; DUFFIELD, T.F. Metabolic predictors of displaced abomasum in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**. v. 88, p. 159-170, 2005.

LEBLANC, S. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. **The Journal of Reproduction and Development**. v. 56, p. S29-S35, 2010.

LIMA, F.S. et al. Effects of feeding rumen-protected choline (RPC) on lactation and metabolism. **Journal of Dairy Science**. v. 90, n. 1, p. 174, 2007.

LIMA, F.S. et al. Effects of feeding rumen-protected choline on incidence of diseases and reproduction of dairy cows. **The Veterinary Journal**. v. 193, p. 140-145, 2012.

LUCY, M.C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? **Journal of Dairy Science**. v. 84, p. 1277-1293, 2001.

MCART, J.A.A.; NYDAM, D.V.; OETZEL, G.R. Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle. **Journal of Dairy Science**. v. 95, n. 9, p. 5056-5066, 2012.

MINOR, D.J. et al. Effects of nonfiber carbohydrate and niacin on periparturient metabolic status and lactation of dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 81, n. 1, p. 189-200, 1998.

NOGALSKI, Z. et al. Changes in the blood indicators and body condition of high yielding Holstein cows with retained placenta and ketosis. **Acta Veterinaria BRNO**. v. 81, p. 359-364, 2012.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). Nutrient requirements of dairy cattle. **National Academy of Sciences**, Washington, DC. Ed. 7, 2001.

OETZEL, G.R. Monitoring and testing dairy herds for metabolic diseases. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 20, n. 3, p. 651-674, 2004.

OSPINA, P.A. et al. (a) Evaluation of nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: critical thresholds for prediction of clinical diseases. **Journal of Dairy Science**. v. 93, n. 2, p. 546-554, 2010.

OSPINA, P.A. et al. (b) Associations of elevated nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the northeastern United States. **Journal of Dairy Science**. v. 93, n. 4, p. 1596-1603, 2010.

OSPINA, A.P.; MCART, J.A.; OVERTON, T.R.; STOKOL, T.; NYDAM, D.V. Using nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate concentrations during the transition period for herd-level monitoring of increased risk of disease and decreased reproductive and milking performance. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. v. 29, n. 2, p. 387-412, 2013.

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, n. 6, p. 2113-2121, 2003.

PIEPENBRINK, M.S.; OVERTON, T.R. Liver metabolism and production of cows fed increasing amounts of rumen-protected choline during the periparturient period. **Journal of Dairy Science**. v. 86, p. 1722-1733, 2003.

PINOTTI, L.; BALDI, A.; DELL'ORTO, V. Comparative mammalian choline metabolism with emphasis on the high-yielding dairy cow. **Nutrition Research Reviews**. v. 15, p. 315-331, 2002.

PINOTTI, L.; BALDI, A.; POLITIS, I.; REBUCCII, R.; SANGALLI, L.; DELL'ORTO, V. Rumen-protected choline administration to transition cows: effects on milk production and vitamin E status. **Journal of Veterinary Medicine**. v. 50, p. 18-21, 2003.

REIST, M. et al. Use of threshold serum and milk ketone concentrations to identify risk for ketosis and endometritis in high-yielding dairy cows. **American Journal of Veterinary Research**. v. 64, n. 2, p. 188-194, 2003.

ROCHE, J.F. The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. **Animal Reproduction Science**. v. 96, p. 282-296, 2006.

SASAKI, S. Mechanism of insulin action on glucose metabolism in ruminants. **Animal Science Journal**. v. 73, n. 6, p. 423-433, 2002.

SEIFI, H.A.; LEBLANC, S.J.; LESLIE, K.E.; DUFFIELD, T.F. Metabolic predictors of postpartum 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.; RAPHAEL, W. Significance of metabolic stress, lipid mobilization, and inflammation on transition cow disorders. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. v. 29, n. 2, p. 267-278, 2013.

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

SURIYASATHAPORN W. et al. Hyperketonemia and the impairment of udder defense: a review. **Veterinary Research**. v. 31, n. 4, p. 397-412, 2000.

SUTHAR, V.S.; CANELAS-RAPOSO, J.; DENIZ, A.; HEUWIESER, W. Prevalence of subclinical ketosis and relationships with postpartum diseases in European dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 96, p. 2925-2938, 2013.

TAMMINGA, S.; LUTEIJN, P.A.; MEIJER, R.G.M. Changes in composition and energy content of liveweight loss in dairy cows with time after parturition. **Livestock Production Science**. v. 52, n. 1, p. 31-38, 1997.

TYOPPONEN, J.; KAUPPINEN, K. The stability and automatic determination of ketone bodies in blood samples taken in field conditions. **Acta Veterinaria Scandinavica**. v. 21, n. 1, p. 55-61, 1980.

WATHES, et al. Negative energy balance alters global gene expression and immune responses in the uterus of postpartum dairy cows. **Physiology Genomics**. v. 39, p. 1-13, 2009.

WESTWOOD, C.T.; LEAN, I.J.; GARVIN, J.K. Factors influencing fertility of holstein dairy cows: a multivariate description. **Journal of Dairy Science**. v. 85, n. 12, p. 3225-3237, 2002.

XU, G.; YE, J.; LIU, J.; YU, Y. Effect of rumen-protected choline addition on milk performance and blood metabolic parameters in transition dairy cows. **Asian- Australasian Journal of Animal Sciences**. v. 19, n. 3, 390-395, 2006.

ZAHRA, L.C. et al. Effects of rumen-protected choline and monensin on milk production and metabolism of periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 89, p. 4808-4818, 2006.

ZEISEL, S.H. Choline phospholipids: signal transduction and carcinogenesis. **Faseb Journal**. v. 7, p. 551-557, 1993.

ZEISEL, S.H.; HOLMES-McNARY, M. Choline. In: **Handbook of Vitamins**. 3^a ed., Marcel Dekker Inc, New York, NY.p.513-528, 2001.

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

ZOM, R.L.G.; VAN BAAL, J.; GOSELINK, R.M.A. Effect of rumen-protected choline on performance, blood metabolites, and hepatic triacylglycerols of periparturient dairy cattle. **Journal of Dairy Science**. v. 94, p. 4016-4027, 2011.