ALESSANDRA SILVA LIMA

**Metabolismo oxidativo, perfil bioquímico e função de
polimorfonucleares de vacas holandesas primíparas e multíparas
no periparto suplementadas com vitaminas ADE**

SÃO PAULO

2013

ALESSANDRA SILVA LIMA

**Metabolismo oxidativo, perfil bioquímico e função de
polimorfonucleares de vacas holandesas primíparas e múltíparas
no periparto suplementadas com vitaminas ADE**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Clínica Veterinária da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências**

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientadora:

Prof^ª. Dr^ª. Maria Claudia Araripe Sucupira

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2778
FMVZ

Lima, Alessandra Silva

Metabolismo oxidativo, perfil bioquímico e função de polimorfonucleares de vacas holandesas primíparas e múltiparas no periparto suplementadas com vitaminas ADE / Alessandra Silva Lima. -- 2013.

118 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Maria Claudia Araripe Sucupira.

1. Bovinos leiteiros. 2. Função imune. 3. Metabolismo oxidativo. 3. Perfil bioquímico.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação do perfil metabólico, estresse oxidativo e resposta imunitária de vacas leiteiras no período periparto suplementadas com vitaminas antioxidantes", utilizando 30 (trinta) vacas, protocolado sob o nº1703/2009, sob a responsabilidade da Profa Dra Maria Cláudia Araripe Sucupira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 01/07/09.

We certify that the Research "Evaluation of metabolic profile, oxidative stress and immune response in Holstein cows supplemented with antioxidant vitamin during transition period", utilizing 30 (thirty) cows, protocol number 1703/2009, under the responsibility Profa Dra Maria Cláudia Araripe Sucupira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 07/01/09.

São Paulo, 13 de julho de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP - Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: LIMA, Alessandra Silva

Título: Metabolismo oxidativo, perfil bioquímico e função de polimorfonucleares de vacas holandesas primíparas e múltiparas no periparto suplementadas com vitaminas ADE.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu.

Há tempo de nascer, e tempo de morrer; tempo de plantar, e tempo de arrancar o que se plantou;

Tempo de matar, e tempo de curar; tempo de derrubar, e tempo de edificar;

Tempo de chorar, e tempo de rir; tempo de prantear, e tempo de dançar;

Tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras; tempo de abraçar, e tempo de afastar-se de abraçar;

Tempo de buscar, e tempo de perder; tempo de guardar, e tempo de lançar fora;

Tempo de rasgar, e tempo de remendar; tempo de ficar calado, e tempo de falar;

Tempo de amar, e tempo de odiar; tempo de guerra, e tempo de paz.

Eclesiastes 3:1-8

*Ao meu marido Roger, meu pai Olavo e minha mãe Maria,
pelo amor, afeto, compreensão, incentivo e
principalmente por tudo o que são e representam na minha
vida, à vocês DEDICO este trabalho.*

A Profa. Dra Maria Cláudia Araripe Sucupira, meus agradecimentos sinceros não só pela orientação, mas também pela amizade, apoio, cumplicidade, incentivo e confiança durante todo nosso convívio. Nestes mais de 13 anos juntas, aprendi a te admirar ainda mais por sua luta e força nos momentos difíceis. Você é um exemplo de professora, orientadora, mãe e amiga. Muito obrigada por tudo, é um orgulho ser sua orientada.

Agradeço em especial à minha irmã e amiga Aline, por toda ajuda e amizade dedicada. Fica aqui minhas palavras de admiração e respeito à você como irmã, mãe, amiga e profissional.

Agradeço a meu cunhado Luís Augusto e as minhas queridas sobrinhas Carina e Vitória pelo apoio, incentivo e amor. Muito obrigada pelo exemplo de família, de amizade, respeito, alegria e companheirismo que vocês representam para a minha vida!

A Deus, que sempre ao meu lado, ilumina meu caminho e coloca pessoas tão especiais na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos **amigos da “Família Científica Sucupira”** que participaram diretamente em todas as fases do meu trabalho: Aline Morgado, Giovanna Rocha, João Paulo, Priscila Marques, Rebeca Weigel e Vanessa Storillo. Obrigada pela ajuda tanto no laboratório quanto na fazenda, este trabalho é fruto da colaboração de cada um de vocês!

A **Prof^a Dr^a Alice Maria Melville Paiva Della Libera** e sua equipe principalmente **Fernando Nogueira de Souza, Maiara Garcia Blagitz** e o **Milton Ricardo Azedo**, meu mais profundos e sinceros agradecimentos pela ajuda na etapa imunológica.

Ao **Prof^o Dr^o Paulo Mazza** agradeço imensamente sua ajuda nas análises estatísticas.

Ao **Prof. Dr. Stéfano Filippo Hagen**, pelos ensinamentos e sábias colocações. Você é parte fundamental da família Sucupira.

Aos **professores do departamento de Clínica Médica**, Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani, Prof. Dr. Fernando José Benesi, Profa. Dra. Lilian Gregory, Prof. Dra. Carla Belli, Prof. Dr. Wilson Roberto Fernandes, Profa. Dra. Mitika Kuribayashi Hagiwara, Profa. Dra. Raquel Yvone A. Baccarin, Prof. Dr. Fabio C. Pogliani, Profa. Dra. Viviane Gomes pelo convívio e compartilhamento de informações e experiências.

À grande e querida amiga **Clara Satsuki Mori**, pela ajuda nas análises, pelos ensinamentos, auxílio em toda a parte laboratorial deste experimento, companheirismo, paciência e amizade.

A Prof. Dra. **Silvana Lima Górnaiak**, do Departamento de Patologia e Toxicologia (VPT) da FMVZ/USP, responsável pelo início dos meus trabalhos na área de pesquisa, agradeço a confiança e a oportunidade.

Aos **funcionários da biblioteca**, pelo profissionalismo, cordial atendimento e amizade.

À **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia** da Universidade de São Paulo, pela minha formação acadêmica, meu mestrado e pelo presente trabalho de doutorado.

Aos meus novos amigos **Francisco, Marcelo e Orlando** sempre ao meu lado na fase final deste trabalho, agradeço a amizade e a ajuda nos momentos importantes e os conselhos nas horas de insegurança.

As minhas amigas **Larissa, Renata, Valeska e Viviane**, que mesmo a distância, estão ao meu lado sempre.

Aos **proprietários do Laticínio MammaMia** da Fazenda Querência do Guaçu, em Pilar do Sul, na pessoa do médico veterinário Rafael Mazzer pela abertura da fazenda, disponibilidade dos animais e pelo entendimento da importância da pesquisa científica.

A **todos**, agradeço e compartilho a realização e o mérito desta obra.

RESUMO

LIMA, A. S. **Metabolismo oxidativo, perfil bioquímico e função de polimorfonucleares de vacas holandesas primíparas e múltíparas no periparto suplementadas com vitaminas ADE.** [Oxidative metabolism, biochemical profile and function of polymorphonuclear in primiparous and multiparous during the peripartum of Holstein cows supplemented with vitamins ADE]. 2013. 118 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O período de transição nas vacas leiteiras é caracterizado por alterações fisiológicas como redução de consumo, balanço energético negativo, lipólise e perda de peso, hipocalcemia, queda na função imune e contaminação bacteriana do útero. O estudo avaliou o efeito de duas aplicações de vitamina ADE intramuscular sobre o perfil bioquímico, metabolismo oxidativo e a função de leucócitos polimorfonucleares de vacas holandesas múltíparas e primíparas, com dieta a base de silagem de milho e concentrado, no período de transição. Foram utilizados 32 vacas holandesas, randomizadas em dois grupos, sendo que o grupo tratado recebeu vitaminas ADE (270.000 UI vitamina A, 80.000 UI vitamina D e 80 mg vitamina E/mL) na dose de 1mL/50 kg pela via intramuscular profunda, aos 20 e 10 dias antes do parto. Aos -20d; -10d; 0d; 7d; 14d; 28 dias do parto foram colhidas amostras de sangue para análise. As alterações fisiológicas do parto foram evidenciadas pelas variáveis: habilidade de redução férrica plasmática, glicose, ácidos graxos não esterificados, colesterol, aspartato aminotransferase, gamaglutamil transferase e creatinoquinase. O período de transição interferiu tanto na produção de espécies reativas a oxigênio (EROs) quanto na porcentagem de leucócitos polimorfonucleares (PMN) fagocitando sob estímulo de *Staphylococcus aureus* conjugada com iodeto de propídio (SAPI). Vacas primíparas apresentaram menor desafio metabólico que as vacas múltíparas, demonstrado pelos maiores valores da atividade de superóxido dismutase e concentrações plasmáticas de glicose, e menores valores de betahidroxibutirato e gamaglutamil transferase nas primíparas. Além disso, as vacas primíparas apresentaram maior porcentagem de PMN fagocitando e maior produção de EROs frente ao estímulo da SAPI. A suplementação parenteral com vitaminas ADE, na dose utilizada, não foi suficiente para melhorar o status antioxidante das vacas, independente do número de partos, porém a suplementação aumentou a produção

de EROs pelos leucócitos PMN quando estimulados com lipopolissacarídeos de *Escherichia coli* (LPS).

Palavras-Chaves: Bovinos Leiteiros. Função Imune. Metabolismo Oxidativo. Perfil Bioquímico.

ABSTRACT

LIMA, A. S. **Oxidative metabolism, biochemical profile and function of polymorphonuclear in primiparous and multiparous during the peripartum of Holstein cows supplemented with vitamins ADE.** [Metabolismo oxidativo, perfil bioquímico e função de polimorfonucleares de vacas holandesas primíparas e múltíparas no periparto suplementadas com vitaminas ADE]. 2013. 118 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013

The transition period in dairy cattle is characterized by physiological changes such as reduced feed intake, negative energy balance, weight loss and lipolysis, hypocalcemia, reduced immune function and bacterial contamination of the uterus.

This study evaluate the effect of two applications of intramuscular vitamin ADE on the biochemical profile, oxidative metabolism and function of polymorphonuclear leukocytes of primiparous and multiparous Holstein cows with diet based on corn silage and concentrate during the transition period. Thirty-two Holstein cows, randomized into two groups, the treatment group received vitamins ADE (270,000 IU vitamin A, 80,000 IU vitamin D and vitamin E 80 mg/mL) at a dose of 1mL/50 kg by intramuscular injection, at 20 and 10 days before calving. At -20d, -10d, 0d, 7d, 14d, 28 days of postpartum blood samples were collected for analysis. Physiological changes of calving were evidenced in the following variables: ferric reducing ability of plasma, glucose, nonesterified fatty acids, cholesterol, aspartate aminotransferase, gammaglutamil transferase and creatine kinase. Furthermore the transition period interfered in the production of reactive oxygen species (ROS) and the percentage of polymorphonuclear leukocytes (PMN) phagocytosing under stimulus *Staphylococcus aureus* conjugated with propidium iodide (SAPI). Primiparous dairy cows had lower metabolic challenge that multiparous, demonstrated by higher values of the activity of superoxide dismutase and glucose concentrations, and lower values of betahydroxybutyrate and gammaglutamil transferase in primiparous. Moreover, primiparous cows had higher percentages of phagocytosing PMN and increased production of ROS with SAPI stimulus. Parenteral supplementation with vitamins ADE was not sufficient to improve the antioxidant status of cows, regardless of the

number of calving, but supplementation increased the production of ROS by PMN leucocytes when stimulated with lipopolysaccharide of *Escherichia coli* (LPS).

Keywords: Biochemical profile. Dairy Cattle. Immune Function. Oxidative Metabolism.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	19

CAPÍTULO 1 - METABOLISMO OXIDATIVO E PERFIL BIOQUÍMICO DE VACAS HOLANDEAS PRIMÍPARAS E MULTÍPARAS NO PERÍODO DE TRANSIÇÃO SUPLEMENTADAS COM VITAMINAS ADE.

3	INTRODUÇÃO	42
4	MATERIAL E MÉTODOS	43
5	RESULTADOS	47
5.1	Habilidade de redução férrica plasmática	47
5.2	Atividade da superóxido dismutase.....	48
5.3	Concentração da glutathiona reduzida.....	50
5.4	Concentração de malondialdeído.....	50
5.5	Concentração plasmática de glicose.....	51
5.6	Concentração plasmática de β-hidroxibutirato	53
5.7	Concentração de ácidos graxos não esterificados.....	54
5.8	Concentração sérica de colesterol.....	56
5.9	Atividade sérica de aspartato aminotransferase	57
5.10	Atividade sérica de gamaglutamiltransferase	59
5.11	Atividade sérica de creatinafosfoquinase.....	60
6	DISCUSSÃO.....	62
7	CONCLUSÃO.....	78

CAPÍTULO 2 FUNÇÃO DE POLIMORFONUCLEARES DE VACAS HOLANDEAS PRIMÍPARAS E MULTÍPARAS NO PERÍODO DE TRANSIÇÃO SUPLEMENTADAS COM VITAMINAS ADE.

8.	INTRODUÇÃO.....	79
9	MATERIAL E MÉTODOS	81
10	RESULTADOS	86
10.1	Produção de EROs sem estímulo.....	86
10.2	Produção de EROs com estímulo de SAPI.....	87

10.3	Produção de EROs com estímulo de LPS.....	88
10.4	Produção de EROs com estímulo de PMA.....	90
10.5	Frequência de PMN fagocitando SAPI.....	90
10.6	Intensidade de fagocitose por PMNs.....	94
11	DISCUSSÃO	93
12	CONCLUSÃO.....	99
REFERÊNCIAS.....		100

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é tradicionalmente um grande produtor de leite. A atividade que começou com características extrativistas, ocupa posição de destaque no cenário econômico nacional, sendo um dos principais segmentos do agronegócio do país. Entre 2000 e 2010 a produção brasileira avançou em média 4,4% ao ano, apresentando a segunda taxa de crescimento e a quinta de produção mundial de leite. Em 2011 a produção nacional foi de 32 bilhões de litros de leite (IBGE, 2012).

A pecuária leiteira é uma atividade economicamente desafiante, na qual, falhas podem ocasionar prejuízos, resultando na retirada do produtor da atividade. Sua manutenção depende basicamente da eficiência do sistema de produção, que objetiva maior produtividade com menor custo. Problemas de manejo, sanidade e reprodução refletem diretamente no seu retorno econômico.

A maior capacidade de produção da vaca leiteira envolve adequado manejo alimentar, sanitário, reprodutivo, instalações apropriadas e constante melhoramento genético. A exigência causada pela maior demanda produtiva favorece o desequilíbrio entre o ingresso de nutrientes no organismo e a capacidade para metabolizá-los. Com isso, a exploração cada vez mais intensiva impõe severos desafios metabólicos, resultando em altos índices de doenças metabólicas, principalmente durante o período de transição.

O período de transição da vaca leiteira, definido como três semanas antes do parto até 3 semanas após o parto, é uma fase crítica pois está associado com o pico de incidência de enfermidades metabólicas, nutricionais ou infecciosas (MULLIGAN; DOHERTY, 2008). Até 50% de vacas leiteiras no período de transição podem ser acometidas por doenças infecciosas ou metabólicas (LEBLANC, 2010). Porém o impacto deste período e de suas implicações é pouco descrito, principalmente se tratando da diferença entre vacas primíparas e multíparas. Dentre as enfermidades associadas a esta fase estão: retenção de placenta (CAMERON et al., 1998), metrite (HAMMON et al., 2006), endometrite (DUBUC et al., 2010), deslocamento de abomaso (LEBLANC et al., 2005), cetose (GREEN et al., 1999) e hipocalcemia (HORST et al., 1994). Ocorrendo ainda diminuição fisiológica da atividade do sistema imune, denominada imunossupressão.

A imunossupressão, caracterizada pela diminuição e/ou disfunção da resposta imunológica, é primariamente causada pelo aumento na produção e secreção fetal de corticosteróides durante o último mês de gestação, que por sua vez são necessárias para desencadear as alterações hormonais uterinas resultando na expulsão do feto (KNICKERBOCKER et al., 1986; GRIFFIN, 1989). São sinais de imunossupressão a diminuição da resposta celular e humoral, reflexos da diminuição da capacidade de fagocitose e de destruição de antígenos pela queima oxidativa (“oxidative burst”) dos leucócitos polimorfonucleares, diminuição da proliferação (mitogênese) de linfócitos circulantes e diminuição da resposta de anticorpos frente a imunizações (MALLARD et al., 1998).

Além da deficiência de energia, outras deficiências nutricionais, como as de vitaminas têm sido constantemente associadas ao estado de imunossupressão nos bovinos (GOFF, 2006). A ingestão da vitamina A, E e outros nutrientes essenciais ao funcionamento do sistema imunológico está diminuída com a redução do consumo da matéria seca durante o período seco (GOFF; HORST, 1997).

O estresse oxidativo é o resultado do desequilíbrio entre substâncias oxidantes e antioxidantes no organismo, sendo decorrente ou do aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou da diminuição de substâncias antioxidantes, danificando macromoléculas biológicas, induzindo distúrbios metabólicos e desordens fisiológicas (TREVISAN et al., 2001; BERNABUCCI et al., 2002; BOUWSTRA et al., 2010). Vacas no periparto apresentam maior consumo de oxigênio por seus tecidos através da respiração celular devido a maior exigência metabólica, a fim de fornecer energia necessária para o início de lactação. Este aumento na atividade metabólica resulta na maior produção de EROs e da depleção das defesas antioxidantes neste período (SORDILLO, 2013). O estresse oxidativo pode ser monitorado por meio de biomarcadores antioxidantes e pró-oxidantes que podem ser mensurados no soro, no plasma e nos eritrócitos (PASSI et al., 2001).

Antioxidantes previnem danos nos tecidos induzidos pelos EROs, impedindo a formação, favorecendo a remoção, ou promovendo a decomposição (YOUNG; WOODSIDE, 2001). Embora o organismo tenha sistemas enzimáticos próprios que removam os EROs, os principais micronutrientes antioxidantes são as vitaminas.

A dieta de vacas leiteiras com a utilização da silagem é conhecida pelo seu baixo teor em antioxidantes (BALLET et al., 2000) sendo assim, nos períodos de maior demanda metabólica estes animais tem maior chance de sofrerem estresse

oxidativo. A suplementação com concentrado na dieta reduz a ingestão de forragem (BARGO et al., 2002) e aumenta a degradação de alguns antioxidantes no rúmen (WEISS et al., 1995). Merlo et al. (2008), relataram que animais mantidos em sistemas intensivos de produção necessitam mais de antioxidantes do que animais criados extensivamente.

Aktas et al. (2011) demonstraram a eficácia do complexo vitamínico ADE em vacas holandesas na redução da peroxidação lipídica e do estresse oxidativo associado ao estresse de transporte, porém o uso desta associação injetável no período de transição de vacas a fim de minimizar efeitos deletérios deste período ainda não foi descrito. A literatura é rica em relação à utilização de vitamina E em vacas leiteiras, porém o uso da associação de vitaminas ADE é pouco explorado apesar da grande disponibilidade de produtos comerciais. Cuidados devem ser tomados quando da administração de vitaminas nas situações de estresse oxidativo instalado, pois podem atuar como substâncias pró-oxidantes (WEIGEL et al.; 2010) agravando o quadro.

Considerando que a maior parte dos estudos que analisam o período de transição de vacas tem como base o perfil bioquímico, faltam estudos deste período relacionando as variáveis bioquímicas, o metabolismo oxidativo e a resposta imune de vacas multíparas e primíparas, bem como os efeitos da administração de vitamina ADE injetável no referido contexto.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O período de transição, também denominado período periparto, compreende as três semanas anteriores e as três semanas posteriores ao parto (GRUMMER, 1993). Este é particularmente importante para a saúde e desempenho de vacas leiteiras, que são expostas às drásticas mudanças fisiológicas e submetidas ao estresse metabólico durante esta fase (GOFF; HORST, 1997; DRACKLEY, 1999). Na fase final de gestação ocorrem alterações fisiológicas, endocrinológicas, anatômicas e comportamentais que preparam o animal para o parto e para a lactogênese, passando assim do período seco para o produtivo.

A gestação e a lactação são consideradas estágios fisiológicos capazes de induzir estresse metabólico (DRACKLEY, 1999; PICCIONE et al., 2009). Desequilíbrios metabólicos são definidos por Payne et al. (1984) como doenças de produção e podem surgir quando ocorre desequilíbrio entre os egressos e ingressos dos nutrientes. Segundo LeBlanc (2010), os eventos metabólicos em vacas que têm início duas semanas antes do parto, impactam sobre a saúde reprodutiva até nove semanas após o parto, podendo afetar o desempenho reprodutivo do animal por meses.

Durante o período periparto ocorre grande aumento no crescimento fetal, com elevação da pressão interna nos órgãos digestivos e diminuição do espaço ocupado pelos alimentos. Este fato, associado com a grande variação hormonal no período pré-parto, ou seja, aumento nas concentrações sanguíneas de estrógeno e corticoides e queda nas concentrações de progesterona (CHEW et al., 1979), reduz a ingestão de matéria seca de forma espontânea. Independentemente da densidade de energia e do teor de proteína da dieta, a ingestão diminui cerca de 30% durante as três semanas que antecedem o parto e cerca de 90% durante a última semana (DOEPEL et al., 2002; HAYIRLI et al., 2002). Devido a forte queda na ingestão associado ao aumento na demanda de energia devido às necessidades de nutrientes do útero grávido e da glândula mamaria (GOFF; HORST, 1997), a vaca leiteira desenvolve um quadro denominado de balanço energético negativo (BEN) (DOEPEL et al., 2002).

A intensidade do BEN é variável, sendo condição comum a todas as fêmeas de alta produção no pós-parto (RICCÓ, 2004). É sabido que novilhas leiteiras

geralmente parem pela primeira vez ao redor de 24 meses de idade, pois isso maximiza benefícios econômicos. Porém estes animais não estão fisicamente maduro nesta fase. As vacas primíparas que se aproximam da sua primeira parição estão, portanto, em um estado metabólico diferente que as múltiparas, pois além as exigências do bezerro em desenvolvimento, requerem nutrientes para o seu crescimento contínuo (WATHES et al., 2007).

Durante o BEN no início da lactação, a adaptação primária homeorrética do metabolismo lipídico é a mobilização de reservas de gordura corporal para atender as necessidades globais de energia na vaca. A gordura corporal é mobilizada para a corrente sanguínea na forma de ácidos graxos não esterificados (AGNEs), estes são mobilizados principalmente pelo fígado e são oxidados na mitocôndria para produzir energia ou são exportados na forma de lipoproteínas de baixa densidade. Os AGNEs são utilizados em mais de 40% na composição da gordura do leite, durante os primeiros dias de lactação (BELL, 1995). O sistema músculo esquelético utiliza algum AGNE como combustível, diminuindo a dependência de glicose como combustível durante o início da lactação. Em razão ao aumento da concentração plasmática de AGNE em resposta ao aumento da demanda de energia associado ao consumo alimentar inadequado, a ingestão de matéria seca e AGNEs geralmente estão inversamente correlacionado.

Devido ao desfavorecimento da homeostase energética decorrente da gestação, há ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, resultando na liberação de cortisol, facilitando a mobilização de substratos energéticos, consequentemente auxiliando na homeostase energética (VERBEEK, 2012).

As evidências disponíveis sugerem que o fígado metaboliza AGNEs na proporção em que são produzido (PULLEN et al., 1989; REYNOLDS et al., 2003), mas este não tem capacidade suficiente de eliminá-los completamente através da exportação para o sangue ou pelo catabolismo de energia, frente a liberação de grandes quantidades de AGNEs a partir do tecido adiposo para a circulação, resultando no acúmulo na forma de triglicérides no fígado (EMERY et al., 1992).

Os AGNEs, no início da lactação garantem a energia para a produção do leite, pois auxiliam no fornecimento de energia para diferentes tecidos, priorizando a utilização de glicose e aminoácidos para a glândula mamária (CHILLIARD, 1998). Porém, quando a mobilização de AGNE é muito intensa, a produção de corpos

cetônicos no fígado aumenta, desencadeando desta forma o quadro conhecido como cetose (LOOR et al., 2006).

Associado ao BEN e a alta mobilização de reservas lipídicas, principalmente nas primeiras semanas pós-parto devido à lactação, há o favorecimento da ocorrência de doenças metabólicas e consequente prejuízos relacionados à produção e reprodução (INGVARTSEN et al., 2003; CAMPOS, 2007; RODRIGUES et al., 2007). Estudos recentes (LEBLANC, 2010; OSPINA et al., 2010; CHAPINAL et al., 2011, 2012) indicam que teores de AGNEs maiores que 0,3 mmol/L de duas a uma semana antes do parto estão associados a aumento de risco de retenção de placenta, metrite, deslocamento de abomaso, queda na produção (683 kg no período de 305 dias) e aumento no período aberto.

Em situações de déficit de energia, o acetoacetato, produzido normalmente no metabolismo dos ácidos graxos, não pode ser metabolizado, sofrendo redução à β -hidroxibutirato (BHB) ou descarboxilação até acetona (RICCÓ, 2004).

Devido ao fato do BHB originar-se da degradação de lipídeos no déficit energético ou da oxidação do ácido butírico, transformado em BHB e absorvido na parede ruminal (REECE, 2006), normalmente está presente no sangue e pode ser utilizado como fonte de energia, sendo sua concentração o resultado do equilíbrio entre a produção e sua utilização pelos tecidos periféricos (RADOSTITS et al., 2002).

Em estudo realizado por Contreras et al. (2000), os valores de BHB encontraram-se dentro dos limites de referência, nos dias que antecederam o parto e elevaram-se imediatamente após o parto. Esse comportamento reflete a provável mobilização de outros elementos que não o carboidrato para atender as necessidades energéticas das ovelhas no parto.

A produção de corpos cetônicos se acentua durante fase final da gestação devido à diminuição do consumo de alimentos (SWENSON; REECE, 1996; HARMEYER; SCHLUMBOHM, 2006). O aumento das concentrações de corpos cetônicos no final de gestação, provém da conversão, por meio da fermentação, dos ácidos graxos de cadeia curta em BHB e acetoacetato, absorvidos pela parede do rúmen. Porém, quando a dieta é insuficiente ou deficiente em energia, principalmente no terço final da gestação, a produção de corpos cetônicos ocorre pela via hepática (HARMEYER; SCHLUMBOHM, 2006).

Concentrações plasmáticas aumentadas de AGNE e BHB estão associadas ao acúmulo de triglicerídeos no fígado, que aumentam a incidência de colestase no início da lactação (MARQUEZ; RADEMARCHER, 1999). Normalmente, o aumento das concentrações de corpos cetônicos e AGNEs coincide com hipoglicemia.

A cetose inaparente ($BHB < 1,2$ a $1,4$ mmol/L) na primeira ou segunda semana pós-parto é associada ao aumento de risco de 3 a 8 vezes a ocorrência de deslocamento de abomaso, três vezes mais metrite, quatro a seis vezes mais cetose clínica, aumento da ocorrência de endometrite, prolongamento do anestro durante o pós-parto, aumento na gravidade das mastites e menor produção de leite no início da lactação. (LEBLANC, 2010). Vacas com teor plasmático de BHB maiores que $1800 \mu\text{mol/L}$ na primeira semana apresentaram diminuição da produção da ordem de 300 kg em toda a lactação (DUFFIELD et al., 2009). Outra importante correlação foi descrita por Roberts et al. (2012), que altos de valores do BHB e AGNE estão associados ao risco de descarte de vacas no início da lactação.

Segundo Wittwer (2000), a capacidade de o animal ajustar-se ao BEN, depende de suas reservas corporais disponíveis, da mesma forma a adaptação a um balanço positivo depende da capacidade metabólica no armazenamento de reservas.

O BEN pode impactar diferentemente entre vacas primíparas e multíparas. Em estudo realizado com 188 vacas primíparas e 312 multíparas, observou que nas primíparas a concentração de BHB permaneceu menor ao longo do período peri-parto e o aumento da AGNE ocorreu mais cedo do que nas multíparas em relação ao momento do parto. Essas diferenças foram associadas com a produção de leite significativamente menor nas vacas primíparas. Estes resultados sugerem que o sistema endócrino difere nos animais mais jovens podendo limitar a partição de nutrientes para o leite (WATHES et al., 2007).

As concentrações circulantes aumentadas de AGNE é um importante fator de risco na incidência de esteatose hepática e podendo também efeitos diretos sobre a função dos neutrófilos (LEBLANC, 2010).

No período periparto há queda na função imune entre os 15 dias pré-parto e a terceira semana pós-parto, favorecendo a instalação de infecção bacteriana uterina e outras doenças. Estes fatores, aliados a mudanças dramáticas nos teores de progesterona, estrógenos e cortisol circulantes, contribuem para redução substancial da função imune, especialmente de neutrófilos. Estas células são a principal forma

de defesa do útero. A menor migração destes, associados à atividade fagocitária e oxidativa, aumenta o risco de retenção de placenta, metrite e endometrite. Decorrente da ação de hormônios de ação lactogênica, os teores de insulina apresentam-se reduzidos, sendo comum a toda vaca vivenciar um período de resistência à insulina no periparto (LEBLANC, 2010).

Embora o ruminante não utilize a glicose como fonte universal para todas as suas células, este substrato é de fundamental importância para manutenção energética das células nervosas, da glândula mamária, da musculatura, dos tecidos fetais e em menor grau dos eritrócitos (LENG; ANNISON, 1962). Em vacas leiteiras, a quantidade massiva de energia necessária para atender a produção de leite provém na maior parte da gliconeogênese.

Portanto em ruminantes pouca glicose proveniente do trato alimentar entra na corrente sanguínea, sendo o fígado o órgão responsável pela sua síntese por meio de moléculas precursoras da via gliconeolítica. Desta forma, o ácido propiônico produz 50% dos requerimentos de glicose, os aminoácidos glicogênicos 25% e o ácido láctico 15%. Outro importante precursor é o glicerol (GONZÁLEZ, 2000).

Aproximadamente 85% de glicose de todo o corpo, é dirigida para a glândula mamária para a síntese e secreção de leite (SORDILLO; AITKEN, 2009). Reynolds et al. (2003) relataram que o fluxo visceral líquido de glicose drenados das vacas foi de zero a ligeiramente negativo durante o período de transição e início da lactação, e houve aumento de 267% na produção total de glicose esplâncnica a partir de nove dias antes do parto até 21 dias após o parto resultou quase que completamente do aumento da gliconeogênese hepática.

Também relacionada à glicose, o cortisol é o principal hormônio glicocorticoide do metabolismo relacionado ao estresse, seus teores, geralmente encontram-se aumentados no parto. Paiva et al. (2006) encontraram aumento de cortisol no momento do parto de vacas holandesas, sendo que 24 horas após o parto, as concentrações de cortisol retornaram aos valores registrados antes do parto. Outros autores também observaram aumento nas concentrações de cortisol em vacas no momento do parto (HUDSON et al., 1975; AURICH et al., 1993).

Essa elevação provavelmente é consequência da lactogênese e início da lactação, quando há elevação da prolactina, estrógeno, somatotropina e cortisol circulantes, que reduzem a responsividade e a sensibilidade à insulina. Este quadro de “resistência” à insulina leva ao aumento da gliconeogênese hepática, redução da

captação de glicose pela musculatura e tecido adiposo, redução da lipogênese e da síntese de proteína e aumento da degradação de proteína muscular com consequente liberação de aminoácidos (BELL; BAUMAN, 1997).

O aumento das concentrações de cortisol pode justificar sua função de transportador de glicose para os tecidos placentários, ou quando próximo ao parto, sinaliza este momento (SWENSON; REECE, 1996). Merlo et al. (2008), observaram concentrações plasmáticas de glicose e EROs aumentadas no pós-parto de vacas leiteiras.

O maior requerimento de energia na gestação pode ser explicado pelo grande número de mitocôndrias existentes na placenta, resultando no aumento da utilização de oxigênio, aumentando desta forma o estresse oxidativo (PATHAN et al., 2010). Detectar precocemente os animais que possam apresentar alterações metabólicas e problemas de saúde é uma etapa importante em se tratando de animais de produção (LEBLANC, 2010).

Em vacas de alta produção, diversos parâmetros bioquímicos indicadores do estado metabólico são pesquisados, principalmente metabólitos associados ao balanço energético, como ácidos graxos não esterificados (AGNE), β -hidroxibutirato (BHB), glicose, colesterol e triglicerídeos (AEBERHARD et al., 2001; KIDA, 2003; LAGO et al., 2004). Avalia-se também a atividade das enzimas aspartato aminotransferase, gamaglutamil transferase, fosfatase alcalina e alanina aminotransferase nos distúrbios metabólicos, funcionamento hepático, alterações ósseas e desbalanço na relação cálcio:fósforo (MUNDIM, 2000).

A avaliação de parâmetros bioquímicos no período de transição é relativamente comum, especialmente para vacas leiteiras. Mais recentemente surgiu a preocupação de se estabelecer variáveis relacionadas ao estresse oxidativo durante este período (BERNABUCCI et al., 2005; CASTILLO et al., 2005; GAAL et al., 2006), pois o aumento da atividade metabólica, principalmente no fígado, úbere e ovários, favorece o estresse oxidativo intenso (MILLER et al., 1994; BERNABUCCI et al., 2005).

O oxigênio é essencial para a oxidação de compostos orgânicos e produção de energia para o metabolismo celular. Uma pequena quantidade do oxigênio consumido (2 a 5%) é reduzida, produzindo uma variedade de substâncias químicas altamente reativas denominadas espécies reativas de oxigênio (EROs). Este termo é utilizado na designação de radicais livres relacionados ao metabolismo do oxigênio

(FERREIRA, 2007), pois alguns agentes reativos não apresentam elétrons desemparelhados, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (CHIHUAILAF et al., 2002). O H_2O_2 é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos à molécula de DNA por meio de reações enzimáticas (ANDERSON, 1996; NUNES, OLIVEIRA, 2006).

O desequilíbrio entre a produção EROs e os sistemas de defesa antioxidante, em favor dos primeiros, é denominado de estresse oxidativo. Nesta situação, a condição celular ou fisiológica de elevada concentração de EROs ou diminuição do status antioxidante é causador de danos moleculares às estruturas celulares, com consequente alteração e prejuízo das funções vitais (DRÖGE, 2002; RIBEIRO; GONZALEZ, 2003; HALLIWELL; GUTTERIDGE; 2007; WEIGEL, 2008).

Porém, a ocorrência e a intensidade do dano oxidativo em qualquer tecido, depende da capacidade antioxidante do tecido, determinada por antioxidantes endógenos ou exógenos, provenientes da dieta, e não só dos mecanismos enzimáticos e não enzimáticos, mas também da cooperação entre os mesmos (FERREIRA, 2007).

De acordo com Miller et al. (1993), em ruminantes, o estresse oxidativo pode estar envolvido em diversas condições patológicas, incluindo as mais relevantes para a reprodução, produção e bem-estar geral. Na tentativa de minimizar os danos e consequentes prejuízos à saúde e produção animal decorrentes da ação das EROs, uma série de estudos foi realizada mostrando intensidades variáveis de estresse oxidativo durante o período periparto em vacas leiteiras (BERNABUCCI et al., 2005; CASTILLO et al., 2005; GAÁL et al., 2006). É importante notar que a atividade de biomarcadores do estresse oxidativo pode ser influenciada por fatores individuais, nutricionais e estação do ano (BERNABUCCI et al., 2002).

Quando geradas no metabolismo basal, as EROs não representam ameaça ao organismo, desde que um sistema protetor (sistema antioxidante) seja capaz de se opor à geração dos mesmos. Quando presentes em grandes concentrações podem induzir alterações severas em moléculas fundamentais para a manutenção da homeostasia celular. Estão relacionadas com a fisiopatologia de doenças de caráter crônico e degenerativo (FERREIRA, 2007). Dentre os danos causados pela produção excessiva de EROs tem-se a peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, agressão a carboidratos e ao ácido desoxirribonucleico (NETO, 2011). Em qualquer situação que envolva aumento do metabolismo celular e sobrecarga orgânica, ocorre

como consequência a lesão oxidativa. Além da potencial ação sobre a função e integridade celular, as EROs e substâncias relacionadas estão envolvidas com a regulação de mecanismos fisiológicos, como a sinalização celular, expressão de alguns genes, mediação de reações inflamatórias e potencialização de mecanismos de defesa orgânica (FERREIRA, 2007).

As EROs têm importância fisiológica diretamente relacionada à proteção antimicrobiana intermediada pelos leucócitos polimorfonucleares (PMNs), estes normalmente encontrados no sangue, circulam em estado inativo, desta forma podem cercar e até fagocitar bactérias, mas são incapazes de lesá-las (WINTERBOURN; ASSMAN, 1990). Durante a resposta de fase aguda, os neutrófilos são atraídos para a área lesada libertando enzimas lisossomais e as EROs (FERREIRA, 2007). A partir do momento em que os PMNs são expostos a bactérias envoltas por imunoglobulinas, imunocomplexos, complemento 5 ou leucotrienos, ocorre ativação da enzima NADPH-oxidase (MURRAY, 1993; WEIGEL, 2008). Esta ativação inicia a produção de EROs que prossegue com o processo microbicida desenvolvido pelos PMNs. A produção de O_2^- nos neutrófilos por ação NADPH-oxidase, na presença de adenosina difosfato e Fe^{+3} catalisa a forma reduzida de $NADPH + H^+$ para O_2 , originando o radical superóxido (FERREIRA, 2007).

A fagocitose realizada pelos PMNs, que representa a proteção provida pelos mecanismos imunológicos inatos, é a primeira barreira especificamente desenvolvida contra a penetração de patógenos no organismo, portanto desempenha papel crucial na defesa contra doenças infecciosas.

As células envolvidas no sistema imunológico inato são compostas por células da linhagem monócito/macrófago, granulócitos e células matadoras naturais (NK) (ABBAS et al., 1997). Uma característica comum a estas populações celulares é sua habilidade em reconhecer e destruir antígenos estranhos ou células infectadas, sem a necessidade de ter havido prévio encontro com tais antígenos. Para tanto, tais células utilizam-se da fagocitose e de atividades dependentes de oxigênio, relacionadas à explosão respiratória (do inglês: *respiratory burst*), e não-dependentes de oxigênio, funções fundamentais na destruição e eliminação do agente invasor (ALBERTS et al., 2002). Além disso, os fagócitos interagem com as demais células que compõem o sistema imunológico, mormente os linfócitos, agindo como células apresentadoras de antígenos e, deste modo, participando como

deflagraadoras e efetoras na resposta imunológica gerada (ABBAS et al., 1997).

Alterações nas funções inerentes a tais populações celulares, induzidas ou não pela interação de fatores exógenos, tais como drogas, injúrias físicas ou infecções intracelulares, característica das infecções virais, nas diversas populações de leucócitos relacionadas à resposta imunológica, podem levar o animal a um estado depletivo na proteção fornecida pelo aparato imunológico, caracterizando um quadro de imunossupressão.

No período de transição a imunossupressão, caracterizada pela diminuição e/ou disfunção da resposta imunológica, é primariamente causada pelo aumento na produção e secreção fetal de corticosteróides durante o último mês de gestação, que por sua vez são necessárias para desencadear as alterações hormonais uterinas resultando na expulsão do feto (KNICKERBOCKER et al., 1986; GRIFFIN, 1989). São sinais de imunossupressão a diminuição da resposta celular e humoral, reflexos da diminuição da capacidade de fagocitose e de destruição de antígenos pela queima oxidativa dos leucócitos neutrófilos polimorfonucleares, diminuição da proliferação (mitogênese) de linfócitos circulantes e diminuição da resposta de anticorpos frente a imunizações (MALLARD et al., 1998).

Em bovinos, como em outras espécies de vertebrados, neutrófilos e macrófagos são os principais tipos celulares fagocíticos (GODDEERIS, 1998). Os ruminantes têm menor porcentagem de neutrófilos no sangue periférico, quando comparados aos carnívoros, constituindo cerca de 20% a 30% dos leucócitos sanguíneos (TIZARD, 2002). Além disso, neutrófilos de ruminantes possuem um exclusivo terceiro tipo de grânulo em seu citoplasma, cujo conteúdo é rico em peptídeos catiônicos antibacterianos, tais como bactericinas, indolicidinas e β -defensinas. Entretanto, os neutrófilos de ruminantes não contêm lisosimas, o principal componente dos grânulos de neutrófilos humanos (GODDEERIS, 1998). Por outro lado, ruminantes possuem maior porcentagem de macrófagos pulmonares intravasculares, quando comparados, por exemplo, a equinos, humanos e cães, principais responsáveis pela eliminação de bactérias da circulação e de material particulado (WINKLER, 1988).

A mensuração da capacidade dos fagócitos em gerar a explosão respiratória *in vitro* pode objetivar a avaliação da habilidade do hospedeiro em deflagrar uma resposta imunológica efetiva durante infecção natural ou experimental, da habilidade do patógeno em evadir esta resposta, das variações entre indivíduos, da resposta

leucocitária frente diferentes estímulos ou detectar deficiências funcionais. Tal avaliação pode ser feita pela quantificação da atividade fagocítica, tanto à porcentagem de células realizando fagocitose, quanto à quantidade de bactérias internalizadas, como realizada por Szejda et al. (1984).

A função dos leucócitos, em bovinos, pode estar deprimida em bezerros e em vacas, durante o período periparto (HAMMON et al., 2006). Do mesmo modo, sabe-se que a presença de certos agentes infecciosos, terapia com glicocorticoides, estresse, nutrição inadequada e defeitos genéticos podem debilitar a função fagocítica destas células (GODDEERIS, 1998).

Há estudos associando a disfunção do metabolismo de energia durante o pós-parto com o estado de imunossupressão. Alguns investigadores observaram que o balanço energético negativo e a ocorrência do fígado gordo agravam a imunossupressão do parto, propiciando as vacas de leite a apresentarem metrites (WENSING et al., 1997; BOBE et al., 2004; HAMMON et al. 2006). Outros pesquisadores observaram que a ocorrência de mastites clínicas acontece mais frequentemente em vacas que possuem maior concentração de AGNE no plasma durante as três primeiras semanas pós-parto (HOLTENIUS et al., 2004). Hammon et al. (2006) relataram que $AGNE \geq 0,4$ mmol/L antes do parto (uma a duas semanas) foi associada com a redução da função de neutrófilos do sangue periférico e maior risco de metrite ou endometrite.

No organismo, para contrapor a formação de EROs existe o sistema antioxidante. Antioxidante, pode ser definido de uma forma mais ampla, como “qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz” (SIES; STAHL, 1995; BIANCHI; ANTUNES, 1999; FERREIRA, 2007).

Do ponto de vista biológico, podemos definir antioxidantes como aqueles compostos que protegem os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios dos processos ou das reações que levam à oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares. O que implica nos diferentes níveis de atuação dos antioxidantes, bem como em seu modo de ação. Os antioxidantes podem, teoricamente, prolongar a fase de iniciação ou então inibir a fase de propagação, mas não podem prevenir completamente a oxidação.

Os mecanismos de ação dos antioxidantes são:

- **PREVENÇÃO:** mecanismo que em condições favoráveis evita a formação de EROs (FERREIRA, 2007), principalmente pela inibição das reações em cadeia com ferro e o cobre (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Proteínas se ligam aos íons metálicos de transição, evitando sua presença na forma livre, ou através de enzimas responsáveis pelo equilíbrio redox da célula, por redução de antioxidantes de intercepção previamente oxidados como a glutatona; ou antioxidantes de prevenção, como zinco e o selênio provenientes da dieta.

- **INTERCEPÇÃO:** mecanismo no qual antioxidantes reagem diretamente com as EROs e as transformam em substâncias menos reativas, desta forma impedindo sua ação e consequentes danos celulares. São capazes de interceptar EROs gerados no metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo sua ação. Antioxidantes obtidos da dieta, como as vitaminas “C”, “E” e “A”, flavonoides e carotenoides tem grande importância na intercepção das EROs (NUNES; OLIVEIRA, 2006).

- **REPARAÇÃO:** Esse processo relaciona-se com a remoção de danos à molécula de DNA e reconstituição das membranas celulares danificadas e da homeostasia (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Os antioxidantes podem ser classificados, didaticamente, em duas categorias, o sistema primário, que são os inibidores preventivos, que retardam a fase de iniciação, impedindo a geração de espécies reativas ou sequestram estas espécies, impedindo sua interação com os alvos celulares, e o secundário. O sistema secundário consiste nos bloqueadores da etapa de propagação da cadeia radicalar (chain breaking), que, efetivamente, removem radicais intermediários, como o radical peroxila ou alcóxila (JORDÃO JR et al.; 1998).

Há antioxidantes enzimáticos ou não-enzimáticos (SIES, 1993). O grupo que compreende antioxidantes enzimáticos incluem superóxido dismutase (SOD) e glutatona-peroxidase (GSH), representando as principais formas de defesa antioxidante intracelular.

Também podem ser classificados conforme o mecanismo de ação predominante (prevenção, intercepção e reparação) ou por sua proveniência, da síntese endógena (endógenos) ou da dieta (exógenos) (FERREIRA, 2007). Estes últimos incluem os carotenoides e vitaminas A, C e E, que são capazes de fornecer átomos de hidrogênio as EROs (FERREIRA, 2007).

Estudos têm mostrado que estes antioxidantes, agindo individualmente ou em conjunto, podem regular os mecanismos de defesa dos animais (CHEW, 1996). Dutta-Roy et al. (1994), identificaram uma proteína na membrana que se liga ao α -tocoferol para incorporá-lo na bicamada lipídica da membrana eritrocitária. Esta vitamina interrompe a propagação da reação de lipoperoxidação, e transforma peróxidos lipídicos em formas menos reativas (HALLIWELL, 1994).

A determinação das atividades dos antioxidantes enzimáticos, tais como superóxido dismutase (SOD) e da glutathiona reduzida (GSH), representam uma das maneiras de avaliar o estresse oxidativo (KLECZKOWSKI et al., 2003).

A SOD é considerada a primeira defesa contra a pró-oxidantes que convertem a superóxido (O_2^-) para o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A SOD faz parte dos mecanismos de proteção contra o estresse oxidativo nos eritrócitos. O aumento na produção de EROs compromete a integridade da membrana dos eritrócitos, levando a alterações em sistemas antioxidantes, refletindo em maiores atividades de SOD (AMMERMAN, 1970). A SOD encontra-se ligada ao cobre e ao zinco (CuZnSOD), átomos que constituem a porção ativa da enzima, pois recebem a ligação do metal (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2001). Em dietas deficientes em zinco e cobre sua atividade enzimática pode tornar-se diminuída (HARVEY et al., 1997). A redução na disponibilidade de zinco e de cobre no período pós-parto (MUEHLENBEIN et al., 2001) de vacas leiteiras poderia explicar a redução da atividade da SOD (MICHIELS et al., 1994), visto que esta é uma enzima Cu/Zn-dependente.

A GSH desempenha importante papel na proteção de células contra o estresse oxidativo e agentes tóxicos. Atua como substrato ou co-substrato em reações enzimáticas e reage diretamente com as EROs e os peróxidos de lipídios (BRIVIBA; SIES, 1994). Rover Junior et al. (2001) descreveram que a atividade da GSH pode fornecer importantes informações bioquímicas na relação oxidante e antioxidante, permitindo correlações clínico-laboratoriais com processos mutagênicos que quantificam seus teores e indicam a intensidade da lipoperoxidação quando associada à exames complementares que traçam o perfil bioquímico acerca de possíveis doenças associadas ao estresse oxidativo. A GSH é oxidada mais rapidamente do que a hemoglobina e outros constituintes eritrocitários, protegendo-os da degradação oxidativa.

Mediante a excessiva geração de EROs e/ou ocorrência de falha do sistema antioxidante, ocorre desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de

glutathiona oxidada, o que caracteriza o estresse oxidativo, bem como sua magnitude (FARBER; KYLE; COLEMAM, 1990; KRETZSCHMAR, 1996). Porém durante o processo de envelhecimento do eritrócito ocorre diminuição da reciclagem da GSH, aumento das lesões oxidativas e acúmulo de cálcio intraeritrocitário (KURATA et al., 2000).

A GSH pode ser usada como substrato pela glutathiona peroxidase na eliminação dos hidroperóxidos, reduzindo H_2O_2 em água. Pode induzir a redução da forma oxidada da vitamina C, que atua na manutenção da vitamina E em sua forma reduzida. Atua na detoxificação de aldeídos reativos, como aqueles reativos ao ácido tiobarbitúricos (TBARS) gerados durante a peroxidação lipídica, através da glutathiona-S-transferase (JONES et al., 1995).

Outro método de avaliação do estresse oxidativo pode ser feito através da determinação do malondialdeído (MDA) e da quantificação da habilidade de redução do ferro plasmático.

O MDA é um dos produtos finais da lipoperoxidação sendo utilizado como indicador de intensidade da mesma (TODOVORA, 2005). Como os eritrócitos circulam por todo o organismo a mensuração do estresse oxidativo eritrocitário, por meio da mensuração do MDA eritrocitário, pode ser utilizada como indicativo de estresse oxidativo (MACHADO et al., 2007).

Bouwstra et al. (2008) demonstraram em novilhas o efeito da vitamina E sobre dano oxidativo no sangue, fígado e glândula mamária através da determinação do MDA. A suplementação de vitamina E não impede o aumento de MDA sanguíneo no parto, mas as baixas concentrações sanguíneas em vacas suplementadas duas semanas após o parto sugerem que a vitamina E tenha papel importante na recuperação estresse oxidativo no pós parto. A suplementação de vitamina E reduz o dano oxidativo no fígado, enquanto que nenhum efeito óbvio foi encontrado em concentrações MDA no leite.

A capacidade antioxidante pode ser mensurada por meio de vários métodos, dentre eles a habilidade de redução do ferro plasmático (HRFP). Em ensaio da capacidade antioxidante total realizada com HRFP descrito por Benzie e Strain (1996), os resultados mostram reação cinética e relações dose-resposta com ácido ascórbico, ácido úrico, bilirrubina, Trolox, α -tocoferol, e albumina, com misturas de antioxidantes e com plasma; demonstrando atividades relativas destes redutores e a possível interação entre eles. Como sua reação com a albumina é muito lenta e a

variável possui papel antioxidante muito claro, pode atuar como marcador específico. Alterações nas concentrações de proteínas podem indicar o efeito de outro antioxidante na amostra, e a determinação de HRFP pode oferecer índices dúbios de antioxidantes.

Grande interesse científico envolvendo as EROs nas patogenias relacionadas ao período de transição de vacas leiteiras resultou em novos estudos (BERNABUCCI et al., 2005; LEBLANC, 2010), bem como o impacto e a eficiência da suplementação com antioxidantes nos animais mantidos nos sistemas intensivos de produção durante este período crítico (LEBLANC et al., 2002; BOUWSTRA et al., 2010).

Chaterjee et al. (2003) tiveram como objetivo estudar o efeito da suplementação de vitamina E (1.000UI) via oral no período periparto de vacas. A suplementação iniciou-se nos tempos 0, 15, 30 e 60 dias antes do parto mantendo-se até o final do primeiro mês de lactação. Os autores não observaram influência da suplementação com vitamina E na concentração de HRFP. Porém observaram correlação positiva da atividade de HRFP com as concentrações de vitamina E. Gáal, et al. (2006) também observou redução de 20% nos valores de HRFP no momento do parto de vacas holandesas, não obtendo diferença nos momentos pré e pós-parto. Estes mesmos autores observaram valores de SOD 11% maiores no momento do parto, não verificando qualquer alteração nos valores de MDA.

Estudo realizado com 80 vacas holandesas primíparas avaliando o status oxidativo durante o período de transição e a influência do número de ordenhas, densidade energética da dieta e baixa ou alta produção. Houve efeito significativo do parto para HRFP, vitamina E, GSH-Px e SOD, o que indica mudanças no estado oxidativo plasmático em torno deste evento. A capacidade total de antioxidante no plasma, expressos como valores de HRFP, foi menor 2 semanas antes do parto que 4 e 8 semanas após o parto. A baixa habilidade antioxidante do plasma total (ou seja, HRFP) e da concentração de vitamina E no periparto, e a maior atividade de SOD e GSH-Px plasmática no pós-parto em comparação com pré-parto caracterizaram a mudança no estado oxidativo de novilhas da raça Holandesa no periparto (WULLEPIT et al., 2009).

Weigel et al. (2010), observaram em ovinos intoxicados por cobre maiores concentrações de HRFP e ácido úrico, indicando com o aumento destes marcadores

do estresse oxidativo e a resposta compensatória frente à formação de EROs próximo à crise hemolítica que acompanha o quadro.

Bernabucci et al. (2005) estudaram vacas no período de transição e observaram que animais com maior escore de condição corporal (ECC) no pré-parto e maiores perdas de ECC no pós-parto apresentavam maior sensibilidade ao estresse oxidativo, com maiores concentrações de EROs, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e menores atividades de SOD. O que pode ocorrer devido a maior perda de ECC maiores os desafios oxidativos, e em resposta a este desafio maiores atividades de SOD são disponibilizadas. Quando comparado o grupo de vacas independente da divisão em ECC, a atividade de SOD aumentou progressivamente nas últimas três semanas antes do parto, chegando ao limite máximo quatro dias antes do parto. Após o parto, a atividade da SOD diminuiu rapidamente para alcançar os níveis registrados antes do parto.

Em estudo realizado por Pathan et al. (2010) com búfalas Mehsana, no dia do parto os animais apresentaram maior atividade de SOD eritrocitária, em comparação com 15 e 30 dias antes e depois do parto, inferindo que no parto há maior estresse e, devido ao decréscimo dos teores posteriormente ao parto, haveria redução deste estresse. Seven et al. (1996) em estudo focando a atividade da tireoide, avaliaram as atividades de SOD, GSH-Px e GSH em ratos com hipertireoidismo suplementados ou não com vitamina E. O aumento observado nestas enzimas nos ratos do grupo tratado demonstrou a capacidade antioxidante da vitamina em reduzir o estresse do aumento do metabolismo basal.

Kamiloglu et al. (2006), verificaram que a suplementação com vitamina E e β -caroteno em ovinos atenuou o estresse oxidativo induzido pelo parto, demonstrado pela maior concentração de GSH eritrocitária e menores concentrações de MDA plasmático. Segundo Machado (2009), o sistema glutatona e catalase são os principais mecanismos de defesa contra o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), dependendo da quantidade de peróxidos. A catalase é uma hemoproteína que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio a H_2O e O_2 . Sua atividade enzimática é dependente do ferro presente na porção heme de sua estrutura (HARVEY et al., 1997). Diminui a degradação oxidativa em outros tecidos, devido a remoção do peróxido de hidrogênio difundido do meio extracelular para os eritrócitos. O sistema glutatona atua em níveis baixos de peróxido devido à maior afinidade da GSH-Px

pelo peróxido de hidrogênio, enquanto que a catalase age principalmente em concentrações elevadas de peróxidos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2001).

Embora não haja consenso na literatura do real benefício da administração de antioxidantes, esta prática de manejo pode representar importante método de controle, de baixo custo, para doenças relacionadas ao estresse oxidativo (LYKKESFELDT; SVENDSEN, 2007). A literatura é muito rica quando se trata da utilização de vitamina E em vacas leiteiras, porém o uso da associação de vitaminas ADE é pouco explorado apesar da grande disponibilidade de produtos comerciais.

O estresse é capaz de esgotar os recursos antioxidantes do organismo (SCONBERG et al., 1993). O processo de parto, embora fisiológico, é um evento estressante. O aumento do estresse oxidativo em torno do parto (BERNABUCCI et al 2002; CASTILLO et al., 2005) foi fundamentado pela menor concentração plasmática de α -tocoferol (vitamina E) e retinol (vitamina A), durante o último mês de gestação (LEBLANC et al., 2002.) e, mais significativamente, no parto (POLITIS et al., 1996, GOFF et al., 2002). Neste sentido, Goff e Stabel (1990) observaram que as concentrações plasmáticas de retinol e vitamina E decrescem ao redor de 38% e 47%, respectivamente, em vacas leiteiras nos dias que precedem o parto. A redução no consumo de matéria seca nas vacas entre uma e duas semanas antes do parto, também diminui a disponibilidade de antioxidantes no organismo (WEISS et al., 1990).

Deve-se ressaltar também que as exigências das vitaminas lipossolúveis A, D e E aumentam com o maior potencial produtivo, baixa exposição à luz solar e fornecimento insuficiente de forragem fresca aos animais (BALDI, 2005).

Vitamina E é o termo utilizado para um grupo de tocoferóis e tocotrienóis dos quais o α -tocoferol possui maior importância biológica devido sua ação antioxidante. Tem grande impacto na prevenção de doenças crônicas provavelmente associadas ao estresse oxidativo.

A vitamina E tem reconhecido papel como antioxidante, atuando na prevenção de danos causados pelos EROs aos ácidos graxos poli-insaturados e, como um agente estabilizador de membranas, através da sua interação com os fosfolípidos. Têm-se estudado o papel da vitamina E como reguladora de enzimas, reações celulares e expressão de genes (BRADFORD et al., 2003; BALDI, 2005). Segundo Bradford et al. (2003) a ação do α -tocoferol, sobre a modulação da atividade enzimática, pode ser maior do que sua ação sobre a estrutura da membrana. As

funções da vitamina E no sistema antioxidante são variadas, mas ela também atua em vários outros mecanismos celulares e orgânicos como regulação da transcrição de genes, agregação plaquetária e adesão monocitária (BRADFORD et al., 2003). Além da ação antioxidante, a vitamina E também atua melhorando a ação da insulina, consequentemente melhorando a eficiência do metabolismo energético. Sua deficiência reduz a função das células fagocíticas, resultado na alteração do metabolismo do ácido araquidônico para prostaglandinas e leucotrienos (NOCKELS et al., 1979).

A diminuição da concentração plasmática de vitamina E no dia do parto em vacas foi documentada pela primeira vez por Goff e Stabel (1990) e foi atribuída a sua utilização na produção e secreção de colostro. A concentração plasmática de vitamina E começa a aumentar após o parto devido a redução da colostrogeneses e menor secreção de vitamina E no leite.

A baixa concentração plasmática de vitamina E ao parto é considerada importante fator de risco para a infecção intramamária e o aparecimento de mastite durante a primeira semana de lactação (GOFF; STABEL, 1990). Efeitos da suplementação de vitamina E sobre as variáveis relacionadas com o estresse oxidativo dependem da quantidade suplementada (WEISS et al., 1997) e de seu teor basal (LEBLANC et al., 2002; PERSSON WALLER et al., 2007). Le Blanc et al. (2002) demonstraram haver diferença no efeito do tratamento com a vitamina E entre vacas primíparas e multíparas.

Devido aos benefícios relacionados à vitamina E, como a melhora nos sistemas imune e reprodutivo (HARRISON et al., 1984), redução de infecções intramamárias e mastite aparente (SMITH et al., 1984), levaram ao aumento substancial dos teores de ingestão recomendados para as vacas leiteiras. Em 1989, a recomendação do NRC era de 15 UI de vitamina E (como acetato de tocoferol) por kg de matéria seca (MS). A recomendação passou a ser 80 UI / kg MS no período seco e imediatamente após o parto, e cerca de 20 UI / kg durante a lactação, tendo em vista o consumo de matéria seca total maior nesse período (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2001). Deve-se considerar as perdas de vitamina E durante o processamento e armazenamento da alimentação, processo de digestão (embora as perdas de vitamina E ruminais sejam mínimas) e de absorção, e as quantidades secretadas no colostro. O coeficiente de variação nos alimentos pode ser mais do que 50%, e a

perda de vitamina E a partir da forragem conservada pode chegar a 80% (WEISS, 1998).

Estudos realizados com vacas demonstraram que a suplementação oral com 1000 UI de vitamina E/animal/dia no final do período seco, atenuou os efeitos da diminuição de vitamina E circulante no periparto, mas não significou a diminuição da incidência de doenças (WEISS et al., 1990, 1992; ALLISON; LAVEN, 2000). A administração injetável de 3000 a 5000 UI de vitamina E, uma semana antes do parto, aumentou a concentração da vitamina e melhorou função dos neutrófilos ao parto (HOGAN et al., 1992; WEISS et al., 1992; POLITIS et al., 1995). Erskine (1997) demonstrou redução de 50% na incidência de retenção de placenta após única injeção intramuscular de 3000 UI de vitamina E entre 8-14 dias pré-parto.

Lopes et al. (2003), ao avaliarem a atividade funcional neutrofílica em cabras com mastite concluíram que a suplementação com vitamina E, via parenteral, na dose 2000 UI, diminuiu a gravidade da mastite com potencial redução percentual de neutrófilos NBT-E, efeito atribuído à capacidade antioxidante que protege células fagocíticas e ação de EROs produzidas durante a explosão respiratória realizada por neutrófilos e macrófagos durante a fagocitose. Este mecanismo permite o aumento das defesas contra infecções (BABIOR, 1984). Autores sugerem que a administração oral de 3000 UI/vaca/dia previne a depleção da vitamina E sérica no período próximo ao parto, promovendo benefícios na qualidade do leite em função da influência sobre os neutrófilos (POLITIS, 2004; BOUWSTRA et al., 2008). Na suplementação com 1000 UI/vaca/dia a concentração manteve-se diminuída no pré-parto (WEISS et al., 1990; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA et al., 1994).

Ndiweni e Finch (1996) avaliaram a ação *in vitro* da vitamina E em polimorfonucleares de bovinos e observaram que as altas concentrações desta vitamina causaram a agregação das células, um efeito inibitório na produção de EROs, mas não afetaram a viabilidade das mesmas. A migração casualizada de leucócitos PMN expostos a baixas concentrações da vitamina foi aumentada, entretanto, doses excessivas apresentaram pouco efeito. A quimiotaxia foi aumentada após a suplementação com baixas concentrações de vitamina E. A vitamina E aumentou significativamente a fagocitose de *S. aureus* opsonizados por leucócitos PMN de bovinos. Os autores observaram também que, até certa concentração, a vitamina E aumenta a fagocitose de *Staphylococcus aureus*, sendo que altas doses não apresentaram diferenças quando comparadas à ausência de

suplementação. Foi também observado que os leucócitos PMN expostos à vitamina E e ao selênio produziram quantidades de EROs levemente superiores às daquelas dos PMN não tratadas, portanto, provavelmente apresentaram maior capacidade de lise de microrganismos fagocitados. Por outro lado, as concentrações muito altas apresentaram efeito inibitório na produção de EROs.

Vacas com concentração plasmática de vitamina E menores que 2,5 µg/mL apresentaram 2,8 vezes mais chances de terem infecção intramamária do que as vacas com concentrações superiores 2,5 µg/mL (WEISS et al., 1997). Jukola et al. (1996) e Weiss et al. (1997) sugeriram que 3,0 µg/mL de vitamina E são necessárias para a imunocompetência nas vacas leiteiras no período periparto. A suplementação com vitamina E em vacas secas tem sido utilizada a fim de aumentar a sua concentração plasmática (CAMPBELL; MILLER, 1998; RAJIV, 2001) e reduzir a incidência da mastite e retenção de placenta. Mas, a informação sobre o número mínimo de dias necessários para a suplementação oral de vitamina E durante período pré-parto para manter o teor desejado de vitamina no parto não foi precisamente determinado, embora LeBlanc et al. (2002) afirmem que não adianta administrar a vitamina E pela via parenteral, com intervalo superior a duas semanas do parto, pois intervalo maior que esse, devido à farmacodinâmica e farmacocinética da vitamina, não surtiria efeito para a vaca, porém os autores deste trabalho desconsideraram a possibilidade de armazenamento hepático da referida vitamina, demonstrada por Ochoa et al. (1992) com diferentes fontes de vitamina E.

Alguns estudos apontaram para a importância das concentrações de vitamina E no pré-parto de vacas, como potencial redutor da incidência de mastite no início da lactação, porém o momento apropriado no pré-parto para a administração da vitamina e as concentrações ideais ainda não foram bem estabelecidas. Em 1992 Hidiroglou et al. já afirmavam que as evidências experimentais indicavam papel benéfico da suplementação de vitamina E sobre o desempenho do animal, maior imunocompetência e preservação de produtos de carne e leite, porém a dose de vitamina E necessária para produzir esses efeitos desejados ainda precisava ser estabelecida. Neste sentido a dúvida sobre a dose efetiva de vitamina E ainda perdura.

A vitamina D engloba dois grandes grupos a vitamina D₃ (colecalfiferol, sintetizada pelos animais) e D₂ (ergocalciferol, sintetizado pelas plantas). Em ambos os casos é necessária a incidência solar para sua produção. Há cerca de dez pró-

vitaminas, produzidas pelos animais, que quando irradiadas formam a vitamina D. Assim, animais criados confinados necessitaram maior atenção quanto à suplementação deste nutriente.

A principal função da vitamina D é elevar o cálcio e o fósforo plasmáticos em concentrações compatíveis com a mineralização dos ossos. A forma ativa da vitamina D (1,25-(OH)₂D), o calcitriol, atua como hormônio esteroide é produzida no rim, circula no sangue ligada a uma proteína específica até o tecido-alvo. A vitamina D atua em conjunto com dois hormônios, calcitonina e hormônio paratireoide, na manutenção das concentrações sanguíneas de cálcio e fósforo. Eleva a concentração plasmática destes minerais por estimular bombas específicas nos intestinos, ossos e rins. Está envolvida na regulação do crescimento e diferenciação de células do sangue, incluindo a hematopoiese e sistema imunológico. Estudos sugerem a ação da vitamina D como hormônio imunorregulador, além de reduzir o crescimento de certas células malignas e promover sua diferenciação (COLSTON et al., 1981). As mesmas células que produzem a vitamina D respondem a ela diminuindo a proliferação e aumentando a diferenciação. A produção de vitamina D pelos queratinócitos aumenta nos estágios iniciais de diferenciação e diminui ao final da diferenciação (BIKE et al., 1985).

Das vitaminas lipossolúveis, a vitamina D, que atua no metabolismo do cálcio e do fósforo (POND, 2005), nos países tropicais, é tida como a menos importante a ser suplementada. Porém, recentes pesquisas tem mostrado sua importância na manutenção da densidade óssea (especialmente com o avançar da idade), na performance física, uma vez que células musculares apresentam receptores para esta vitamina, e sua deficiência atua em doenças autoimunes e até no câncer (LIPS, 2006). Sardar, et al. (1996) compararam a eficiência da vitamina E com a vitamina D3 frente a redução da peroxidação lipídica e a determinação da atividade da SOD em ratos, e concluíram que a vitamina D3 influenciou mais na atividade da GPx que a vitamina E. Os autores sugerem que o papel antioxidante da vitamina D3 pode estar negligenciado, pois esta vitamina foi mais efetiva que a vitamina E no trabalho realizado.

Ceylan et al. (2009) demonstraram que equinos submetidos a esforço físico, tiveram aumento de estresse oxidativo e diminuição das vitaminas A, D e E.

Vitamina A é a expressão genérica usada para descrever o retinol e todos os carotenoides dietéticos que têm atividade biológica de transretinol.

Os benefícios de um adequado estado nutricional de vitamina A podem ser atribuídos aos efeitos do retinol, que atua na manutenção da integridade epitelial e do sistema imunológico e, aos carotenoides, que têm ação antioxidante.

Os carotenoides são importantes sequestradores de radicais oxigênio *singlet*, tendo sido reconhecidos pela sua alta capacidade antioxidante, interrompendo a geração de carotenoides reativos ao oxigênio ainda nas etapas iniciais de sua formação. Tal efeito também vem sendo atribuído mais recentemente ao próprio retinol, do qual alguns carotenoides são precursores. Uma única molécula de retinol ou β -caroteno é capaz de inativar vários radicais oxigênio *singlet* antes de ser destruída (GOMES et al., 2005).

O papel antioxidante da vitamina A é especialmente atribuído a sua capacidade de interceptar as EROs. (BIANCHI; ANTUNES, 1999; URSO; CLARKSON, 2003; CELI, 2010). Foi demonstrado por Goff e Stabel (1990) que vacas durante o período de transição possuem significativa diminuição das concentrações de retinol, vitamina E e zinco. Sendo que o retinol progressivamente diminuiu, chegando a 38% de déficit no pós-parto e não retornou aos valores pré-parto até o fim do estudo, ou seja, até duas semanas após o parto. Os autores sugerem que esta diminuição é resultado da passagem das vitaminas A, E e do zinco para a produção e secreção de colostro. Segundo LeBlanc et al. (2004), um aumento de 100ng/mL na concentração sérica de retinol, durante a última semana que antecede o parto de vacas leiteiras, corresponde a um decréscimo de 60% do risco de mastite no início da lactação.

A vitamina E pode atuar de forma não específica no sistema imune, no entanto, outras vitaminas como as vitaminas A e D podem influenciar a resposta imune de maneira altamente específica. As vitaminas A e D se diferenciam das demais pelos seus metabólitos bioativos, o ácido retinoico e a 1,25-dihidroxitamina D_3 , que exercem seus efeitos pela ligação a receptores nucleares de hormônios (MORA et al., 2008). Por exemplo, o efeito da 1,25-dihidroxitamina D_3 sobre o sistema imune deve-se, em parte, a inibição da expressão de interferon- γ (IFN- γ) e interleucina (IL)-2, que é mediada pela ligação do complexo VDR-RXR - formado pelo receptor nuclear de vitamina D (VDR) que heterodimiza com os receptores nucleares da família de receptores X de retinóide (RXR) – aos elementos responsivos da vitamina D (VDRE) nos genes que codificam a IL-2 e IFN- γ (CIPPITELLI; SANTONI, 1998).

Assim, a vitamina D pode levar ao aumento da capacidade microbicida, já descrita em macrófagos (HOLICK, 2007).

Os metabólitos da vitamina A modulam aspectos funcionais mais específicos da resposta imune como o balanço entre as resposta Th1 e Th2 e a diferenciação de células T reguladoras (MORA et al., 2008). De fato, o ácido retinóico leva a diferenciação de células Th2 pela indução da expressão de IL-4 (LOVETT-RACKE; RACKE, 2002).

O controle do metabolismo oxidativo nas células é extremamente importante para a sobrevivência dos organismos no ambiente aeróbico. Em adição aos efeitos protetores dos antioxidantes endógenos, a inclusão de antioxidantes é de grande importância para a diminuição do risco de desenvolvimento de doenças associadas ao estresse oxidativo. A utilização de compostos antioxidantes encontrados na dieta ou mesmo sintéticos é um dos mecanismos de defesa contra as EROs que podem ser empregados na medicina veterinária na forma de prevenção de alterações ou recuperação destas (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Apesar do período de transição de vacas leiteiras e seu manejo terem sido o foco nas pesquisas em nutrição e fisiologia nos últimos quinze anos (OVERTON; WALDRON, 2004), muitas dúvidas ainda permanecem sobre as implicações deste período, as enfermidades correlacionadas e uso de antioxidantes a fim de minimizar as alterações decorrentes a este período.

**CAPÍTULO 1 – METABOLISMO OXIDATIVO E PERFIL BIOQUÍMICO DE VACAS
HOLANDESAS PRIMÍPARAS E MULTÍPARAS NO PERÍODO DE TRANSIÇÃO
SUPLEMENTADAS COM VITAMINAS ADE.**

3 INTRODUÇÃO

O período transição é considerado crítico e complicações nesta fase podem comprometer os sistemas de criação devido ao acometimento de matrizes e crias. Com o objetivo de melhorar a eficiência produtiva, o sistema intensivo é muito utilizado. Porém nesse tipo de criação, observa-se aumento dos problemas metabólicos e nutricionais em relação aos problemas parasitários e infecciosos.

Toda vaca leiteira passa por período de resistência à insulina, redução de consumo, balanço energético negativo, lipólise e perda de peso, hipocalcemia, diminuição da resposta imune e contaminação bacteriana do útero por um período antes do parto e também durante as semanas após o parto. Assim, um terço destas vacas pode ser afetado por algum tipo de doença metabólica ou infecciosa no início da lactação (LEBLANC, 2010). Neste contexto, tem crescido o interesse científico em estudar o envolvimento de EROs na patogenia destes processos (BERNABUCCI et al., 2005; LEBLANC et al., 2010), bem como verificar o impacto e a eficiência da suplementação com antioxidantes nos animais mantidos nos sistemas intensivos de produção durante este período crítico (LEBLANC et al., 2002; BOUWSTRA et al., 2010).

A dieta de vacas leiteiras com a utilização de silagem como volumoso é conhecida pelo seu baixo conteúdo em antioxidantes (BALLET et al., 2000) sendo assim, nos períodos de maior demanda metabólica, como no periparto, estes animais tem maior chance de entrarem em estresse oxidativo. Além disso, a suplementação com concentrado na dieta reduz a ingestão de forragem (BARGO et al., 2002) e aumenta a degradação de alguns antioxidantes no rumen (WEISS et al., 1995).

Embora não haja consenso na literatura do real benefício da administração de antioxidantes, esta prática de manejo pode representar importante método de controle, de baixo custo, para doenças relacionadas ao estresse oxidativo (LYKKESFELDT; SVENDSEN, 2007).

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de duas aplicações de vitamina ADE intramuscular (IM) sobre o perfil bioquímico e metabolismo oxidativo de vacas holandesas multíparas e primíparas, com dieta a base de silagem de milho e concentrado, no período de transição.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 32 vacas holandesas, híginas, no último mês de gestação, com média de produção de 30 kg de leite/dia mantidas em sua fazenda de origem, em Pilar do Sul no Estado de São Paulo. Todas as vacas compunham o mesmo lote e foram submetidas a manejo e dietas idênticos (Figura 1).

Esses animais foram alimentados com silagem de milho e concentrado a base de farelo de soja, farelo de milho, resíduo de cervejaria, polpa cítrica, ureia e núcleo mineral (Bovigold® e Lactobovi®), sendo a relação concentrado/volumoso de 50:50. A alimentação das vacas seguiu os critérios de arraçãoamento, divisão em três tratos diários, após cada uma das ordenhas diárias, em linha de cocho individual e a divisão dos lotes em lactação foi feita de acordo com a ordem de partos (primíparas e multíparas).

Figura 1: Vacas holandesas alojadas no free-stall.

O delineamento foi de blocos casualizados com arranjo fatorial 2x2, foram considerados dois níveis de parto (multíparas ou primíparas) e dois tratamentos (vitamina ADE ou solução fisiológica). As vacas foram distribuídas aleatoriamente por sorteio, sendo que a composição final do Grupo Controle foi de nove multíparas e oito primíparas e do Grupo Tratado foi de oito multíparas e sete primíparas.

O grupo tratado recebeu duas doses da associação vitamínica ADE (270.000 UI vitamina A, 80.000 UI vitamina D e 80 mg vitamina E/mL) na dose de 1mL/50 kg de Peso Vivo pela via intramuscular profunda, aos 20 e 10 dias antes do parto.

Nestes mesmos momentos e pela mesma via de aplicação o grupo controle recebeu 1mL/50 kg de peso vivo de solução fisiológica estéril para mimetizar o efeito do estresse causado pela injeção e manipulação do animal.

Em média os animais estavam com 600 kg de peso vivo, ou seja, o grupo tratado recebeu 12 mL do produto sendo 3.240.000 UI de Vitamina A, 960.000 UI de vitamina D e 960 mg de vitamina E por aplicação.

Aos -20d;-10d; 0d (até 24 horas deste); 7d; 14d; 28 dias do parto foram colhidas amostras de sangue para posteriores determinações. A figura 2 ilustra o esquema do tratamento e das coletas de sangue de acordo com os momentos experimentais.

Figura 2 – Atividades e respectivos momentos experimentais.

Foram determinadas as concentrações plasmáticas de em analisador bioquímico automático, da marca Labtest, modelo Labmax 240:

- Concentração plasmática de glicose - kit Dyasis® (código 1.2500.99.10.022)
- Concentração plasmática β hidroxibutirato (BHB) - kit Randox (código RB 1007)
- Concentração plasmática de ácidos graxos não esterificados (AGNE) - kit Wako (código Sol. A 995.34791 4x50mL, color reagent A 999-34691 4x50mL; Sol. B 993-35191 4x25mL; reagent B 991-34891 4x25 mL)
- Concentração sérica de Colesterol - kit Biosystems (código 11.505)
- Atividade sérica de aspartato transaminase (AST) - kit Biosystems (código 11.531)

- Atividade sérica de gama glutamil transferase (GGT) - kit Diasys (código 1.280199.10.021)
- Atividade sérica de creatina fosfoquinase (CK) - Kit Dyasis (código 1.1601.99.10.021)

O metabolismo oxidativo foi avaliado pelos seguintes marcadores:

- Habilidade de redução férrica plasmática (HRFP). A habilidade da redução de íons férricos no plasma EDTA, foi realizada de acordo com Benzie, Strain (1996). As leituras foram realizadas utilizando-se espectrofotômetro marca CELM[®], modelo E225D, em comprimento de onda 593nm.
- Atividade da superóxido dismutase (SOD). Foi realizada pelo método colorimétrico descrito por Woolliams e Wiener (1983) e adaptado para analisador bioquímico automático LABMAX 240, utilizando-se kit comercial RANDOX SD 125 (Ransel[®] Laboratories, Randox, Crumlin, UK) sendo utilizada a papa de hemácias na diluição de 200µL.
- Concentração de glutathiona reduzida (GSH). Foi realizada no sangue total e determinada por meio de método colorimétrico (Beutler et al., 1963) e as leituras realizadas em espectrofotômetro digital, marca Micronal[®] - modelo B34211, em comprimento de onda 412nm.
- Concentração de malondialdeído (MDA). A peroxidação lipídica foi determinada indiretamente pelo teor de MDA no plasma heparinizado pelo método do ácido tiobarbitúrico, descrito por Esterbauer e Cheeseman (1990).

As amostras de sangue sem anticoagulante foram mantidas em temperatura ambiente, até a retração do coágulo, enquanto que as demais, com anticoagulante, foram homogeneizadas e prontamente refrigeradas.

Ao final de cada coleta todas as amostras foram conduzidas ao Laboratório de Doenças Nutricionais e Metabólicas da Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para processamento. No sangue com EDTA foi realizado, inicialmente, o procedimento parcial para GSH e essas amostras foram armazenadas no freezer a -80°C até realização da análise em até 30 dias da coleta. O sangue heparinizado foi centrifugado por 10 minutos em 450 G à 4°C em centrífuga refrigerada marca SORVALL[®], modelo Legend RT, para separar o plasma das hemácias. As hemácias foram então lavadas com PBS por três ciclos para a obtenção da papa de hemácias que foram armazenadas por um prazo máximo de

30 dias a -80°C , para posterior determinação da SOD. Os tubos sem anticoagulante e os contendo fluoreto foram centrifugados a 1700 G, por 15 minutos, na centrífuga da marca FANEM[®], modelo Excelsa II 206 BL, o soro e o plasma foram então aliquotados e mantidos a -80°C até a determinação das variáveis supracitadas.

Os dados foram analisados pelo programa Statistical Analysis System (Versão 9.3, 2010) utilizando o procedimento MIXED, sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos, pelo teste de Shapiro-Wilk, e a busca por “outliers” através do procedimento UNIVARIATE do SAS. Os dados que não atenderam à premissa da normalidade dos resíduos foram submetidos à transformação logarítmica ou pela raiz quadrada. Os dados, transformados ou não, foram submetidos à análise de variância para delineamento inteiramente casualizado com arranjo fatorial de tratamentos (2 x 2), adicionado do fator medidas repetidas no tempo, referentes aos diferentes momentos de coleta. O modelo contemplou, como causas de variação, o efeito de vitamina, efeito de ordem de parto, efeito de momento, bem como efeito de três interações duplas (vitamina*parto, vitamina*momento, parto*momento) e uma interação tripla (vitamina*parto*momento), como fatores fixos.

A análise dos efeitos de vitamina, ordem de parto e sua interação por momento somente foi realizada quando uma das interações entre efeito de momento e esses fatores foi significativa. Para todos os testes avaliados considerou-se o nível de significância de 5%.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética da FMVZ/USP sob protocolo nº 1703/2009.

5 RESULTADOS

5.1 Habilidade de redução férrica plasmática (HRFP)

A HRFP apresentou efeito do momento ($P<0,0001$) (Tabela 1) e efeito da vitamina ($P=0,0345$), ou seja, o grupo tratado diferiu do grupo controle independente do número de partos dos animais (Gráfico 1).

Tabela 1 - Valores médios e respectivos desvios padrão da habilidade de redução férrica plasmática ($\mu\text{mol/L}$) de vacas multíparas e primíparas tratadas e não com vitamina ADE no período de transição – São Paulo - 2010

TRATAMENTOS					
	Primíparas		Multíparas		
Momento	Controle	ADE	Controle	ADE	Média
-20	252,55 (±32,87)	296,87 (±68,81)	271,44 (±20,11)	257,52 (±28,16)	266,77 ^b (±38,68)
-10	273,73 (±21,37)	255,13 (±27,90)	269,11 (±22,63)	259,73 (±41,64)	265,04 ^b (±28,99)
0	321,67 (±32,18)	311,89 (±47,71)	352,71 (±47,47)	306,42 (±56,05)	323,17 ^a (±47,62)
7	291,28 (±44,25)	238,66 (±45,72)	316,46 (±60,57)	306,88 (±53,31)	293,71 ^{ab} (±57,44)
14	314,11 (±11,15)	318,71 (±35,03)	351,94 (±28,51)	292,25 (±26,81)	321,23 ^a (±34,94)
28	291,56 (±28,41)	324,08 (±35,60)	315,45 (±45,52)	274,39 (±33,88)	298,96 ^a (±39,90)
Média	287,47 (±37,37)	291,08 (±52,67)	311,04 (±50,85)	281,92 (±44,48)	293,25 (±47,61)

Notas: * Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferenças ($P<0,05$) entre os momentos.

Momento -20: 20 dias antes do parto e primeira dose; Momento -10: 10 dias antes do parto e segunda dose; Momento 0: dia do parto; Momento 7: 1 semana após o parto; Momento 14: 2 semanas após o parto; Momento 28: 4 semanas após o parto.

Gráfico 1 - Valores médios e respectivos desvios padrão da habilidade de redução férrica plasmática ($\mu\text{mol/L}$) de vacas (múltiparas + primíparas) tratadas e não com vitamina ADE no período de transição – São Paulo - 2010

Notas: Momento -20: 20 dias antes do parto e primeira dose; Momento -10: 10 dias antes do parto e segunda dose; Momento 0: dia do parto; Momento 7: 1 semana após o parto; Momento 14: 2 semanas após o parto; Momento 28: 4 semanas após o parto.

5.2 Atividade desuperóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima SOD não diferiu entre o grupo tratado e controle (Tabela 2). Foram observadas maiores concentrações de SOD nas vacas primíparas ($P=0,0162$), caracterizando o efeito do número de parto (Gráfico 2).

Tabela 2 – Valores médios e respectivos desvios padrão da atividade da enzima superóxido dismutase (U/g de Hb) de vacas multíparas e primíparas tratadas e não com vitamina ADE no período de transição – São Paulo – 2010

TRATAMENTOS					
Momento	Primíparas		Multíparas		Média
	Controle	ADE	Controle	ADE	
-20	4219 (±1718)	3442 (±440)	3556 (±622)	3460 (±492)	3676 (±991)
-10	5237 (±986)	4427 (±1368)	3488 (±656)	3545 (±966)	4145 (±1203)
0	3891 (±1433)	4425 (±988)	3726 (±982)	3359 (±947)	3826 (±1104)
7	3519 (±756)	3951 (±811)	3508 (±1441)	4099 (±1667)	3763 (±1233)
14	3876 (±1619)	4801 (±1578)	3292 (±622)	3899 (±1282)	3920 (±1355)
28	4021 (±1431)	4807 (±2259)	4293 (±1530)	4240 (±1797)	4327 (±1688)
Média	4146 (±1409)	4309 (±1375)	3645 (±1054)	3757 (±1233)	3944 (±1284)

Notas: Momento -20: 20 dias antes do parto e primeira dose; Momento -10: 10 dias antes do parto e segunda dose; Momento 0: dia do parto; Momento 7: 1 semana após o parto; Momento 14: 2 semanas após o parto; Momento 28: 4 semanas após o parto.

Gráfico 2 – Valores médios da atividade da enzima superóxido dismutase (U/g de Hb) de vacas multíparas e vacas primíparas no período de transição – São Paulo - 2010

Notas: Momento -20: 20 dias antes do parto e primeira dose; Momento -10: 10 dias antes do parto e segunda dose; Momento 0: dia do parto; Momento 7: 1 semana após o parto; Momento 14: 2 semanas após o parto; Momento 28: 4 semanas após o parto.

5.3 Concentração de glutathiona reduzida (GSH)

Não foram observadas diferenças nas concentrações de GSH nos grupos experimentais tanto em relação ao tratamento quanto em relação ao número de partos (Tabela 3).

Tabela 3 – Valores de médias e respectivos desvios padrão da concentração da glutathiona reduzida (mg/dL) de vacas multíparas e primíparas tratadas e não com vitamina ADE no período de transição – São Paulo - 2010

TRATAMENTOS					
Primíparas			Multíparas		
Momento	Controle	ADE	Controle	ADE	Média
-20	39,60	28,81	31,51	36,15	34,18
	(±12,98)	(±6,93)	(±5,37)	(±9,55)	(±9,72)
-10	47,88	33,49	49,87	47,09	45,10
	(±31,36)	(±7,44)	(±27,00)	(±31,16)	(±23,69)
0	45,13	43,85	38,13	43,51	42,39
	(±20,52)	(±16,47)	(±24,09)	(±21,73)	(±20,29)
7	45,61	42,32	38,47	37,60	40,88
	(±9,45)	(±15,18)	(±13,92)	(±17,56)	(±13,97)
14	41,35	51,33	40,16	37,20	42,16
	(±10,92)	(±27,57)	(±27,57)	(±10,21)	(±20,51)
28	47,82	42,92	35,64	35,78	40,31
	(±16,54)	(±16,97)	(±11,37)	(±6,47)	(±13,71)
Média	44,55	40,45	39,11	39,56	40,86
	(±15,27)	(±17,24)	(±20,08)	(±17,74)	(±17,75)

Notas: Momento -20: 20 dias antes do parto e primeira dose; Momento -10: 10 dias antes do parto e segunda dose; Momento 0: dia do parto; Momento 7: 1 semana após o parto; Momento 14: 2 semanas após o parto; Momento 28: 4 semanas após o parto.

5.4 Concentração de malondialdeído (MDA)

Não foram observadas diferenças nas concentrações de MDA nos grupos experimentais tanto em relação ao tratamento quanto em relação ao número de partos (Tabela 4).

Tabela 4 – Valores de médias e respectivos desvios padrão da concentração de malondialdeído ($\mu\text{mol/L}$) de vacas multíparas e primíparas tratadas e não com vitamina ADE no período de transição – São Paulo - 2010

TRATAMENTOS					
Primíparas			Multíparas		
Momento	Controle	ADE	Controle	ADE	Média
-20	0,50	0,57	0,75	0,57	0,60
	(±0,21)	(±0,15)	(±0,33)	(±0,24)	(±0,25)
-10	0,59	0,64	0,53	0,64	0,60
	(±0,12)	(±0,10)	(±0,08)	(±0,11)	(±0,11)
0	0,67	0,71	0,60	0,59	0,64
	(±0,19)	(±0,23)	(±0,12)	(±0,15)	(±0,17)
7	0,69	0,62	0,60	0,59	0,63
	(±0,20)	(±0,18)	(±0,19)	(±0,21)	(±0,19)
14	0,65	0,52	0,54	0,57	0,57
	(±0,20)	(±0,16)	(±0,12)	(±0,12)	(±0,15)
28	0,63	0,62	0,50	0,64	0,60
	(±0,19)	(±0,15)	(±0,18)	(±0,09)	(±0,16)
Média	0,62	0,61	0,59	0,60	0,60
	(±0,19)	(±0,16)	(±0,19)	(±0,16)	(±0,18)

Notas: Momento -20: 20 dias antes do parto e primeira dose; Momento -10: 10 dias antes do parto e segunda dose; Momento 0: dia do parto; Momento 7: 1 semana após o parto; Momento 14: 2 semanas após o parto; Momento 28: 4 semanas após o parto.

5.5 Concentração plasmática de glicose

A concentração plasmática de glicose foi influenciada pelo momento ($P < 0,0001$) (Tabela 5), caracterizando o efeito do parto, além disso, foram observadas maiores concentrações no grupo das vacas primíparas que no grupo das multíparas, caracterizando o efeito do número de partos ($P = 0,001$) (Gráfico 3). Houve interação parto e número de parto ($P = 0,0372$) (Tabela 5).

Tabela 5 – Valores médios e respectivos desvios padrão da concentração plasmática de glicose (mmol/L) de vacas multíparas e primíparas tratadas e não com vitamina ADE no período de transição – São Paulo - 2010

	TRATAMENTOS					P
	Primíparas		Multíparas			Interação
Momento	Controle	ADE	Controle	ADE	Média	Momento x N ^o de Parto
-20	2,61 (±0,19)	2,58 (±0,30)	2,63 (±0,21)	2,49 (±0,36)	2,58 ^{ab} (±0,26)	0,6645
-10	2,62 (±0,29)	2,56 (±0,20)	2,51 (±0,36)	2,47 (±0,23)	2,54 ^b (±0,28)	0,3201
0	3,06 (±0,72)	3,25 (±1,04)	2,93 (±0,48)	2,56 (±0,40)	2,93 ^a (±0,69)	0,986
7	2,58 (±0,49)	2,74 (±0,16)	1,94 (±0,53)	2,21 (±0,27)	2,35 ^{bc} (±0,50)	0,0009
14	2,33 (±0,31)	2,49 (±0,47)	2,12 (±0,41)	1,65 (±0,31)	2,14 ^c (±0,48)	0,0007
28	2,58 (±0,56)	2,21 (±0,37)	1,91 (±0,56)	2,01 (±0,29)	2,17 ^c (±0,52)	0,0175
Média	2,61 (±0,47)	2,64 (±0,59)	2,35 (±0,57)	2,23 (±0,44)	2,45 (±0,54)	

Notas: * Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferenças ($P < 0,05$) entre os momentos. Momento -20: 20 dias antes do parto e primeira dose; Momento -10: 10 dias antes do parto e segunda dose; Momento 0: dia do parto; Momento 7: 1 semana após o parto; Momento 14: 2 semanas após o parto; Momento 28: 4 semanas após o parto.

Gráfico 3 – Valores médios e respectivos desvios padrão da concentração plasmática de glicose (mmol/L) de vacas multíparas e primíparas no período de transição – São Paulo - 2010

Notas: Momento -20: 20 dias antes do parto e primeira dose; Momento -10: 10 dias antes do parto e segunda dose; Momento 0: dia do parto; Momento 7: 1 semana após o parto; Momento 14: 2 semanas após o parto; Momento 28: 4 semanas após o parto.

5.6 Concentração plasmática de betahidroxibutirato (BHB)

A concentração plasmática de BHB apresentou efeito do momento ($P<0,0001$) (Tabela 6), foram observados também maiores concentrações de BHB no grupo das vacas múltiparas que nas primíparas, caracterizando o efeito do número de partos ($P=0,0012$) (Gráfico 4). Houve interação momento, número de parto e vitamina ($P=0,0292$) (Tabela 6).

Tabela 6 – Valores médios e respectivos desvios padrão da concentração plasmática de BHB (mmol/L) de vacas múltiparas e primíparas tratadas e não com vitamina ADE no período de transição – São Paulo - 2010

Momento	TRATAMENTOS				Média	Probabilidades		
	Primíparas		Múltiparas			ADE	Parto	Interação
	Controle	ADE	Controle	ADE				
-20	0,71 (±0,19)	0,81 (±0,30)	0,80 (±0,21)	0,99 (±0,36)	0,83 ^a (±0,28)	0,1394	0,1296	0,6305
-10	0,76 (±0,29)	0,74 (±0,20)	0,77 (±0,36)	0,86 (±0,23)	0,78 ^{ab} (±0,28)	0,9291	0,4622	0,5289
0	0,41 (±0,72)	0,51 (±1,04)	0,59 (±0,48)	0,64 (±0,40)	0,55 ^c (±0,15)	0,1062	0,0029	0,4869
7	0,85 (±0,49)	0,54 (±0,16)	0,68 (±0,53)	0,92 (±0,27)	0,76 ^{ab} (±0,41)	0,7507	0,3998	0,0669
14	0,83 (±0,31)	0,51 (±0,47)	0,68 (±0,41)	1,15 (±0,31)	0,80 ^{ab} (±0,42)	0,5755	0,0480	0,0055
28	0,48 (±0,56)	0,48 (±0,37)	0,75 (±0,56)	0,73 (±0,29)	0,62 ^{bc} (±0,25)	0,8892	0,0028	0,9226
Média	0,68 (±0,47)	0,60 (±0,59)	0,71 (±0,57)	0,88 (±0,44)	0,72 (±0,32)	0,4024	0,0012	0,0229

Notas: * Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferenças ($P<0,05$) entre os momentos.

Momento -20: 20 dias antes do parto e primeira dose; Momento -10: 10 dias antes do parto e segunda dose; Momento 0: dia do parto; Momento 7: 1 semana após o parto; Momento 14: 2 semanas após o parto; Momento 28: 4 semanas após o parto.

Gráfico 4 – Valores médios e respectivos desvios padrão da concentração plasmática de BHB (mmol/L) de vacas multíparas e primíparas tratadas e não com vitamina ADE no período de transição – São Paulo - 2010

Notas: Momento -20: 20 dias antes do parto e primeira dose; Momento -10: 10 dias antes do parto e segunda dose; Momento 0: dia do parto; Momento 7: 1 semana após o parto; Momento 14: 2 semanas após o parto; Momento 28: 4 semanas após o parto.

5.7 Concentração de ácidos graxos não esterificados (AGNE)

As concentrações plasmática de AGNE apresentaram apenas efeito do momento ($P < 0,0001$) (Tabela 7 e Gráficos 5).

Tabela 7 – Valores médios e respectivos desvios padrão da concentração plasmática de AGNE ($\mu\text{mol/L}$) de vacas múltiparas e primíparas tratadas e não com vitamina ADE no período de transição – São Paulo - 2010

TRATAMENTOS					
Primíparas			Múltiparas		
Momento	Controle	ADE	Controle	ADE	Média
-20	140,59 (±86,11)	201,32 (±136,20)	115,87 (±73,78)	103,51 (±27,75)	136,67 ^d (±88,94)
-10	208,09 (±81,18)	239,83 (±196,48)	262,71 (±276,15)	220,59 (±188,36)	233,52 ^c (±192,66)
0	573,75 (±475,83)	476,39 (±114,25)	612,53 (±404,49)	633,11 (±243,58)	578,20 ^a (±335,76)
7	693,36 (±440,72)	322,72 (±133,69)	317,74 (±192,28)	419,43 (±292,78)	441,88 ^{ab} (±320,35)
14	438,16 (±284,12)	311,30 (±68,86)	343,14 (±315,28)	323,23 (±228,20)	354,95 ^b (±243,05)
28	212,29 (±67,98)	255,99 (±207,40)	176,61 (±81,15)	168,91 (±88,46)	200,97 ^{cd} (±118,28)
Média	377,71 (±347,41)	303,22 (±167,72)	304,77 (±290,03)	315,89 (±261,27)	325,73 (±278,16)

Notas: * Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferenças ($P < 0,05$) entre os momentos.

Momento -20: 20 dias antes do parto e primeira dose; Momento -10: 10 dias antes do parto e segunda dose; Momento 0: dia do parto; Momento 7: 1 semana após o parto; Momento 14: 2 semanas após o parto; Momento 28: 4 semanas após o parto.

Gráfico 5 – Valores médios e respectivos desvios padrão da concentração plasmática de AGNE ($\mu\text{mol/L}$) de vacas no período de transição – São Paulo - 2010

Notas: Momento -20: 20 dias antes do parto e primeira dose; Momento -10: 10 dias antes do parto e segunda dose; Momento 0: dia do parto; Momento 7: 1 semana após o parto; Momento 14: 2 semanas após o parto; Momento 28: 4 semanas após o parto.

5.8 Concentração sérica de colesterol

A concentração sérica de colesterol apresentou efeito do momento ($P < 0,0001$) (Tabela 8 e Gráfico 6).

Tabela 8 – Valores médios e respectivos desvios padrão da concentração sérica de colesterol (mmol/L) de vacas multíparas e primíparas tratadas e não com vitamina ADE no período de transição – São Paulo - 2010

TRATAMENTOS					
	Primíparas		Multíparas		
Momento	Controle	ADE	Controle	ADE	Média
-20	1,54 (±0,45)	1,59 (±0,28)	1,65 (±0,47)	1,50 (±0,55)	1,57 ^c (±0,44)
-10	1,30 (±0,25)	1,40 (±0,34)	1,54 (±0,30)	1,52 (±0,41)	1,44 ^c (±0,33)
0	1,31 (±0,34)	1,30 (±0,37)	1,10 (±0,27)	1,07 (±0,21)	1,18 ^d (±0,31)
7	1,19 (±0,27)	1,67 (±0,40)	1,77 (±0,71)	1,42 (±0,43)	1,53 ^c (±0,53)
14	1,85 (±0,57)	2,23 (±0,51)	2,17 (±0,58)	1,99 (±0,53)	2,08 ^b (±0,53)
28	2,43 (±0,33)	2,87 (±0,74)	2,31 (±0,56)	2,44 (±0,56)	2,48 ^a (±0,56)
Média	1,57 (±0,54)	1,78 (±0,68)	1,74 (±0,62)	1,65 (±0,63)	1,69 (±0,62)

Notas: * Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferenças ($P < 0,05$) entre os momentos.

Momento -20: 20 dias antes do parto e primeira dose; Momento -10: 10 dias antes do parto e segunda dose; Momento 0: dia do parto; Momento 7: 1 semana após o parto; Momento 14: 2 semanas após o parto; Momento 28: 4 semanas após o parto.

Gráfico 6 – Valores médios e respectivos desvios padrão da concentração sérica de colesterol (mmol/L) de vacas no período de transição – São Paulo, 2013

Notas: Momento -20: 20 dias antes do parto e primeira dose; Momento -10: 10 dias antes do parto e segunda dose; Momento 0: dia do parto; Momento 7: 1 semana após o parto; Momento 14: 2 semanas após o parto; Momento 28: 4 semanas após o parto.

5.9 Atividade sérica de aspartato aminotransferase (AST)

A atividade sérica da enzima AST apresentou apenas efeito do momento ($P=0,001$) (Tabela 9 e Gráfico 7).

Tabela 9 – Valores médios e respectivos desvios padrão da atividade sérica de AST (U/L a 30°C) de vacas multíparas e primíparas tratadas e não com vitamina ADE no período de transição – São Paulo - 2010

TRATAMENTOS					
	Primíparas		Multíparas		
Momento	Controle	ADE	Controle	ADE	Média
-20	29,98 (±2,01)	47,04 (±19,14)	39,46 (±7,25)	34,78 (±9,55)	36,86 ^d (±11,86)
-10	30,37 (±4,77)	35,51 (±5,42)	37,17 (±6,73)	34,78 (±7,87)	34,62 ^d (±6,62)
0	45,71 (±6,71)	53,23 (±12,16)	47,56 (±5,20)	48,64 (±10,97)	48,80 ^{bc} (±9,06)
7	59,20 (±10,46)	58,38 (±12,02)	57,39 (±5,54)	72,64 (±31,57)	62,02 ^a (±18,31)
14	52,32 (±9,33)	50,41 (±7,43)	58,35 (±7,25)	52,76 (±11,40)	53,59 ^{ab} (±9,02)
28	42,78 (±6,23)	51,51 (±13,05)	49,64 (±6,86)	44,37 (±6,94)	47,15 ^c (±8,85)
Média	44,25 (±12,97)	49,75 (±13,38)	47,59 (±10,59)	47,90 (±19,74)	47,37 (±14,58)

Notas: * Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferenças (P<0,05) entre os momentos.

Momento -20: 20 dias antes do parto e primeira dose; Momento -10: 10 dias antes do parto e segunda dose; Momento 0: dia do parto; Momento 7: 1 semana após o parto; Momento 14: 2 semanas após o parto; Momento 28: 4 semanas após o parto.

Gráfico 7 – Valores médios e respectivos desvios padrão da atividade sérica de AST (U/L a 30°C) de vacas no período de transição – São Paulo - 2010

Notas: Momento -20: 20 dias antes do parto e primeira dose; Momento -10: 10 dias antes do parto e segunda dose; Momento 0: dia do parto; Momento 7: 1 semana após o parto; Momento 14: 2 semanas após o parto; Momento 28: 4 semanas após o parto.

5.10. Atividade sérica de gamaglutamil transferase (GGT)

A atividade sérica de GGT foi maior no grupo das vacas multíparas do que no grupo das primíparas, caracterizando o efeito do número de partos ($P=0,005$) (Gráfico 8), também houve efeito do momento ($P=0,0335$) (Tabela 10).

Tabela 10 - Valores médios e respectivos desvios padrão da atividade sérica de GGT (U/L a 30°C) de vacas multíparas e primíparas tratadas e não com vitamina ADE no período de transição – São Paulo - 2010

TRATAMENTOS					
	Primíparas		Multíparas		
Momento	Controle	ADE	Controle	ADE	Média
-20	9,35 (±1,97)	10,27 (±3,50)	17,25 (±3,94)	16,31 (±7,19)	13,79 ^b (±5,74)
-10	10,43 (±4,81)	11,31 (±2,08)	17,15 (±3,05)	17,34 (±6,13)	14,47 ^{ab} (±5,26)
0	17,42 (±10,42)	12,77 (±5,57)	16,94 (±3,14)	16,09 (±6,88)	15,84 ^{ab} (±6,52)
7	14,08 (±7,60)	13,48 (±5,10)	16,98 (±3,88)	19,79 (±9,57)	16,17 ^{ab} (±7,08)
14	14,23 (±4,52)	14,49 (±2,57)	16,48 (±3,99)	19,66 (±6,64)	16,16 ^a (±4,89)
28	14,45 (±4,43)	12,15 (±2,40)	16,63 (±3,35)	16,51 (±3,59)	15,09 ^{ab} (±3,80)
Média	13,36 (±6,32)	12,49 (±3,84)	16,91 (±3,38)	17,57 (±6,69)	15,27 (±5,64)

Notas: * Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferenças ($P<0,05$) entre os momentos.

Momento -20: 20 dias antes do parto e primeira dose; Momento -10: 10 dias antes do parto e segunda dose; Momento 0: dia do parto; Momento 7: 1 semana após o parto; Momento 14: 2 semanas após o parto; Momento 28: 4 semanas após o parto.

Gráfico 8 - Valores médios e respectivos desvios padrão da atividade sérica de GGT (U/L a 30°C) de vacas multíparas e primíparas no período de transição – São Paulo, - 2010

Notas: Momento -20: 20 dias antes do parto e primeira dose; Momento -10: 10 dias antes do parto e segunda dose; Momento 0: dia do parto; Momento 7: 1 semana após o parto; Momento 14: 2 semanas após o parto; Momento 28: 4 semanas após o parto.

5.11 Atividade sérica de creatinoquinase (CK)

A atividade de CK foi maior no parto e a partir deste até o final do experimento ($P < 0,0001$) (Tabelas 11 e Gráficos 9).

Tabela 11 – Valores de média e desvio padrão da atividade sérica de CK (U/L a 30°C) de vacas multíparas e primíparas tratadas e não com vitamina ADE no período de transição – São Paulo - 2010

TRATAMENTOS					
	Primíparas		Multíparas		
Momento	Controle	ADE	Controle	ADE	Média
-20	75,21 (±27,19)	74,27 (±31,31)	51,20 (±6,21)	56,85 (±16,87)	63,34 ^b (±23,00)
-10	54,62 (±20,21)	63,72 (±12,93)	63,46 (±22,71)	61,06 (±25,75)	60,81 ^b (±20,71)
0	110,58 (±56,95)	166,81 (±69,29)	85,79 (±12,52)	135,39 (±94,73)	122,88 ^a (±68,77)
7	88,00 (±31,27)	155,77 (±110,53)	127,43 (±97,09)	105,02 (±71,42)	108,84 ^a (±79,27)
14	98,63 (±38,29)	79,24 (±16,67)	79,91 (±15,67)	98,47 (±49,94)	89,39 ^a (±33,26)
28	97,82 (±51,61)	125,93 (±30,19)	85,52 (±16,52)	87,00 (±22,18)	98,21 ^a (±34,48)
Média	87,49 (±40,98)	106,06 (±65,26)	82,60 (±46,46)	90,46 (±58,59)	91,15 (±53,69)

Notas: * Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferenças ($P < 0,05$) entre os momentos.

Momento -20: 20 dias antes do parto e primeira dose; Momento -10: 10 dias antes do parto e segunda dose; Momento 0: dia do parto; Momento 7: 1 semana após o parto; Momento 14: 2 semanas após o parto; Momento 28: 4 semanas após o parto.

Gráfico 9 – Valores médios e respectivos desvios padrão da atividade sérica de CK (U/L a 30°C) de vacas no período de transição – São Paulo - 2010

Notas: Momento -20: 20 dias antes do parto e primeira dose; Momento -10: 10 dias antes do parto e segunda dose; Momento 0: dia do parto; Momento 7: 1 semana após o parto; Momento 14: 2 semanas após o parto; Momento 28: 4 semanas após o parto.

6 DISCUSSÃO

A divisão dos grupos em fatorial 2 X 2 (tratado e controle / múltiparas e primíparas), possibilitou a avaliação da administração intramuscular das vitaminas ADE em relação aos 4 tratamentos. Desta forma, observou-se o comportamento das variáveis bioquímicas (AST, GGT, CK, glicose, BHB, AGNE e colesterol) e do metabolismo oxidativo (SOD, GSH, HRFP e MDA), frente ao efeito da administração das vitaminas ADE, efeito do número de partos, bem como o efeito do parto.

Em relação ao status oxidativo houve diferença na variável HRFP quando comparada as vacas que receberam as vitaminas ADE e as do grupo controle. Estas últimas apresentaram maior habilidade em redizer o ferro plasmático que as suplementadas, o que difere de alguns estudos encontrados na literatura.

Chaterjee et al. (2003) estudando o efeito da suplementação oral de vitamina E (1.000UI) no período periparto de vacas, iniciaram a suplementação vitamínica aos 0, 15, 30 e 60 dias antes do parto mantendo-a até o final do primeiro mês de lactação. Os autores não observaram influência da suplementação com vitamina E na concentração de HRFP. Porém observaram correlação positiva da atividade de HRFP com as concentrações de vitamina E. Estes dados contradizem com o presente estudo onde os animais suplementados com vitaminas ADE apresentaram menor atividade de HRFP que os do grupo controle ($P=0,0345$), além disso, a HRFP aumentou no parto enquanto no estudo citado o comportamento foi o oposto ($P<0,0001$). Gáal et al. (2006) observaram redução de 20% nos valores de HRFP no momento do parto de vacas holandesas, não obtendo diferença nos momentos pré e pós-parto. Os autores encontraram valores de HRFP no momento do parto foram em média 400 $\mu\text{mol/L}$ e no pré e pós-parto os valores médios foram 500 $\mu\text{mol/L}$. Estes mesmos autores observaram valores de SOD 11% maior no momento do parto e, semelhante ao presente estudo, não foi verificado qualquer alteração nos valores de MDA.

A concentração inicial de vitamina E no plasma dos animais no estudo de Chaterjee et al. (2003) estava na faixa de 2,4 $\mu\text{g/mL}$ duas semanas antes do parto e 1,9 $\mu\text{g/mL}$ aos 21 dias pós-parto nas vacas não suplementadas com vitamina E, e os valores médios de HRFP eram de 797 $\mu\text{mol/L}$ duas semanas antes do parto e 844 $\mu\text{mol/L}$ 21 dias pós-parto, sendo a menor concentração detectada no dia do parto

680 $\mu\text{mol/L}$. Vale ressaltar que essas vacas do estudo de Chaterjee et al. (2003) receberam dieta de alta qualidade a base de forragem de trevo (*Trifolium alexandrium* L.), rico em β -caroteno. O que permitiu inferir que o status de carotenoide influencia mais a HRFP que a própria vitamina E.

Wullepit et al. (2009) trabalharam com 80 vacas holandesas primíparas avaliando o status oxidativo durante o período de transição e a influência do número de ordenhas, densidade energética da dieta e produção (baixa ou alta). Houve efeito significativo do parto para HRFP, vitamina E, GSH-Px e SOD, o que indica mudanças no estado oxidativo plasmático em torno deste evento. A concentração de vitamina E no plasma aumentou de 3,48 $\mu\text{g/mL}$ duas semanas antes do parto para 4,76 $\mu\text{g/mL}$ na quarta semana pós parto. Da mesma forma, o status antioxidante plasmático, considerado por meio dos valores de HRFP, foi mensurado somente 2 semanas antes do parto (213 $\mu\text{mol/L}$) e 4 semanas após o parto (238 $\mu\text{mol/L}$). Nestes mesmos momentos, o comportamento desta variável foi semelhante ao do presente estudo, tanto para as primíparas quanto para as múltiparas, onde a HRFP foi menor nos tempos -20 e -10 dias antes do parto e permaneceu elevada até o final do estudo (28 dias pós parto). Porém Wullepit et al (2009) não fizeram análises intermediárias na proximidade do parto, impedindo a comparação neste período ainda crítico.

Apesar da concentração de vitamina E ser menor no experimento de Chaterjee et al. (2003) onde houve a suplementação com vitamina E, que no de Wullepit et al. (2009), os valores de HRFP do grupo não suplementado do primeiro trabalho, estavam três vezes maiores que as do segundo e também que as do presente estudo, o que nos permite inferir que o retinol oriundo da dieta no estudo de Chaterjee et al (2003) pode ter influenciado nestes valores, fazendo com que os animais utilizados no experimento estivessem com alta atividade de HRFP desde o início.

A concentração de vitamina E não foi determinada no presente estudo, sendo que os valores de HRFP foram de 265 e 321 $\mu\text{mol/L}$ duas semanas antes e quatro semanas após o parto, ou seja valores muito próximos ao de Wullepit et al. (2009), que não utilizaram nenhuma suplementação vitamínica.

Uma possível explicação para esclarecer o porquê do grupo suplementado apresentar menor HRFP que o grupo controle, pode ser baseada no estudo de Bouwstra et al. (2010), onde os autores concluíram que embora se considere a

suplementação com vitaminas um procedimento seguro, se o animal não apresentar concentração suficiente de substâncias que compõe o sistema de regeneração da vitamina E (VEBs), da qual fazem parte a GSH, vitamina C, coenzima Q10 e a GSH-Px, esta suplementação muito provavelmente aumentará o estresse oxidativo e, portanto a vitamina poderá causar danos ao invés de benefícios para a saúde do animal. Esses autores apontam a necessidade da determinação do status antioxidante, não necessariamente da vitamina E, antes de se optar por um programa de suplementação. Portanto pode-se supor que a suplementação com as vitaminas ADE, em relação às vacas controle, reduziu a concentração de HRFP. O que vai de encontro com o sugerido anteriormente por LeBlanc et al (2002), que devido aos elevados custos com a determinação da concentração de vitamina E no plasma dos animais, frente ao baixo custo da vitamina, deve-se implementar a suplementação das vacas duas semanas antes do parto.

A peroxidação lipídica é um fenômeno complexo que envolve a geração de metabólitos, entre eles o malondialdeído (MDA). Este é um dos produtos finais de baixo peso molecular formado durante a decomposição induzida por radicais de ácido graxo polinsaturados (JANERO, 1990). Bouwstra et al. (2010) constataram maiores teores plasmáticos de MDA no parto e no início da lactação sugerindo que nas primeiras semanas após o parto o organismo apresenta maior produção de EROs que causam a peroxidação lipídica, devido à intensidade das mudanças metabólicas, sob regulação endócrina, que ocorrem no início da lactação.

O MDA reage prontamente com o ácido tiobarbitúrico produzindo um pigmento vermelho que pode ser facilmente medido por espectrofotometria na forma de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (JANERO, 1990). Os ensaios de MDA foram criticados por baixa especificidade e formação artefato, uma vez que apenas uma fração do MDA medido é gerado *in vivo*. Além disso, o ensaio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), um método comum usado para medir o MDA, é considerado inadequado, pois os resultados diferem de acordo com as condições de realização do ensaio (HALLIWELI; CHIRICO, 1993). Alguns estudos em vacas leiteiras apresentaram resultados contrastantes não demonstrando quaisquer alterações significativas nas concentrações plasmáticas de MDA durante o período periparto (CASTILLO et al., 2005; CASTILLO et al., 2006), enquanto que em outros estudos MDA ou concentrações de TBARS aumentaram no período periparto (BERNABUCCI et al., 2002; 2005; BOUWSTRA et al., 2008). Esta

discrepância aparente pode também ter sido principalmente devido às grandes variações individuais observadas nas concentrações de MDA obtidas nos estudos de Castillo et al. (2005, 2006) onde houveram elevados desvios padrão nos dados de MDA no momento do parto.

Em Aktas et al. (2011), vacas que receberam vitaminas ADE injetável (4.000.000UI vit A, 600.000UI vit D3 e 400 mg vit E) e foram transportadas por 22h apresentaram menor concentração de MDA frente ao grupo não suplementado. Kamiloglu et al. (2006), verificaram que administração parenteral (IM) de vitamina A (200.000 UI), B-caroteno (8 mg/kg) e a associação destas em ovinos 15 dias antes do parto atenuou o estresse oxidativo induzido pelo parto, demonstrado pela maior concentração de GSH eritrocitária e menores concentrações de MDA plasmático. A redução do MDA no sangue duas semanas após o parto também foi demonstrada por Bouwstra et al. (2008) após a suplementação com vitamina E. Porém, no presente estudo, não houve qualquer diferença de MDA e GSH em relação aos 3 efeitos estudados. Duas questões precisam ser avaliadas quanto a estes resultados, ou os animais não entraram em estresse oxidativo portanto a concentração de MDA se manteve estável, ou então a técnica utilizada para a detecção de MDA, com eficácia demonstrada para caracterizar o estresse oxidativo de grande magnitude como na intoxicação cúprica cumulativa em ovinos (WEIGEL et al., 2010), pode não ter sido eficiente para detectar pequenas variações de concentração deste metabólito ocorridas nas vacas no período de transição.

Bouwstra et al. (2008) demonstraram que em novilhas o efeito da vitamina E sobre a MDA difere entre o sangue, fígado e glândula mamária. Esses autores observaram que a suplementação de vitamina E não impediu o aumento de MDA sanguíneo ao parto, mas notaram que as baixas concentrações sanguíneas de MDA nas vacas suplementadas duas semanas após o parto sugerem que a vitamina E tenha papel na recuperação do estresse oxidativo no pós parto. Observaram também que suplementação de vitamina E reduziu o dano oxidativo no fígado, enquanto que nenhum efeito foi encontrado nas concentrações MDA no leite. Os resultados mostraram que a relação entre o dano oxidativo e vitamina E varia de acordo com o tecido estudado, sangue, fígado, e leite. Isto significa que o estado oxidativo e vitamina E calculada a partir de valores de sangue isoladamente devem ser interpretados com cautela e não podem ser extrapolados para o animal inteiro.

Considerando que vacas múltíparas têm maior produção de leite e maior balanço energético negativo em comparação com vacas primíparas (MEHRZAD et al., 2002; COFFEY et al., 2006). É provável que as primíparas estejam sujeitas a menor carga metabólica no período periparto. Embora Bouswtra et al (2008) com base nas concentrações sanguíneas de MDA aumentadas no parto, observaram que novilhas também entrem em estresse oxidativo neste período.

Ainda em relação ao status oxidativo houve diferença na atividade da SOD quando comparada vacas primíparas e múltíparas.

Neste contexto vale ressaltar que vacas primíparas não são influenciadas pela lactação anterior, normalmente não apresentando histórico de doença metabólica sendo um grupo relativamente mais uniforme em comparação com as vacas múltíparas. Drackley et al. (2005) consideraram que algumas características das vacas primíparas as tornam menos comparáveis com as múltíparas especialmente em relação o pico de produção menos pronunciado nas primíparas. O que vai de encontro com o observado por Castillo et al. (2003) ao compararem os teores de EROs por meio do MDA de vacas com média de produção de 20kg/vaca/dia e de 35 kg/vaca/dia no pico da lactação e constataram maior estresse oxidativo nas de maior produção.

Outra forma de avaliar o metabolismo oxidativo, é por meio das análises de substâncias antioxidantes de forma isolada, como da enzima SOD, que catalisa a transformação do radical superóxido a peróxido de hidrogênio, sendo esta considerada a primeira linha de defesa contra as EROs.

A SOD faz parte dos mecanismos de proteção contra o estresse oxidativo nos eritrócitos. Algumas condições apontam que o aumento na produção de EROs compromete a integridade da membrana dos eritrócitos alterando o sistema antioxidante, refletido em maiores concentrações de algumas substâncias oxidantes. Este fato foi observado por Bernabucci et al. (2002) em trabalho avaliando o estresse térmico em vacas no período de transição. Os autores observaram aumento nas concentrações de TBARs e também, como forma de adaptação, na atividades da SOD e da GPx.

Pathan et al. (2010) trabalhando com búfalas Mehsana, 15 e 30 dias antes e depois do parto observaram maior atividade de SOD no dia do parto e inferiram que neste momento há maior estresse oxidativo que é revertido em duas semanas. Embora o aumento da atividade da SOD após o parto tenha sido observado em

vacas leiteiras (STEFANON et al., 2005;. GAÁL et al., 2006;. COLITTI; STEFANON, 2006), alguns estudos demonstraram que a capacidade antioxidante destas no periparto pode ser insuficiente para contrabalançar o aumento das EROS (BERNABUCCI et al., 2005; CASTILLO et al., 2005).

No presente estudo não foi observado efeito da vitamina e do parto, nem nas concentrações de MDA nem de SOD. Como o MDA é o metabólito final da cadeia oxidativa, o fato de não ter sido observado aumento de sua concentração não significa que não houve aumento da produção de EROs, já que estes últimos podem ter sido formados, porém, devido ao arcabouço antioxidante, podem ter sido neutralizados, evitando a formação do MDA.

Apesar de não ter sido constatado efeito do parto, houve maior atividade da SOD nas vacas primíparas em relação às vacas múltíparas ($P=0,0162$). Dobbelaar, et al. (2010) avaliaram a administração de 3000UI de vitamina E (via oral) em primíparas durante 8 semanas antes do parto até 8 semanas pós-parto e avaliaram as atividades de SOD e de glutathione peroxidase no sangue e no fígado. Os autores não observaram efeito da suplementação na atividade destas enzimas mesmo nos momentos próximos ao parto. Estes dados corroboram com o presente trabalho, onde não foram evidenciados efeitos do parto e da suplementação vitamínica. Os autores sugerem que as primíparas no período de transição vivenciam baixa intensidade de processos oxidativos, devido à baixa produção de leite esperada atribuída também ao baixo consumo de matéria seca.

Alguns artigos da literatura comparam o metabolismo oxidativo em relação à idade. Ryan et al. (2008), estudando roedores de diferentes idades, observaram que os mais velhos apresentaram maior estresse oxidativo que os jovens, devido às maiores concentrações de EROs e de lesões oxidativas em lipídeos e DNA (malondialdeído e 8-OHdG). Ambos os grupos foram submetidos a quatro semanas e meia de treinamento físico e constatou-se que este eleva ainda mais a produção de EROs, porém, nos jovens as enzimas CuZnSOD e MnSOD se elevaram conjuntamente protegendo o organismo de lesões oxidativas, já nos animais mais velhos elas não se modificaram. Os autores concluíram que o envelhecimento reduziu a capacidade de adaptação dos músculos ao aumento de substâncias oxidantes causado pelo exercício físico. Portanto, tendo em vista os resultados obtidos por esses autores, e os obtidos no presente experimento, poder-se-ia inferir que a SOD estivesse diminuída nas vacas múltíparas devido ao envelhecimento que

levaria à maior produção de substâncias reativas que consomem a SOD e/ou por inaptidão do organismo a resposta, que levaria ao aumento ou manutenção do teor de SOD. Vale ressaltar que vacas multíparas do presente estudo não eram consideradas velhas, mas estavam mais próximas do auge de sua vida produtiva, portanto com maior demanda metabólica. As vacas multíparas estavam entre a segunda e terceira lactações, porém, algumas diferenças apontadas no período periparto tem sido demonstradas ocorrerem em maior proporção nas vacas a partir da quarta lactação (GILBERT et al., 1993, MEHRZAD et al., 2002).

A concentração plasmática de glicose apresentou comportamento semelhante ao da SOD em relação ao número de partos, porém também sofreu influência do parto. A glicemia das primíparas foi maior que nas multíparas ($P=0,001$). É sabido que vacas leiteiras no pós-parto entram em balanço energético negativo (BEN) proporcionalmente à sua produção leiteira, sendo que animais mais produtivos têm maior potencial para apresentar alterações metabólicas, decorrente da importante lipólise (DRACKLEY, 2002), consequentemente aumentando os teores plasmáticos de AGNE e BHB e diminuindo a concentração de glicose plasmática (DANN et al., 2005; ODENSTEN et al., 2005). Estes dados corroboram com o presente estudo, onde as vacas multíparas, com maior produção de leite e maior balanço energético negativo, apresentaram menor concentração de glicose que as vacas primíparas. A relação negativa de glicose e BHB de $-0,316$ ($P<0,0001$) também demonstrou este mesmo perfil.

Avaliando a amplitude de glicemia considerada normal por Kaneko (1997) para a espécie bovina (2,5 a 4,16 mmol/L), foi constatado que esta permaneceu dentro da faixa de normalidade nas primíparas e sempre abaixo nas multíparas. Porém se for considerada a estabelecida por Payne e Payne, (1987), de 2,0 a 3,0 mmol/L, tanto as multíparas quanto as primíparas ficaram dentro da normalidade na maior parte do período. As primíparas, apenas no momento do parto apresentaram glicemia pouco acima desta faixa e as multíparas estas apresentaram concentração de glicose levemente abaixo da faixa sete e 14 dias pós-parto.

A marca do período de transição de vacas leiteiras é a mudança drástica na demanda de nutrientes para atender às exigências de glicose, energia, aminoácidos, e cálcio da glândula mamária principalmente a partir do parto. Estimativas da demanda de nutrientes pelo útero gravídico e da glândula mamária entre 250 dias de

gestação e quatro dias após o parto indicam aumento de aproximadamente três vezes a demanda por glicose, duas vezes por aminoácidos, e de aproximadamente cinco vezes por ácidos graxos (BELL, 1995). Portanto, tendo em vista os resultados apresentados por esses autores, e os obtidos no presente experimento, pode-se inferir que a concentração de glicose das vacas multíparas foi menor devido à elevada demanda energética, mais especificamente por glicose, destes animais.

A glicose possui papel central no metabolismo da glândula mamária. Este metabólito pode ser utilizado por três vias, na síntese de lactose; formação de triose-fosfato por meio da via glicolítica; e conversão da 6-fosfogluconato através da via pentose-fosfato. Essas vias geram precursores imediatos e cofatores para a síntese de componentes do leite. A glicemia nos ruminantes é menor do que nos animais monogástricos. Devido aos baixos teores de glicose e o direcionamento do acetato para a produção de energia, esses animais desenvolveram mecanismos poupadores de glicose em diversos tecidos, mais notavelmente na glândula mamária, para evitar hipoglicemia sob condições de grande demanda metabólica, como na lactação (SWENSON; REECE, 1996).

A adaptação homeorrética primária do metabolismo da glicose para a lactação é o aumento concomitante da gluconeogênese hepática (REYNOLDS et al., 2003) e a diminuição da oxidação da glicose pelos tecidos periféricos (BENNINK et al., 1972), para uso direto pela glândula mamaria. Este período é representado portanto por aumento no metabolismo da vaca e, nestes casos normalmente há aumento na produção de EROs não necessariamente acompanhado de estresse oxidativo. Neste sentido, Merlo et al. (2008), observaram concentrações plasmáticas de EROs e glicose aumentadas no pós-parto de vacas leiteiras, sendo que esta última aumentou gradativamente, sugerindo a recuperação do BEN. O BEN decorre de fatores fisiológicos associados à diminuição da ingestão de matéria seca, desenvolvimento do úbere e crescimento do feto, que ocorrem nessa fase, normalmente diminuindo a quantidade de energia circulante (EL-SHERIF; ASSAD, 2001).

No presente estudo foi observado, ao final do experimento, que a concentração de glicose permaneceu abaixo da concentração nos momentos que antecederam o parto. Duas leituras podem ser feitas a partir deste fato, a primeira seria a permanência do BEN até o final do experimento (28 dias pós-parto), mas também pode ser decorrente da inversão da produção de progesterona em estrogênio, que

se inicia 3 a 4 semanas antes do parto na vaca em decorrência da produção de cortisol fetal (SWENSON; REECE, 1996), o que aumentaria a glicemia neste período.

Paiva et al. (2006) encontraram aumento de cortisol no momento do parto de vacas holandesas, sendo que 24 horas após o parto, as concentrações de cortisol retornaram aos valores registrados antes do parto. Outros autores também observaram aumento nas concentrações de cortisol em vacas no momento do parto (HUDSON et al., 1975; AURICH et al., 1993). Essa elevação provavelmente é consequência da lactogênese e início da lactação, quando há elevação da prolactina, estrógeno, somatotropina e cortisol circulantes, que reduzem a responsividade e a sensibilidade à insulina. Este quadro de “resistência” à insulina leva ao aumento da gliconeogênese hepática, redução da captação de glicose pela musculatura e tecido adiposo, redução da lipogênese e da síntese de proteína e aumento da degradação de proteína muscular com consequente liberação de aminoácidos (BELL; BAUMAN, 1997).

Outro fator influenciador da glicemia nos bovinos é a idade, sendo que os teores diminuem significativamente com o crescimento do animal (BORGES, 2008) e, segundo Souza et al. (1999), se estabilizam aos 48 meses de idade. As vacas primíparas do presente estudo estavam, em média, com 24 meses, e as multíparas se encontravam entre 36 e 48 meses, o que portanto, pode também ter contribuído para a diferença observada. Santos (2008) trabalhando com vacas holandesas no período seco e durante toda lactação também encontrou maiores concentrações de glicose nas vacas primíparas.

Vale ressaltar que apesar da maior concentração de glicose no presente estudo ter sido encontrada no momento do parto ($P < 0,0001$), ela não foi influenciada pela suplementação com complexo vitamínico. Aktas et al. (2011) estudaram o efeito vitaminas ADE, via parenteral, no transporte de vacas por 22h. Os autores observaram maior glicemia no grupo suplementado e propuseram como justificativa a maior concentração de MDA apresentada pelos animais do grupo controle, pois o estresse oxidativo tem sido implicado na diminuição do metabolismo da glicose e menor sensibilidade à insulina. Portanto, a administração de complexo vitamínico antioxidante, com melhora do sistema de defesa contra EROs, pode levar à melhora no transporte da glicose e na sensibilidade da insulina (FAURE et al., 1997; BARBAGALLO et al., 2009).

Deve-se destacar também que além do efeito isolado do momento e do número de partos, houve interação destes dois fatores ($P < 0,0372$) nos momentos 7, 14 e 28 dias pós-parto para a glicemia.

Além da glicose, o BHB é considerado bom marcador do status energético (SUCUPIRA, 2003). O betahidroxibutirato é um corpo cetônico e a produção destes metabólitos se acentua durante fase final da gestação devido à diminuição do consumo de alimentos (SWENSON; REECE, 1996; HARMEYER; SCHLUMBOHM, 2006). O BHB pode ter duas origens, uma é pela dieta, após a fermentação ruminal em ácido butírico que é metabolizado em BHB na parede ruminal e a outra é decorrente do consumo insuficiente de energia, principalmente no terço final da gestação, a produção de corpos cetônicos ocorre pela via hepática (HARMEYER; SCHLUMBOHM, 2006). BHB e demais corpos cetônicos (acetoacetato e acetona), mostram aumentos relativamente pequenos em balanço negativo moderado, mas aumentam consideravelmente quando o BEN torna-se severo (GONZALEZ, 2000).

Dentre todas as variáveis consideradas neste estudo, a única que apresentou interação, embora somente aos 14 dias de lactação, entre os três fatores estudados foi o BHB ($P = 0,0292$). Este foi influenciado pelo número de partos, onde maiores concentrações foram encontradas no grupo das vacas multíparas que no grupo das primíparas ($P = 0,0012$), provavelmente devido à maior produção de leite e maior balanço energético negativo das multíparas em relação às primíparas (MEHRZAD et al., 2002; COFFEY et al., 2006), que possivelmente tiveram menor demanda metabólica no período periparto.

Normalmente o BHB está presente no sangue e pode ser utilizado como fonte de energia, sendo sua concentração o resultado do equilíbrio entre a produção e a utilização pelos tecidos periféricos (RADOSTITS et al., 2002). Neste contexto é compreensível que, no parto, a concentração de BHB seja menor devido ao maior consumo de energia nos tecidos e diminuição da produção deste metabólito, em virtude da maior demanda energética. Este fato torna compreensível a menor concentração de BHB encontrada no momento do parto no presente estudo ($P < 0,0001$), independente do número de partos.

LeBlanc et al. (2011), consideram as concentrações circulantes de BHB e AGNE indicadores do sucesso na adaptação ao balanço energético negativo no período puerperal. Concentrações elevadas destes metabólitos apontam para o BEN mais intenso. Vários estudos relacionam o BHB na predisposição à doença no

período de transição de vacas leiteiras (LEBLANC et al., 2005, OSPINA et al., 2010a). Em todos os momentos analisados, a concentração de BHB permaneceu acima dos limites considerados normais para a espécie bovina por Kaneko (2002), que se situa entre 0,38 – 0,44 mmol/L. A média geral obtida foi de 0,72 mmol/L, sendo 1,15 mmol/L a concentração mais alta obtida aos 14 dias pós-parto no grupo de multíparas suplementadas. Embora estes valores sejam elevados, ao considerarmos a amplitude proposta por Kaneko (2002), eles ainda são inferiores aos ponderados por LeBlanc et al. (2010), para a cetose inaparente, entre 1,2 e 1,4 mmol/L.

Interessante ressaltar a relação negativa obtida entre os teores de glicose e BHB ($r=-0,316$; $P<0,0001$), onde se observou concentração menor de BHB e maior média geral de glicose no parto (0,55 mmol/L X 2,93 mmol/L, respectivamente) e maior de BHB e menor de glicose aos 14 dias do parto, neste último momento, mais especificamente para as multíparas suplementadas (1,15 mmol/L X 1,65 mmol/L, respectivamente). Diferente do esperado, não foi encontrada relação entre o BHB e o AGNE ($P=0,2483$), mas existiu relação, embora fraca, positiva entre AGNE e glicose ($r=0,170$, $P=0,0202$), isso nos permite inferir que o BHB não foi proveniente do metabolismo de AGNE.

Maiores concentrações de AGNE foram encontradas no parto e sete dias pós-parto ($P<0,0001$). Pode-se inferir que neste momento, em consequência da liberação de cortisol, houve aumento da concentração de AGNE. Embora ainda considerada controversa a ação do cortisol na regulação do metabolismo lipídico, Djurhuus et al. (2002) concluíram que o cortisol é um potente estimulador da lipólise.

Mas não se pode ignorar o efeito do BEN nas concentrações de AGNE, pois os animais apresentaram aumento gradativo desta variável aos 20 e 10 dias antes do parto, culminando neste últimos e reduzindo, também gradativamente, a partir dos 14 dias pós-parto. Classicamente a concentração de AGNE reflete a magnitude da mobilização de depósitos de gordura e espelha o CMS. Na medida em que a entrada de AGNEs no fígado excede a habilidade deste em oxidá-los completamente para produzir energia, aumenta o número de corpos cetônicos, fato aqui não observado, pois não existiu relação entre AGNE e BHB.

Os valores de AGNE estavam entre 137 e 234 $\mu\text{mol/L}$ aos 20 e 10 dias antes do parto, respectivamente e no parto as concentrações médias aumentaram aproximadamente 2,5 vezes (578 $\mu\text{mol/L}$). Embora na literatura existam diferentes

concentrações de AGNE consideradas limítrofes para aumentar o fator de risco de ocorrência de enfermidades metabólicas, o menor valor encontrado foi de 300 $\mu\text{mol/L}$ entre duas e uma semanas antes do parto. Valores superiores a este são associados ao aumento de risco de retenção de placenta, metrite, deslocamento de abomaso e queda na produção (683 kg no período de 305 dias) e aumento nos dias abertos (LEBLANC, 2010). Embora tenha encontrado valores superiores a 300 $\mu\text{mol/L}$, nenhuma vaca estudada apresentou qualquer problema desta ordem durante os 60 dias do estudo.

Para o perfil lipídico ainda se considera, além do AGNE, BHB e glicose, o colesterol, em alguns casos até mesmo os triglicerídeos. O colesterol apresentou relação negativa tanto com o AGNE ($r=-0,263$, $P<0,001$) como com a glicose ($r=-0,294$, $P<0,0001$).

O colesterol é a gordura produzida normalmente pelos animais, 50% se origina no fígado, 15% no intestino e uma parte do restante na pele. Sommer (1975), relata que vacas com baixas concentrações de colesterol no pré-parto, possuíam maior predisposição a problemas reprodutivos no pós-parto. Witter et al. (1987) observaram, em vacas lactantes no Chile, teores de colesterol 27,4% maiores, quando comparados à vacas no período seco, provavelmente devido ao elevado requerimento energético da lactação associado à redução do consumo alimentar, resultando em mobilização lipídica. Estes dados corroboram com o presente estudo, onde a concentração de colesterol aos 28 dias de lactação aumentou 57% em relação ao 20º dia antes do parto.

González e Rocha (1998), ao observarem concentrações elevadas de colesterol em vacas lactantes sugeriram a adoção de valores de referência distintos para as diferentes fases reprodutivas. Os mesmos autores sugerem que esta variável seja utilizada, em vacas de alta produção, como indicador do reflexo da mobilização lipídica para a lactogênese. Neste mesmo contexto, Van Saun (2000) sugere três faixas de valores de referência para esta variável sendo início do período seco $<2,07$ mmol/L; próximo ao parto $<1,94$ mmol/L e início da lactação $<2,58$ mmol/L. Fato este concordante com o observado, onde a menor concentração encontrada foi no momento do parto, sendo que nos momentos seguintes esta concentração demonstrou crescente aumento até o final do experimento (28 dias após o parto).

É importante ressaltar que os teores de colesterol, da mesma forma que os de AGNE, foram influenciados pelo parto ($P < 0,0001$). A determinação destes metabólitos tem sido considerada importante, especialmente quando se estabelece a relação entre estes. Kalaitzakis et al. (2010) trabalhando com a síndrome da vaca caída encontraram que a razão AGNE/colesterol superior a 0,4 seria indicativo da doença do fígado gordo em vacas leiteiras. No presente estudo esta proporção superior a 0,4 foi observada no momento do parto em 69% das múltiparas e 33% nas primíparas, sendo que aos 28 dias a relação estava abaixo de 0,4 em todos os animais. Pode-se inferir que, ao menos no parto provavelmente houve infiltração de gordura no fígado, já que também foram constatadas maiores concentrações de GGT neste momento ($P = 0,0335$). As concentrações de GGT apresentaram-se maiores no grupo das vacas múltiparas do que no grupo das primíparas, caracterizando o efeito do número de partos ($P = 0,005$).

A GGT é uma enzima que indica a colestase hepática e trabalhos mostram sua elevação em casos de fígado com infiltração gordurosa (THAMER et al., 2005; ANDRÉ et al., 2006). Portanto, possivelmente as maiores concentrações de GGT nas vacas múltiparas possam ser explicadas pela maior metabolização de lipídeos pelo fígado, lembrando que vacas múltiparas estão sujeitas a maior atividade metabólica, devido à maior produção leiteira.

Além da maior produção leiteira, a idade também interfere nesta variável. Ramos et al. (2004), em estudo com ovelhas da raça Aragonesa, avaliaram a influência do fator etário e determinaram maiores atividades de AST e GGT em animais mais jovens e maiores teores de GGT em animais em lactação. Quando considerada ovelhas adultas, maior atividade de GGT foi encontrada nos animais em lactação, ressaltando que estes estavam sob maior demanda metabólica.

A aproximação do parto caracterizou o aumento desta enzima, que apresentou maior concentração média aos 14 dias pós-parto. Estes dados contradizem alguns autores brasileiros que defendem que essa enzima não sofre influência da parição (BIRGEL JUNIOR et al., 1996; FEITOSA; BIRGEL, 2000) ou do puerpério (FEITOSA; BIRGEL, 2000). Birgel Junior et al. (2003) demonstraram para fêmeas bovinas da raça Holandesa Preta e Branca, valores de GGT entre 11,00 e 16,87 U/L da gestação ao puerpério, estando esses resultados em concordância com Feitosa; Birgel (2000).

Importante ressaltar que nos dois artigos de Birgel Jr et al. (1996, 2003) foram considerados grupos de animais em diferentes categorias e ao mesmo tempo, portanto, não eram acompanhados os mesmos animais durante um período. Embora o presente estudo tenha observado o efeito do parto ($P=0,0335$), a amplitude dos resultados obtidos foi pequena, estando quase todos os valores dentro da faixa encontrada por Birgel Junior et al. (2003). As concentrações de fato só diferiram entre os momentos -20 dias (13,79 U/L) e 14 dias pós-parto (16,16 U/L).

A atividade da enzima GGT apresentou relações baixas positivas com AGNE ($r=0,197$, $P=0,0081$), indicador da mobilização de depósitos de gordura, e aspartato aminotransferase (AST) ($r=0,293$, $P<0,0001$), enzima cuja elevação de sua atividade nos ruminantes indica lesão hepática, muscular ou cardíaco.

A AST, uma enzima citoplasmática mitocondrial, não é órgão-específica (SILVA et al., 2006), por ser intracelular seu aumento indica lesão celular (PRATT; KAPLAN, 1999; ROCHA, 2010). A meia-vida da enzima na circulação é relativamente longa, suas elevações podem persistir de sete a 10 dias após mionecrose ou lesão hepática por exemplo (CARLSON, 1993). Em ruminantes, a elevação de sua concentração indica envolvimento de hepatócitos ou da musculatura.

De acordo com Reid et al. (1986), a atividade de AST em conjunto com as concentrações de AGNE pode ser utilizada para estimar a extensão da infiltração de gordura no tecido hepático. A relação entre AST e AGNE, como indicador da mobilização de depósitos de gordura, foi de $r=0,374$ ($P<0,0001$). No estudo de (OLIVEIRA, 2010) vacas com valores altos de AST antes do parto (>35 U/L) apresentam maior tendência a sofrer problemas de infertilidade, paresia de parto e retenção de placenta que vacas com baixos valores (<25 U/L). Os altos valores de AST e baixos valores de colesterol e de albumina revelam transtornos na função hepática (OLIVEIRA, 2010). No presente estudo observou-se queda na concentração de colesterol e a atividade de AST sempre acima de 35U/L no momento do parto e no pós-parto, pode-se com isso atribuir o aumento de AST, a indícios de transtornos hepáticos.

Porém não se pode ignorar o potencial envolvimento do esforço muscular decorrente do parto. Neste momento ocorreu elevação da atividade de AST ($P=0,001$) sendo a maior observada sete dias depois. Aos 28 dias a atividade apresentou queda significativa. Estes dados corroboram com Birgel Junior et al. (1996) que demonstraram que o valor médio da AST imediatamente após o parto

era maior do que os valores encontrados entre 96 e 6 horas antes do parto e concluíram que o aumento na atividade da AST estava relacionado ao esforço muscular observado durante o parto, o que provocaria a lise de tecido muscular e liberação desta enzima, que retornaria aos valores observados ao final da gestação ainda no primeiro mês do puerpério. Este fato também foi comprovado por esses autores devido ao aumento dos valores da creatinina quinase nesse mesmo período. A relação positiva existente no presente estudo entre as enzimas AST e CK ($r=0,404$, $P<0,0001$) confirma que o aumento de atividade de AST também foi decorrente do esforço muscular durante o período periparto.

A enzima CK é um indicador sensível e específico da lesão muscular em animais domésticos. Encontrada no músculo cardíaco e esquelético, suas atividades encontram-se aumentadas em casos de rabdomiólise, ou miopatias de esforço, é observada em manifestações musculoesqueléticas associadas a doenças sistêmicas. A meia vida desta enzima na circulação é curta, 4 horas em ruminantes, portanto mesmo em situações de esforço vigoroso suas atividades apresentam-se modestamente elevadas. Mesmo em marcantes elevações, pode retornar aos valores normais dentro de 12 a 24 horas após a agressão muscular, porém não é determinante para o diagnóstico da rabdomiólise. Aumento persistente nas atividades da enzima sugere lesão muscular ativa e contínua (CARLSON, 1993).

A atividade sérica de CK, no presente trabalho, aumentou no parto e permaneceu elevada até 28 dias pós-parto ($P<0,0001$). Vale ressaltar que mesmo no momento de maior atividade da enzima (122,88U/L) os valores estavam dentro da faixa de normalidade 35 - 280 U/L (RADOSTITS et al., 2002).

Bouhroum et al. (2013) avaliaram a diferença do perfil bioquímico entre vacas leiteira de diferentes ECC do parto até 8 semanas depois. Os resultados demonstraram maior valor de CK que variou entre 160 a 195 U/L no parto. Os autores observaram quedas significativas aos 15, 30 e 60 dias pós-parto. Aos 15 dias os valores ainda estavam elevados, sendo que este perfil de alteração também foi observado no presente estudo. Não se pode desconsiderar que a maior atividade da enzima até 28 pós-parto, possa estar relacionada a problemas uterinos. Sattler et al. (2004) concluíram que após a exclusão de lesão muscular e hipocalcemia puerperal, a CK é um parâmetro de triagem para a detecção de endometrite.

Howard, McNeil e McNeil (2011) trabalharam com mioblastos em cultura suplementados ou não com α -tocoferol. Quando os mioblastos foram expostos a

desafio oxidante, na ausência de suplementação com α -tocoferol, houve inibição da reparação de suas membranas, enquanto que os nos suplementados houve reparação das mesmas. Estes autores demonstraram que os miócitos no músculo intacto não podem reparar suas membranas quando expostos a um desafio oxidante, mas que pode haver reparação quando o músculo for suplementado com vitamina E. No trabalho de Nockels, Odde e Craig (1996), os autores demonstraram que novilhas suplementadas com vitamina E tiveram menores atividades de CK após situação de estresse simulada com a administração de ACTH e epinefrina. Diferente do ensaio in vitro e da indução de estresse, a suplementação parenteral com ADE em vacas leiteiras, independente do número de partos, não evitou o aumento da atividade da CK.

7 CONCLUSÕES

O trabalho realizado permitiu concluir que:

- As vacas estavam bem preparadas para responder aos desafios impostos pelo período de transição e, portanto não entram em estresse oxidativo.
- As alterações fisiológicas do parto foram evidenciadas pelas variáveis HRFP, glicose, AGNE, colesterol, AST, GGT e CK.
- Vacas primíparas apresentaram menor desafio metabólico que as vacas múltiparas, demonstrado pelos maiores valores de SOD e glicose, e menores valores de BHB e GGT nas primíparas.
- A suplementação parenteral com vitaminas ADE, na dose utilizada, não foi suficiente para melhorar o status antioxidante das vacas, independente do número de partos.

CAPÍTULO 2 – FUNÇÃO DE POLIMORFONUCLEARES DE VACAS HOLANDESAS PRIMÍPARAS E MULTÍPARAS NO PERÍODO DE TRANSIÇÃO SUPLEMENTADAS COM VITAMINAS ADE

8 INTRODUÇÃO

O período de transição em vacas leiteiras está associado ao aumento da susceptibilidade a infecções, em especial durante as três semanas anteriores e posteriores ao parto. Neste período a vaca entra em balanço energético negativo, reduz o consumo de matéria seca, aumenta a lipólise, perde peso, tem hipocalcemia e apresenta diminuição na resposta imune. Estes fatores, aliados a mudanças dramáticas nos teores de progesterona, estrógenos e cortisol circulantes, contribuem para redução substancial da função imune, especialmente de neutrófilos. Estas células são a principal forma de defesa do útero. A **redução na imunidade inata** pelos neutrófilos e a menor migração destes associados à menor atividade fagocitária e oxidativa, aumentam o risco de retenção de placenta, metrite e endometrite (LEBLANC, 2010).

Os neutrófilos estão ativamente envolvidos na ingestão e morte intracelular de microrganismos invasores principalmente através da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs) (MEHRZAD et al., 2004). Assim, a avaliação da atividade fagocítica e da explosão respiratória (do inglês: *respiratory burst*), pode dar informações valiosas sobre a função das células imunes (MENGE et al., 1998; KAMPEN et al., 2004).

Dentre os fatores relacionados à alteração da resposta imune inata pode-se citar o estresse oxidativo, decorrente do aumento da demanda metabólica em função da lactação e do crescimento fetal, que leva ao aumento da produção de EROs podendo exceder a capacidade antioxidante do organismo (SPEARS; WEISS, 2008; SORDILLO; AITKEN, 2009). As EROs podem levar à peroxidação lipídica ocasionando danos celulares e teciduais. As células envolvidas na resposta imune

podem ser afetadas devido à grande presença de ácidos graxos poli-insaturados em suas membranas que são susceptíveis a peroxidação lipídica.

Além da deficiência de energia, outras deficiências nutricionais, como as de vitaminas têm sido constantemente associadas ao estado de imunossupressão (GOFF, 2006). A ingestão da vitamina A, E e outros nutrientes essenciais ao funcionamento do sistema imunológico está diminuída com a redução do consumo da matéria seca durante o período seco (GOFF; HORST, 1997). Associado a isso, nos sistemas de produção leiteira utiliza-se forragem conservada e alimentos concentrados em alta proporção. O conteúdo de vitamina E na forragem é afetado pelo estágio de maturação no momento da colheita e pelo tempo do corte até a desidratação. As perdas na estocagem podem atingir 50% em um mês. As dietas de rebanhos confinados são sempre dependentes de forragens ensiladas como fonte de volumoso, sendo que estas contêm somente de um quinto a um sexto da quantidade de vitamina E presente nas forragens frescas cortadas no estado vegetativo (MCDOWELL et al., 1996).

Considerando que vacas de alta produção são criadas em condições intensivas com dietas à base de silagem de milho e concentrado, espera-se que estes animais apresentem baixo status antioxidante e possível comprometimento da resposta imune.

Neste contexto, pretende-se estudar alguns aspectos da resposta imune de vacas multíparas e primíparas no período de transição, suplementadas e não com vitaminas ADE por via parenteral.

9 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 32 vacas holandesas, híginas, no último mês de gestação, com média de produção de 30 kg de leite/dia mantidas em sua fazenda de origem, em Pilar do Sul no Estado de São Paulo. Todas as vacas compunham o mesmo lote e foram submetidas a manejo e dietas idênticos (Figura 3).

Esses animais do presente estudo foram alimentados com silagem de milho e concentrado a base de farelo de soja, farelo de milho, resíduo de cervejaria, polpa cítrica, ureia e núcleo mineral (Bovigold® e Lactobovi®), sendo a relação concentrado/volumoso de 50:50. A alimentação das vacas seguiu os critérios de arraçãoamento, divisão em três tratos diários, após cada uma das ordenhas diárias, em linha de cocho individual e a divisão dos lotes em lactação foi feita de acordo com a ordem de partos (primíparas e múltíparas).

Figura 3: Vacas holandesas alojadas no free-stall.

O delineamento foi de blocos casualizados com arranjo fatorial 2x2, foram considerados dois níveis de parto (múltíparas ou primíparas) e dois tratamentos (vitamina ADE ou solução fisiológica). As vacas foram distribuídas aleatoriamente por sorteio, sendo que a composição final do Grupo Controle foi de nove múltíparas e oito primíparas e do Grupo Tratado foi de oito múltíparas e sete primíparas.

O grupo tratado recebeu duas doses da associação vitamínica ADE (270.000 UI vitamina A, 80.000 UI vitamina D e 80 mg vitamina E/mL) na dose de 1mL/50 kg de peso vivo pela via intramuscular profunda, aos 20 e 10 dias antes do parto. Nestes mesmos momentos e pela mesma via de aplicação o grupo controle recebeu 1mL de solução fisiológica estéril/50 kg de Peso Vivo para mimetizar o efeito do estresse causado pela injeção e manipulação do animal.

Em média os animais estavam com 600 kg de peso vivo, ou seja, cada animal do grupo tratado recebeu 12 mL do produto sendo 3.240.000 UI de Vitamina A, 960.000 UI de vitamina D e 960 mg de vitamina E, por aplicação.

Aos -20d;-10d; 0d (até 24 horas deste); 7d; 14d; 28 dias do parto foram colhidas amostras de sangue para posterior realização dos ensaios de produção intracelular de EROs e de fagocitose.

Os ensaios para a avaliação da fagocitose de *S. aureus* conjugadas ao iodeto de propídio e produção intracelular de EROs da população de leucócitos polimorfonucleares (PMN) foram realizados conforme proposto por Hasui et al. (1989). A figura 4 ilustra o esquema de atividades de acordo com os momentos experimentais.

Figura 4 – Atividades e respectivos momentos experimentais.

Ao final de cada coleta todas as amostras foram conduzidas ao Laboratório de Imunodiagnóstico do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para processamento dentro de no máximo 6 horas.

A imunidade foi avaliada pela produção intracelular de EROs por leucócitos PMN circulantes, frente a estímulo *in vitro* com forbol 12-miristato 13-acetato (PMA),

lipopolissacarídeos (LPS) de *Escherichia coli* e após fagocitose de *Staphylococcus aureus* conjugados ao iodeto de propídio (Sa-PI), momento em que também foi avaliada a capacidade fagocítica.

Os reagentes utilizados foram:

- **LPS** – lipopolissacarídeos de *Escherichia coli* – cepa 055:b5 (SigmaTM, St. Louis, MO; n.º. cat. L-3129) – utilizado no ensaio com estímulo *in vitro* para produção de EROs.
- **PMA** – 12-miristato 13-acetato de forbol (*Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*) (SigmaTM, St. Louis, MO; n.º. cat. P8139) – utilizado no ensaio com estímulo *in vitro* para produção de EROs.
- **SaPI** – *Staphylococcus aureus* (cepa ATCC 25923) – a bactéria, conjugada com iodeto de propídio (SigmaTM, St. Louis, MO; n.º. cat. P4170), foi utilizada no ensaio com estímulo por meio de fagocitose *in vitro*, para a produção de EROs, assim como para a avaliação da fagocitose por citometria de fluxo.
- **DCFH-DA** – Diacetato de 2,7-Diclorodihidrofluoresceína (Molecular ProbesTM, Eugene, OR; n.º. cat. C1157) – empregado como reagente para a determinação da produção intracelular de EROs.

As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCaliburTM (Becton Dickinson Immunocytometry SystemTM, San Diego, EUA), onde 20.000 eventos referentes à população de PMN foram adquiridos, conforme suas características de tamanho e granulosidade (Fig.5 e 6), como descrito por Kampen et al. (2004).

A fluorescência verde da DCF foi mensurada à 530 ($\pm$ 30) nm (detector FL1) e a fluorescência vermelha do iodeto de propídio conjugado ao *S. aureus*, à 585 ($\pm$ 42) nm (detector FL2). A quantificação da capacidade de fagocitose, bem como as mensurações da atividade oxidativa por meio da produção de EROs, foram feitas pela intensidade média da fluorescência emitida por célula. A frequência média de fagocitose foi calculada a partir do número de leucócitos PMN emitindo fluorescência do iodeto de propídio, dividido pelo número total de leucócitos PMNs avaliados (no gate).

A análise dos dados foi realizada com o uso do programa FlowJo[®], versão 7.1.3, (Tree StarTM, Inc., Ashland, OR).

Figura. 5. Citograma de leucócitos sanguíneos de vacas leiteiras por citometria de fluxo. Identificação dos leucócitos polimorfonucleares delimitados pelo gate, segundo características de tamanho (FSC-H) e granulosidade (SSC-H), para análise funcional - São Paulo - 2010.

Figura 6. Citograma de leucócitos polimorfonucleares sanguíneos de vacas leiteiras para análise funcional - São Paulo - 2010.

Notas: **A:** População de leucócitos PMNs que produziram espécies reativas de oxigênio (EROs) e **B:** Amostra controle da produção intracelular de EROs (Branco), conforme intensidade de fluorescência do DCF (FL1-H); **C:** População de leucócitos PMNs que realizaram fagocitose e **D:** Amostra controle da Fagocitose (Branco), conforme intensidade de fluorescência do PI (FL2-H).

Os dados foram analisados pelo programa Statistical Analysis System (Versão 9.3, 2010) utilizando o procedimento MIXED, sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos, pelo teste de Shapiro-Wilk, e a busca por “outliers” através do procedimento UNIVARIATE do SAS. Os dados que não atenderam à premissa da normalidade dos resíduos foram submetidos à transformação logarítmica ou pela raiz quadrada. Os dados, transformados ou não, foram submetidos à análise de variância para delineamento inteiramente casualizado com arranjo fatorial de tratamentos (2 x 2), adicionado do fator medidas repetidas no tempo, referentes aos diferentes momentos de coleta. O modelo contemplou, como causas de variação, o efeito de vitamina, efeito de ordem de parto, efeito de momento, bem como efeito de três interações duplas (vitamina*parto, vitamina*momento, parto*momento) e uma interação tripla (vitamina*parto*momento), como fatores fixos.

A análise dos efeitos de vitamina, ordem de parto e sua interação por momento somente foi realizada quando uma das interações entre efeito de momento e esses fatores foi significativa. Para todos os testes avaliados considerou-se o nível de significância de 5%. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética da FMVZ/USP sob protocolo nº 1703/2009.

10 RESULTADOS

10.1 Produção de EROs sem estímulo - burst basal

Não foram observadas diferenças nos grupos experimentais tanto em relação ao tratamento quanto ao número de partos, na intensidade de produção de EROs por leucócitos PMN, sem estímulo *in vitro* (Tabela 12).

Tabela 12 – Valores de médias e respectivos desvios padrão de intensidade de fluorescência do DCF emitida por leucócitos PMN de vacas multíparas e primíparas, tratadas e não com vitamina ADE no período de transição, sem estímulo *in vitro* – São Paulo - 2010

TRATAMENTOS					
Primíparas			Multíparas		
	n = 8	n = 7	n = 9	n = 8	
Momento	Controle	ADE	Controle	ADE	Média
-20	492,28 (±422,69)	454,36 (±327,99)	594,71 (±319,84)	672,15 (±549,13)	572,57 (±402,39)
-10	598,61 (±508,91)	362,82 (±164,16)	460,88 (±282,94)	494,78 (±278,10)	478,94 (±309,14)
0	287,58 (±179,72)	569,40 (±163,55)	389,22 (±281,81)	477,53 (±475,47)	431,08 (±276,24)
7	328,87 (±160,02)	341,99 (±172,76)	226,10 (±91,59)	765,71 (±337,06)	431,06 (±305,40)
14	419,30 (±167,33)	553,12 (±242,19)	396,63 (±149,63)	413,18 (±144,96)	444,08 (±181,42)
28	562,57 (±463,67)	789,11 (±613,81)	851,98 (±683,64)	533,33 (±211,89)	700,56 (±531,76)
Média	444,40 (±330,73)	546,63 (±353,88)	500,33 (±396,57)	563,43 (±352,09)	513,03 (±360,95)

Notas: Momento -20: 20 dias antes do parto e primeira dose; Momento -10: 10 dias antes do parto e segunda dose; Momento 0: dia do parto; Momento 7: 1 semana após o parto; Momento 14: 2 semanas após o parto; Momento 28: 4 semanas após o parto.

10.2 Produção de EROs com estímulo de SAPI

A produção de EROs com estímulo de SAPI apresentou efeito de momento ($P=0,0117$) (Tabela 13), além disso, foram observadas maiores intensidades no grupo das vacas primíparas que das múltiparas, caracterizando o efeito do número de partos ($P=0,0060$) (Gráfico 10).

Tabela 13 - Valores médios e respectivos desvios padrão de produção de EROs com estímulo de SAPI por leucócitos PMN de vacas múltiparas e primíparas tratadas e não com vitamina ADE no período de transição – São Paulo - 2010

TRATAMENTOS					
	Primíparas		Múltiparas		
Momento	Controle	ADE	Controle	ADE	Média
-20	406,38 (±224,70)	773,37 (±274,09)	892,41 (±409,03)	758,10 (±472,66)	730,34 ^{ab} (±405,06)
-10	1285,88 (±1391,16)	755,96 (±495,98)	474,44 (±156,97)	499,08 (±300,38)	689,65 ^b (±699,39)
0	1366,71 (±342,66)	1739,66 (±903,98)	752,58 (±669,00)	1965,53 (±2861,65)	1418,94 ^a (±1388,50)
7	866,17 (±437,08)	970,95 (±202,31)	301,94 (±232,51)	1035,20 (±442,96)	763,33 ^{ab} (±458,85)
14	1295,99 (±670,97)	1338,87 (±825,82)	660,38 (±356,49)	750,25 (±472,12)	1027,65 ^{ab} (±659,47)
28	1561,69 (±1288,48)	1612,89 (±990,13)	813,65 (±563,96)	928,77 (±574,91)	1212,67 ^{ab} (±912,97)
Média	1163,73 (±865,51)	1325,70 (±820,90)	662,37 (±455,79)	936,81 (±1124,64)	988,49 (±864,43)

Notas: * Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferenças ($P<0,05$) entre os momentos. Momento -20: 20 dias antes do parto e primeira dose; Momento -10: 10 dias antes do parto e segunda dose; Momento 0: dia do parto; Momento 7: 1 semana após o parto; Momento 14: 2 semanas após o parto; Momento 28: 4 semanas após o parto.

Gráfico 10 - Valores médios e respectivos desvios padrão de produção de EROs com estímulo de SAPI por leucócitos PMN de vacas múltiparas e primíparas tratadas no período de transição – São Paulo - 2010

Notas: Momento -20: 20 dias antes do parto e primeira dose; Momento -10: 10 dias antes do parto e segunda dose; Momento 0: dia do parto; Momento 7: 1 semana após o parto; Momento 14: 2 semanas após o parto; Momento 28: 4 semanas após o parto.

10.3 Produção de EROs com estímulo de LPS

A produção de EROs com estímulo de LPS foi maior em leucócitos PMN de vacas suplementadas com a associação vitamínica ($P=0,0177$), independente do número de partos dos animais (Tabela 14 , Gráfico 11).

Tabela 14 - Valores médios e respectivos desvios padrão de produção de EROs com estímulo de LPS de vacas multíparas e primíparas tratadas e não com vitamina ADE no período de transição – São Paulo - 2010

TRATAMENTOS					
	Primíparas		Multíparas		
Momento	Controle	ADE	Controle	ADE	Média
-20	383,76 (±187,11)	448,16 (±300,31)	690,30 (±344,61)	883,75 (±418,10)	650,95 (±373,72)
-10	437,44 (±325,24)	420,51 (±196,81)	424,30 (±227,11)	497,48 (±309,31)	449,74 (±258,01)
0	451,71 (±314,86)	541,95 (±167,53)	1150,82 (±1884,98)	1929,64 (±2042,51)	968,32 (±1390,41)
7	314,60 (±101,11)	377,38 (±179,65)	260,18 (±77,75)	723,11 (±295,98)	430,25 (±265,28)
14	416,05 (±161,89)	456,75 (±213,57)	391,54 (±161,81)	476,28 (±218,14)	432,13 (±180,85)
28	630,66 (±397,31)	605,87 (±429,28)	330,12 (±177,05)	483,11 (±285,58)	487,39 (±322,12)
Média	432,01 (±252,29)	492,83 (±255,57)	540,15 (±781,06)	787,09 (±868,55)	571,21 (±652,13)

Notas: Momento -20: 20 dias antes do parto e primeira dose; Momento -10: 10 dias antes do parto e segunda dose; Momento 0: dia do parto; Momento 7: 1 semana após o parto; Momento 14: 2 semanas após o parto; Momento 28: 4 semanas após o parto.

Gráfico 11 - Valores médios e respectivos desvios padrão de produção de EROs com estímulo de LPS por leucócitos PMNs de vacas (multíparas + primíparas) tratadas e não com vitamina ADE no período de transição – São Paulo - 2010

Notas: Momento -20: 20 dias antes do parto e primeira dose; Momento -10: 10 dias antes do parto e segunda dose; Momento 0: dia do parto; Momento 7: 1 semana após o parto; Momento 14: 2 semanas após o parto; Momento 28: 4 semanas após o parto.

10.4 Produção de EROs com estímulo de PMA

Não foram observadas diferenças entre grupos experimentais tanto em relação ao momento como ao tratamento e ao número de partos (Tabela 15).

Tabela 15 - Valores médios e respectivos desvios padrão de produção de EROs com estímulo de PMA por leucócitos PMN de vacas multíparas e primíparas tratadas e não com vitamina ADE no período de transição – São Paulo - 2010

Momento	TRATAMENTOS				Média
	Primíparas		Multíparas		
	Controle	ADE	Controle	ADE	
-20	2328,92 (±2527,84)	2627,00 (±861,31)	3265,87 (±2188,15)	3721,05 (±1486,62)	3117,39 (±1911,41)
-10	1310,00 (±343,33)	1777,95 (±629,28)	3333,84 (±1424,36)	3386,46 (±1598,21)	2696,97 (±1497,02)
0	3844,95 (±2381,82)	3152,62 (±1179,49)	3609,84 (±3128,94)	3657,54 (±3617,29)	3547,78 (±2495,86)
7	1856,56 (±1003,31)	2057,62 (±1732,86)	1106,66 (±901,53)	4180,88 (±2652,96)	2385,49 (±2093,31)
14	1796,40 (±1191,09)	3110,89 (±2168,65)	2514,89 (±2022,29)	2458,56 (±2042,16)	2448,89 (±1833,59)
28	1762,06 (±1491,19)	2570,34 (±2068,40)	3165,12 (±1817,44)	2747,94 (±1282,39)	2606,42 (±1698,83)
Média	2165,71 (±1754,91)	2677,50 (±1615,39)	2892,15 (±2074,84)	3361,87 (±2081,27)	2800,91 (±1945,04)

Notas: Momento -20: 20 dias antes do parto e primeira dose; Momento -10: 10 dias antes do parto e segunda dose; Momento 0: dia do parto; Momento 7: 1 semana após o parto; Momento 14: 2 semanas após o parto; Momento 28: 4 semanas após o parto.

10.5 Frequência de PMN fagocitando SAPI

A frequência de leucócitos PMNs fagocitando SAPI apresentou efeito do momento ($P < 0,0001$) (Tabela 16), além disso, foram observadas frequências maiores nas vacas primíparas que nas multíparas, caracterizando o efeito do número de partos ($P < 0,0001$) (Gráfico 12).

Tabela 16 - Valores médios e respectivos desvios padrão da frequência de PMN fagocitando SAPI em vacas multíparas e primíparas, tratadas e não com vitamina ADE no período de transição – São Paulo - 2010

TRATAMENTOS					
Primíparas			Multíparas		
Momento	Controle	ADE	Controle	ADE	Média
-20	0,57 (±0,09)	0,62 (±0,13)	0,39 (±0,21)	0,32 (±0,22)	0,44 ^{ab} (±0,21)
-10	0,52 (±0,24)	0,52 (±0,38)	0,37 (±0,26)	0,28 (±0,15)	0,40 ^b (±0,26)
0	0,88 (±0,08)	0,64 (±0,13)	0,47 (±0,33)	0,58 (±0,11)	0,64 ^a (±0,24)
7	0,77 (±0,13)	0,62 (±0,32)	0,41 (±0,22)	0,46 (±0,27)	0,54 ^{ab} (±0,25)
14	0,71 (±0,13)	0,69 (±0,26)	0,46 (±0,32)	0,55 (±0,28)	0,60 ^a (±0,26)
28	0,69 (±0,19)	0,60 (±0,13)	0,52 (±0,19)	0,54 (±0,24)	0,58 ^{ab} (±0,19)
Média	0,70 (±0,18)	0,62 (±0,21)	0,44 (±0,25)	0,44 (±0,24)	0,54 (±0,25)

Notas: * Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferenças ($P < 0,05$) entre os momentos.

Momento -20: 20 dias antes do parto e primeira dose; Momento -10: 10 dias antes do parto e segunda dose; Momento 0: dia do parto; Momento 7: 1 semana após o parto; Momento 14: 2 semanas após o parto; Momento 28: 4 semanas após o parto.

Gráfico 12 - Valores médios e respectivos desvios padrão da frequência de PMN fagocitando SAPI em vacas multíparas e primíparas, tratadas no período de transição – São Paulo - 2010

Notas: Momento -20: 20 dias antes do parto e primeira dose; Momento -10: 10 dias antes do parto e segunda dose; Momento 0: dia do parto; Momento 7: 1 semana após o parto; Momento 14: 2 semanas após o parto; Momento 28: 4 semanas após o parto.

10.6 Intensidade de fagocitose por PMNs - intensidade de fluorescência do PI

Não foram observadas diferenças nos grupos experimentais tanto em relação ao tratamento quanto em relação ao momento e ao número de partos (Tabela 17).

Tabela 17 - Valores médios e respectivos desvios padrão da intensidade de fagocitose de vacas multíparas e primíparas, tratadas e não com vitamina ADE no período de transição – São Paulo - 2010

TRATAMENTOS					
Primíparas			Multíparas		
Momento	Controle	ADE	Controle	ADE	Média
-20	26,52 (±15,29)	31,90 (±6,20)	124,07 (±142,61)	43,72 (±33,59)	66,39 (±93,39)
-10	79,95 (±82,96)	27,75 (±16,73)	36,06 (±20,84)	35,67 (±28,17)	43,38 (±43,56)
0	42,78 (±11,22)	46,40 (±29,67)	40,71 (±17,97)	32,63 (±16,18)	41,18 (±19,6)
7	28,61 (±22,65)	23,45 (±3,86)	53,47 (±47,26)	22,59 (±10,21)	34,01 (±30,89)
14	26,18 (±7,53)	29,15 (±11,35)	69,05 (±66,26)	33,46 (±15,46)	40,63 (±39,54)
28	85,01 (±64,46)	66,82 (±64,44)	16,94 (±5,83)	64,53 (±55,69)	55,58 (±55,45)
Média	47,19 (±46,58)	42,11 (±37,33)	57,22 (±74,61)	38,89 (±31,52)	47,11 (±52,50)

Notas: Momento -20: 20 dias antes do parto e primeira dose; Momento -10: 10 dias antes do parto e segunda dose; Momento 0: dia do parto; Momento 7: 1 semana após o parto; Momento 14: 2 semanas após o parto; Momento 28: 4 semanas após o parto.

11 DISCUSSÃO

A divisão dos grupos em fatorial 2 X 2 (tratado e controle / múltiparas e primíparas), possibilitou a avaliação da administração intramuscular das vitaminas ADE também em relação ao número de partos. Desta forma, foi observado o comportamento da função dos leucócitos PMNs, frente ao efeito da administração das vitaminas ADE, efeito do número de partos, bem como o efeito do momento.

Observou-se, no presente trabalho, que a suplementação estabelecida promoveu maior produção de EROs por leucócitos PMN apenas após estímulo *in vitro* com LPS de *E. coli*. No entanto, por outro lado, permitiu também observar que, independente da suplementação, leucócitos PMNs de vacas primíparas responderam melhor ao desafio com *S. aureus* do que leucócitos PMNs de vacas múltiparas, posto que, naquele grupo, uma maior quantidade de leucócitos PMNs realizaram fagocitose de *S. aureus* e, após este estímulo, os leucócitos PMNs de vacas primíparas produziram maior quantidade de EROs. Neste contexto, os resultados observados no presente estudo também demonstraram que o momento em relação ao parto altera a resposta de leucócitos PMN frente ao desafio com *S. aureus*. Verificou-se que, 10 dias antes do parto, houve menor quantidade de leucócitos PMN fagocitando *S. aureus* e que, nesse momento, ocorreu menor produção de EROs induzida por este estímulo. Por sua vez, no dia do parto (momento 0), houve maior quantidade de leucócitos PMN fagocitando *S. aureus*, que se manteve elevada até 14 dias após o parto. Do mesmo modo, no momento 0 ocorreu maior produção de EROs induzida pela fagocitose de *S. aureus*.

Muitos aspectos da imunidade inata e imunidade adquirida dos bovinos estão prejudicados durante o período de lactação, principalmente próximo ao parto. Mais notavelmente, as três semanas antes do parto e as três primeiras semanas de lactação têm sido reconhecidas como um período em que os mecanismos de defesa são alterados drasticamente (SORDILLO, AITKEN, 2009).

O estado imunossupressivo se deve a vários fatores como o estresse oxidativo (SPEARS; WEISS, 2008; SORDILLO; AITKEN, 2009) e as mudanças na flutuação de hormônios reprodutivos e neuroendócrinos, como o cortisol. Ademais, durante o período de transição a demanda por cálcio aumenta, podendo levar à hipocalcemia. Neste ínterim, a redução da concentração de cálcio em células do

sistema imune pode contribuir para o quadro imunossupressivo (HIGUCHI; NAGAHATA, 2000; KIMURA et al., 2006). Preisler et al. (2000) e Weber et al. (2001) sugeriram que, embora as concentrações de cortisol estejam apenas transitoriamente elevadas, a alteração na expressão de receptores de glicocorticóides impulsionada pela mudança de estrogênio e progesterona do parto, pode contribuir para a imunossupressão, durante pelo menos vários dias após o parto.

Embora seja amplamente descrito na literatura maior prejuízo na função dos PMNs no momento do parto, não foi observado a hipossensibilidade a patógenos, porém frente aos estímulos estudados, maior responsividade ficou evidenciada no momento do parto. O presente estudo constatou que uma maior porcentagem de PMN fagocitou *S. aureus* no momento do parto ($P < 0,0001$). Frente a este mesmo estímulo foi também observada maior produção de EROs no dia do parto quando comparado a 10 dias anterior ao parto ($P = 0,0117$).

Sabe-se que a redução da viabilidade dos leucócitos PMNs está relacionada com o prejuízo na capacidade fagocítica e na produção de EROs (MEHRZAD et al., 2004). Paradoxalmente, apesar de leucócitos de vacas imunossuprimidas estarem funcionalmente comprometidos e hipossensíveis a patógenos, uma vez ativados, eles também são hiper-responsivos produzindo mais de citocinas pró-inflamatórias (SORDILLO et al., 1995).

As vacas do presente estudo estavam bem preparadas para responder aos desafios impostos pelo período de transição e, portanto não entraram em estresse oxidativo e consequentemente não demonstraram comprometimento aparente da resposta imune. Neste período experimental não foi observada manifestação clínica de qualquer enfermidade.

Desta forma, no presente estudo não se observou comprometimento aparente do sistema imune durante o período de transição, que poderia implicar na maior susceptibilidade a infecções durante este período, como já descrito por outros autores (CASTILLO et al., 2005; SPEARS; WEISS, 2008, SORDILLO; AITKEN, 2009). Por meio da avaliação *in vitro* da função dos leucócitos PMN, realizada no presente trabalho, não foram observadas diferenças no *burst* basal. Ou seja, não foram verificadas diferenças nos grupos experimentais, em relação ao tratamento, momento ou número de partos, na intensidade de fluorescência obtida após a oxidação, sem estímulo *in vitro*, pelo peróxido de hidrogênio intracelular, do DCFH

em DCF. Não houve aumento da capacidade microbicida dos PMN, sem estímulo, nem para vacas múltíparas nem para as primíparas. As vacas múltíparas do estudo foram selecionadas entre a segunda e terceira lactações, porém, algumas diferenças apontadas, como a função dos PMN no período periparto, demonstraram que esta é afetada em maior proporção em vacas a partir da quarta lactação (GILBERT et al., 1993, MEHRZAD et al., 2002).

A produção de EROs por PMN foi avaliada, também, após a utilização de três diferentes estímulos *in vitro*, PMA, LPS e partículas de *S. aureus* (SAPI).

Embora o PMA tenha sido um estímulo eficiente para a produção de EROs pelo PMN em relação ao *burst* basal, não foram observadas respostas diferentes nesta produção quando considerados a suplementação com vitaminas, número de partos e os momentos. Fato também observado no estudo de Hidiroglou et al. (1997) onde o estímulo com PMA aumentou a produção de H_2O_2 nos leucócitos PMN em relação ao *burst* basal, sem diferir entre vacas suplementadas e não com vitamina E via oral, 1000UI/dia, do período seco até oito semanas pós-parto. Por sua vez, Llamas Moya et al. (2008) mostraram diferenças na produção de EROs nas células do sistema imunológico entre vacas primíparas e múltíparas também utilizando PMA.

O presente estudo não verificou tal diferença, quando da utilização do estímulo por PMA. No entanto, a estimulação com partículas de *S. aureus* levou a maior produção de EROs pelos PMN nas vacas primíparas que nas múltíparas ($P = 0,0060$). Neste contexto, foi observada maior frequência de PMN que fagocitaram *S. aureus* nas vacas primíparas ($P < 0,0001$). Em média, nas múltíparas, 44% dos PMNs estavam fagocitando, sendo que nas primíparas esta frequência média foi de 66%.

Llamas Moya et al. (2008) mostraram diferenças na funcionalidade entre as células do sistema imunológico de vacas leiteiras primíparas e múltíparas, em particular em termos de atividade do *burst* oxidativo. Várias publicações têm relatado comprometimento da função imunológica de vacas múltíparas quando comparadas com primíparas (GILBERT et al., 1993; MEHRZAD et al., 2002). De acordo com Mehrzad et al. (2002), porcentagem maior de PMN e monócitos de vacas primíparas apresentaram atividade oxidativa com estímulo de *E. coli*, em comparação com os de múltíparas. Além disso, o *burst* oxidativo também foi maior em primíparas. Isto pode explicar a maior incidência de doenças infecciosas em vacas múltíparas, em particular durante o período periparto. Vacas múltíparas têm maior produção de leite

e balanço energético negativo mais intenso em comparação com as primíparas (MEHRZAD et al., 2002; COFFEY et al., 2006). Assim, é provável que as primíparas são submetidas a menor desafio metabólico durante o parto.

Importante resultado observado foi a melhora proporcionada pela suplementação das vitaminas ADE no tocante à resposta dos leucócitos PMN frente ao desafio com LPS. Maior produção intracelular de EROs nos leucócitos PMN estimulados por LPS de *E. coli* foi obtida nos animais suplementados quando comparados com o grupo controle ($P = 0,0177$).

Resultados semelhantes foram obtidos por Hogan et al. (1990) que relataram que a suplementação oral com 500UI/dia vitamina E em vacas durante 30 dias, com início na terceira semana de lactação, aumentaram a habilidade bactericida dos neutrófilos. A vitamina E aumentou a lise intracelular de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* por ação dos neutrófilos.

Neste contexto, Politis et al. (1996), comparando o grupo não suplementado com o grupo recebendo suplementação diária de 3000 UI de vitamina E, via oral, durante quatro semanas antes do parto e oito semanas após o parto e, adicionalmente, via parenteral, 5000 UI de vitamina E uma semana antes do parto, observaram aumento da resposta quimiotática dos neutrófilos sanguíneos de 30% duas semanas antes do parto para 83% quatro semanas pós-parto. A suplementação de vitamina E evitou a redução da quimiotaxia dos neutrófilos sanguíneos característica deste período como observado no grupo controle.

Baixas concentrações plasmáticas de vitamina E no parto também foram associadas com redução na atividade de neutrófilos em termos da sua capacidade bactericida (HOGAN et al., 1992). Os autores trabalharam com vacas no período seco suplementando com vitamina E parenteral na dose de 3000UI, 10 e cinco dias antes do parto. Os animais suplementados apresentaram maior atividade de neutrófilos em termos da sua capacidade bactericida. No entanto, nem a intensidade de fagocitose nem a porcentagem de neutrófilos fagocitando bactérias diferiram entre os animais que receberam a vitamina E ou placebo. Os dados de maior capacidade bactericida no *burst basal* contradizem o presente estudo, onde não se verificou melhora na atividade dos leucócitos PMN, sem estímulo *in vitro*, de animais suplementados com as vitaminas ADE, possivelmente devido a diferença de dose e momento de administração. Porém os resultados frente a fagocitose corroboram com o presente estudo, pois não foi observado efeito da suplementação sobre a

porcentagem dos PMN que estavam fagocitando nem sobre a intensidade de fagocitose. Resultados semelhantes foram obtidos por Hogan et al. (1990) que relataram que a suplementação oral com 500UI/dia vitamina E em vacas durante 30 dias com início na terceira semana de lactação, não influenciaram na capacidade fagocitária *in vitro* dos mesmos.

Em trabalho comparando β -caroteno e vitamina A, Ramadan et al. (2000) utilizaram búfalas no período de transição e verificaram maior atividade bactericida e melhora da fagocitose no momento do parto até duas semanas pós-parto nos neutrófilos incubados *in vitro* tanto com vitamina A quanto com β -caroteno. Vale ressaltar que os melhores resultados tanto na capacidade bactericida como na fagocitose foram verificados no grupo suplementado com β -caroteno.

Os dois principais receptores específicos que mediam os mecanismos que operam a produção do EROs são o fragmento C3b1 (receptor do complemento tipo 3, CR3) e o FcR (receptor para o domínio Fc da imunoglobulina). Estes receptores são importantes na sinalização celular, incluindo a ativação da proteína quinase C (PKC), a tirosina quinase (TK) e a concentração intracelular de cálcio, que são cruciais para a produção de EROs em bovinos (HIGUCHI; NAGAHATA, 2000). Assim, a vitamina E e a vitamina A apresentam papel relevante. A vitamina E pode mediar as mudanças na concentração de cálcio pelo CR3 e FcR, enquanto a vitamina A atua no receptor FcR, levando a alterações na concentração de cálcio, e consequentemente produção de EROs (HIGUCHI, NAGAHATA, 2000). Neste contexto, a relação entre a suplementação com vitamina D, quer por seus efeitos diretos (MORA et al., 2008), e/ou associados ao metabolismo do cálcio (KIMURA et al., 2006), podem ter apresentado efeito sinérgico com as demais suplementações sobre a maior capacidade microbicida observada nos animais suplementados que tiveram os PMN estimulados com LPS.

Há ponto a se considerar sobre o estímulo de LPS de *E. coli*, uma bactéria Gram-negativa. Os componentes bacterianos como o lipopolissacarídeo, encontrados na parede celular de bactérias Gram-negativas, representam importantes e potentes estimuladores de secreção celular de várias citocinas e fatores de crescimento via mediada por Receptores Toll-Like. Os receptores Toll-Like, presentes nos macrófagos, nas células dendríticas e nos leucócitos PMNs, são moléculas de superfície, presentes nas células de defesa do hospedeiro, responsáveis pelo reconhecimento de estruturas microbianas e na geração de

sinais, que levam a produção de citocinas pró-inflamatórias essenciais para a ativação das respostas imunes inatas (FERRAZ et al., 2011). A vitamina D ativa atua como molécula de sinalização da resposta imune inata por aumentar a expressão do receptor Toll like (BURKIEVCZ et al., 2012), neste contexto os leucócitos PMNs estimulados com LPS de *E. coli* podem ter sofrido influência do efeito da vitamina D sobre a produção de EROs.

12 CONCLUSÕES

O trabalho realizado permitiu concluir que:

- As vacas permaneceram sadias durante todo período experimental, por isso não se observou diferença no *burst* basal.
- A suplementação parenteral com vitaminas ADE, na dose utilizada, aos 20 e 10 dias antes do parto, aumentou a produção de EROs por leucócitos PMN após estímulo por LPS.
- Vacas primíparas no periparto, independente da suplementação vitamínica, apresentaram maior porcentagem de leucócitos PMN realizando fagocitose de SAPI e maior produção de EROs frente este estímulo.
- O período de transição interferiu tanto na porcentagem de leucócitos PMN que realizam fagocitose de SAPI quanto na produção de EROs frente tal estímulo.

REFERENCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and molecular immunology**. 3. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1997, 494 p.

AEBERHARD, K.; BRUKMAIER, R. M.; KUEPFER, U. Milk yield and composition, nutrition, body conformation traits, body condition scores, fertility and diseases in high-yielding dairy cows – Part 1. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 48, p. 97-110, 2001.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. 4. ed. New York: Garland, 2002, 1616 p.

ALLISON, R. D.; LAVEN R. A. Effect of vitamin E supplementation on the health and fertility of dairy cows: a review. **Veterinary Record**, v. 147, p. 703-708, 2000.

AMMERMAN, C. B. Recent developments in cobalt and copper ruminant nutrition: a review. **Journal of Dairy Science**, v.53, p.1097–1107, 1970.

ANDERSON, D. Antioxidant Defences Against Reactive Oxygen Species Causing Genetic And Other Damage. **Mutation Research**, v. 350, n. 1, p.103-108, 1996.

ANDRÉ, P.; BALKAU, B.; BORN, C.; CHARLES, M. A.; ESCHWÈGE, E. Three-year increase of gamma-glutamyltransferase level and development of type 2 diabetes in middle-aged men and women: the D.E.S.I.R. cohort. **Diabetologia**, v. 49, p. 2599–2603, 2006.

AURICH, J.; DOBRINSKI, I.; HOPPEN, H. Stimulation of release beta-endorphin and oxytocin by prostaglandin F2 alpha in cattle at parturition. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 89, n. 2, p. 605-612, 1993.

AKTAS, M. S.; OZKANLAR, S.; KARAKOC, A.; AKCAY, F.; OZKANLAR, Y. Efficacy of vitamin E + selenium and vitamin A + D + E combinations on oxidative stress induced by long-term transportation in Holstein dairy cows. **Livestock Science**, v. 141, p. 76–79, 2011.

BABIOR, B. The respiratory burst of phagocytes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 73, p. 599–601, 1984.

BALLET, N.; ROBERT, J. C.; WILLIAMS, P. E. V. Vitamins in forages. In: GIVENS, E. O.; AXFORD, R. F. E.; OMED, H. M. (Ed.) **Forage evaluation in ruminant nutrition**. Oxon: CABI Publishing, 2000. p. 399-431.

BALDI, A. Vitamin E in dairy cows. **Livestock Production Science**, v. 98, p. 117–122, 2005.

BARBAGALLO, M.; DOMINGUEZ, L. J.; TAGLIAMONTE, M. R.; RESNICK, L. M.; PAOLISSO, G. Effects of vitamin E and glutathione on glucose metabolism : Role of magnesium. **Hypertension**, v. 34, p. 1002-1006, 1999.

BARGO, F.; MULLER, L. D.; DELAHOY, J. E. Milk response to concentrate supplementation of high producing dairy cows grazing at two pasture allowances. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 1777-1792, 2002.

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

BELL, A. W.; BAUMAN D. E. Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**. v. 2, n. 3, p. 265-278, 1997

BENNINK, M. R.; MELLENBERGER, R. W.; FROBISH, R. A.; BAUMAN, D. E. Glucose oxidation and entry rate as affected by the initiation of lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 55, p. 712, 1972.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The frap assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996.

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

BERNABUCCI, U.; RONCHI, B.; LACETERA, N.; NARDONE, A. Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 9, p. 2173–2179, 2002.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 61, n. 5, p. 882-888, 1963.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BIKE D. D.; SIITERI B. K.; RYZEN E.; HADDAD J. G. Serum protein binding of 1,25-OH)2D: a re-evaluation by direct measurement of free metabolite levels. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.61, p. 969–975, 1985.

BIRGEL JUNIOR, E. H.; GRUNERT, E.; STEFFEN, S. Avaliação do perfil enzimático de bovinos da raça holandesa preta e branca durante as últimas 96 horas de gestação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 24., 1996, Goiânia, GO. **Anais...** 1996. p. 31-32.

BIRGEL JUNIOR, E. H.; NEVES, F. S.; SALVATORE, L. C. A.; MIRANDOLA, R. M. S.; TÁVORA, J. P. F.; BIRGEL, E. H. Avaliação da influência da gestação e do puerpério sobre a função hepática de bovinos da raça holandesa. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, SP, v. 19, n. 2, p. 172-178, 2003.

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.

BORGES, A. **Componentes sanguíneos de bovinos (bos taurus) sadios da raça pantaneira, em diferentes faixas etárias, criados extensivamente**. 2008. 122p, Dissertação - (Mestre em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2008.

BOUHROUM, N.; ZOUAGHI, R.; BENSAHLI, B. Relationship among body condition score, some biochemical parameters and uterine involution in dairy cow. **International Journal of Biosciences**. v..3, n.1, p.1-6, 2013

BOUWSTRA, R. J.; GOSELINK R. M.; DOBBELAAR P.; NIELEN M.; NEWBOLD J. R.; VAN WERVEN T. The relationship between oxidative damage and vitamin E concentration in blood, milk, and liver tissue from vitamin E supplemented and nonsupplemented periparturient heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 977–987, 2008

BOUWSTRA, R. J.; NIELEN, M.; NEWBOLD, J. R.; JANSEN, E. H. J. M.; JELINEK, H. F.; VAN WERVEN, T. Vitamin e supplementation during the dry period in dairy cattle. Part ii: oxidative stress following vitamin e supplementation may increase clinical mastitis incidence postpartum. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 12, p. 5696–5706, 2010.

BRADFORD, A.; ATKINSON, J.; FULLER, N.; RAND, R. P. The effect of vitamin E on the structure of membrane lipid assemblies. **Journal of Lipid Research**, v. 44, p. 1940-1945, 2003.

BRIVIBA, K.; SIES, H. Non-enzymatic antioxidants defence system. In: FREI, B. (Ed.). **Natural antioxidants in human health and disease**. San Diego: Academic Press, 1994. p. 107-128.

BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E. Antioxidant status of dairy cows supplemented prepartum with vitamin e and selenium. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 3087-3095, 1994.

BURKIEVCZ, C. J.; SKARE, T. L.; MALAFAIA, O. Prevalência de deficiência de vitamina D em pacientes com úlceras de perna de etiologia venosa. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.39, n.1, p. 60-63, 2012

CAMERON, R. E. B.; DYK, P. B.; HERDT, T. H.; KANEENE, J. B.; MILLER, R.; BUCHOLTZ, H. F.; LIESMAN, J. S.; VANDEHAAR, M. J.; EMERY, R. S. Dry cow diet, management, and energy balance as risk factors for displaced abomasum in high producing dairy herds. **Journal of Dairy Science**, n. 81, p. 132–139, 1998.

CAMPBELL, M. H.; MILLER, J. K. Effect of supplemental dietary vitamin E and zinc on reproductive performance of dairy cows and heifers fed excess iron. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2693–2699, 1998.

CAMPOS, R.; GONZÁLEZ, F.; COLDEBELLA, A.; LACERDA, L. Indicadores do metabolismo energético no pós-parto de vacas leiteiras de alta produção e sua relação com a composição do leite. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 2, p. 241-249, 2007.

CASTILLO, C.; HERNANDEZ, J.; BRAVO, A.; LOPEZ-ALONSO, M.; PEREIRA, V.; BENEDITO, J. L. Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. **The Veterinary Journal**, v. 169, n. 2, p. 286-292, 2005.

CASTILLO, C.; HERNANDEZ, J.; LOPEZ-ALONSO, M.; MIRANDA, M.; BENEDITO, J. L., Values of plasma lipid hydroperoxides and total antioxidant status in healthy dairy cows: preliminary observations. **Archiv fur Tierzucht**, v. 46, p. 227–233, 2003.

CASTILLO, C.; HERNÁNDEZ, J.; VALVERDE, I.; PEREIRA, V.; SOTILLO, J.; LÓPEZ ALONSO, M.; BENEDITO, J. L. Plasma malonaldehyde (MDA) and total antioxidant status (TAS) during lactation in dairy cows. **Research in Veterinary Science**, v. 80, p. 133–139, 2006.

CARLSON, G. P. Testes de química clínica. In: SMITH, B.P. (Ed.). **Tratado de medicina interna de grandes animais**, São Paulo, Manole, 1993. p. 395–426.

CELI, P.; DI TRANA, A.; CLAPS, S. Effects of plane of nutrition on oxidative stress in goats during the peripartum period. **The Veterinary Journal**, v. 184, p. 95-99, 2010.

CEYLAN, E.; DEDE, S.; DEĞER YÖRÜK, I. Investigation of the effects of carrying heavy load on prooxidation/antioxidant status and vitamin D3 in healthy horses. **Asian Journal Animal Veterinary Adv.** v. 4, p. 41-46, 2009.

CHAPINAL, N.; CARSON, M. E.; LEBLANC, S. J.; LESLIE, K. E.; GODDEN, S.; CAPEL, M.; SANTOS, J. E. P.; OVERTON, M. W.; DUFFIELD, T.F. The association of serum metabolites in the transition period with milk production and early lactation reproductive performance. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 3, p. 1301-1309, 2012

CHAPINAL, N. C.; CARSON, M. E.; DUFFIELD, T. F.; CAPEL, M.; GODDEN, S.; OVERTON, M.; SANTOS, J. E. P.; LEBLANC, S. J. The association of serum metabolites with clinical disease during the transition period. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 4897–4903, 2011.

CHATTERJEE, P. N.; KAUR H.; PANDA N. Effect of vitamin E supplementation on plasma antioxidant vitamins and immunity status of crossbred cows. **Asian - Australasian Journal of Animal Sciences**, v.16, p.1614- 1618, 2003.

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

CHEW, B. Importance of antioxidant vitamins in immunity and health in animals. **Animal Feed Science and Technology**, v. 59, n. 95, p. 103-114, 1996.

CHIHUAULAF, R.H.; CONTRERAS P.A.; WITTWER F.G. Pathogenesis of oxidative stress: consequences and evaluation in animal health. **Veterinary of México**, v. 33, n. 3, p. 265-283, 2002.

CHILLIARD, Y.; BOCQUIER, F.; DOREALL, M. Digestive and metabolic adaptation of ruminants to undernutrition and consequences on reproduction. **Reproductive Nutrition Development**, v. 38, n. 2, p. 131-152, 1998.

CIPPITELLI, M.; SANTONI, A. Vitamin D3: a transcriptional modulator of the interferon- γ gene. **European Journal of Immunology**, v. 28 p. 3017–3030, 1998.

COFFEY, M. P.; HICKEY, J.; BROTHERSTONE, S. Genetic aspects of growth of Holstein–Friesian dairy cows from birth to maturity. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 322–329, 2006.

COLITTI, M.; STEFANOM, B. Effect of natural antioxidants on superoxide dismutase and glutathione peroxidase mRNA expression in leukocytes from periparturient dairy cows. **Veterinary Research Communications**, v. 30, p. 19-27, 2006.

COLSTON, K.; COLSTON, M. J.; FELDMAN D. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and malignant melanoma: the presence of receptors and inhibitors of cell growth in culture. **Endocrinology**, v. 108, p. 1083–1086, 1981.

CONTRERAS, P. Indicadores do metabolismo protéico utilizados nos perfis metabólicos de rebanhos. In: GONZÁLEZ, F. H. D.; BARCELLOS, J. O.; OSPINA, H. (Ed.). **Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brasil), p. 23-30, 2000.

DANN, H. M.; MORIN, D. E.; BOLLERO, G. A. Prepartum intake, postpartum induction of ketosis, and periparturient disorders affect the metabolic status of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 11, p. 3249-3264, 2005.

DJURHUUS, C. B.; HANSEN, T. K.; GRAVHOLT, C.; ORSKOV, L.; HOSODA, H.; KANGAWA, K.; JORGENSEN, J.O.L.; HOLST, J.J.; SCHMITZ, O. Circulation levels of ghrelin and GLP-1 are inversely related during glucose ingestion. **Hormone and Metabolic Research**, v. 34, p. 411–413, 2000.

DOBBELAAR, P.; BOUWSTRA, R. J.; GOSELINK, R. M. A; JORRITSMA, R.; VAN DEN BORNE, J. J. G. C.; JANSEN, E. H. J. M. Effects of vitamin E supplementation on and the association of body condition score with changes in peroxidative biomarkers and antioxidants around calving in dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 3103–3113, 2010.

DOEPEL, L.; LAPIERRE, H.; KENNELLY, J. J. Peripartum performance and metabolism in dairy cows in response to prepartum energy and protein intake. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 2315–2334, 2002.

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. Transition cow management and periparturient metabolic disorders. In: KASKE, M.; SCHOLZ, H.; HOLTERSHINKEN, M. (Ed.). **Recent developments and perspectives in bovine medicine**. Tierärztliche Hochschule: Klinik für Rinderkrankheiten, 2002. p. 224-235.

DRACKLEY, J. K.; DANN, H. M.; DOUGLAS, G. N.; GURETZKY, N. A. J.; LITHERLAND, N. B.; UNDERWOOD, J. P.; LOOR, J. J. Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. *Ital. Journal Animal Science*. v. 4, p. 323–344, 2005.

DROGE, W. Free Radicals In The physiological control of cell function. **Physiology Reviews**, v. 82, p. 47–95, 2002.

DUBUC, J.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E.; WALTON J. S.; LEBLANC S. J. Risk factors for postpartum uterine diseases in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 5764–5771, 2010.

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**, *in press*. 2009.

DUTTA-ROY, A. K. Molecular mechanism of cellular uptake and intracellular translocation of α -tocopherol: role of tocopherol-binding proteins. **Food And Chemical Toxicology**, v. 37, n. 9/10, p. 967-971, 1999.

EL-SHERIF M. M. A.; ASSAD F. Changes in some blood constituents of Barki ewes during pregnancy and lactation under semi arid conditions. **Small Ruminant Research**, v. 40, p. 269-277, 2001.

EMERY, R. S.; LIESMAN, J. S.; HERDT, T. H. Metabolism of long-chain fatty acids by ruminant liver. **Journal Nutrition**, v. 122, p. 832-837, 1992.

ERSKINE, R. J.; BARTLETT P. C.; HERDT T.; GASTON P. Effects of parenteral administration of Vitamin E on health of periparturient dairy cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 211, p. 466- 469, 1997.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods In Enzymology**, v. 186, p. 407-421, 1990.

FARBER, J. L.; KYLE, M. E.; COLEMAN, J. B. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. **Laboratory Investigation**, v. 62, n. 6, p. 670-679, 1990.

FAURE, P.; ROSSINI, E.; LAFOND, J. L.; RICHARD, M. J.; FAVIER, A.; HALIMI, S. Vitamin E improves the free radical defense system potential and insulin sensitivity of rats fed high fructose diets. **The Journal of Nutrition**, v. 127, p. 103–107, 1997.

FEITOSA, F. L. F.; BIRGEL, E. H. Variação da concentração de imunoglobulinas G e M, de proteína total e suas frações eletroforéticas e da atividade da gamaglutamiltransferase no soro sanguíneo de vaca holandesas, antes e após o parto. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 2, p. 11-116, 2000.

FERRAZ, E. G.; SILVEIRA, B. B.; SARMENTO, V. A.; SANTOS, J. N. Receptores Toll-Like: ativacao e regulacao da resposta imune. **Revista Gaúcha Odontologia**, v.59, n.3, p.483-490, 2011.

FERREIRA, F. Stress oxidativo e dano oxidativo muscular esquelético: influência do exercício agudo inabitual e do treino físico. **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto**, v. 7, n. 2, p. 257–275, 2007.

GAÁL, T.; RIBICZEYNÉ-SZABÓ, P.; STADLER, K.; JAKUS, J.; REICZIGEL, J.; KÖVÉR, P.; MÉZES, M.; SÜMEGHY, L. Free radicals, lipid peroxidation and the antioxidant system in the blood of cows and newborn calves around calving. Part B **Comparative Biochemistry and Physiology** v. 143, p. 391–396, 2006.

GILBERT, R. O.; GRÖHN Y. T.; MILLER P. M.; HOFFMAN D. J. Effect of parity on periparturient neutrophil function in dairy cows. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 36, p. 75-82, 1993.

GODDEERIS, B. Immunology of cattle. In: PASTORET, P.; GRIEBEL, P.; BAZIN, H.; GOVARETTS, A. (Ed.). **Handbook of vertebrate immunology**. San Diego: Academic Press, 1998. p. 439-484.

GOMES, M. M.; SAUNDERS, C.; ACCIOLY, E. Papel da vitamina A na prevenção do estresse oxidativo em recém-nascidos. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, Recife, v. 5, n. 3, p. 275–282, 2005.

GOFF, J. P.; STABEL J. R. Decreased plasma retinol, α -tocopherol, and zinc concentration during the periparturient period: effect on milk fever. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 3195, 1990.

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.

GOFF, J. P.; KIMURA, K.; HORST, R. L. Effect of mastectomy on milk fever, energy, and vitamins A, E, and β -carotene status at parturition. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 1427–1436, 2002.

GOFF, J. P. Major advances in our understanding of nutritional influences on bovine health. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 4, p. 1292-1301, 2006.

GONZÁLEZ, F. H. D.; ROCHA, J. A. Metabolic profile variations and reproduction performance in Holstein cows of different milk yields in southern Brazil. **Arquivo da Faculdade de Veterinaria da UFRGS**, v. 26, p. 52-64, 1998.

GONZÁLEZ, F. H. D. Uso do perfil metabólico para determinar o status nutricional em gado de corte. In: GONZÁLEZ, F. H. D.; BARCELLOS, J. O.; OSPINA, H.; RIBEIRO, L. A. O. **Perfil metabólico em ruminantes e seu uso em nutrição e doenças nutricionais**. Porto Alegre: UFRGS, 2000.

GREEN, B. L.; MCBRIDE, B. W.; SANDALS, D.; LESLIE, K. E.; BAGG, R.; DICK, P. The impact of a monensin controlled-release capsule on subclinical ketosis in the transition dairy cow. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 333–342, 1999.

GRIFFIN, J. F. T. Stress and immunity: A unifying concept. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 20, p. 263-312, 1989.

GRUMMER, R. R. Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 3882–3896, 1993.

HALLIWELL, B.; CHIRICO S. Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement, and significance. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, p. 715S–725S, 1993.

HALLIWELL, B. Free radical, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence. **The Lancet**, v. 344, p. 721-724, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3. ed. New York: Oxford University Press. 2001. 936 p

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. **Free radicals in biology and medicine**. New York: Oxford University Press, 2007.

HAMMON, D. S.; EVJEN, I. M.; DHIMAN, T. R.; GOFF, J. P.; WALTERS, J. L. 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.

HARMEYER, J.; SCHLUMBOHM, C. Pregnancy impairs ketone body disposal in late gestating ewes: Implications for onset of pregnancy toxaemia. **Research in Veterinary Science**, v. 81, p. 254-264, 2006.

HARRISON, J. P.; HANCOCK D. D.; CONRAD H. R. Vitamin E and selenium for reproduction of the dairy cow. **Journal of Dairy Science**, v. 67, p. 123–131, 1984.

HARVEY, M, A.; CAUVIN, A.; DALE, M.; LINDLEY, S.; BALLABIO, R. Effect and mechanism of the antiprolactin drug cabergolina on pseudopregnancy in the bitch. **Journal Small Animal Pract**, v. 38, p. 336-339, 1997.

HAYIRLI, A.; BERTICS, S. J.; GRUMMER, R. R. Effects of slow-release insulin on production, liver triglyceride, and metabolic profiles of Holsteins in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 2180-2191, 2002.

HIDIROGLOU, N.; CAVE, N.; ATWALL, A. S.; FARNWORTH, E. R.; MCDOWELL, L. R. Comparative vitamin E requirements and metabolism in livestock. **Annales de Recherches Veterinaires**, v. 23, n. 4, p. 337-59, 1992.

HIDIROGLOU, M.; BATRA, T. R.; ZHAO, X. Bioavailability of vitamin E compounds and the effect of supplementation on release of superoxide and hydrogen peroxide by bovine neutrophils. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 1, p. 187-93, 1997.

HIGUCHI, H.; NAGAHATA, H. Effects of vitamins A and E on superoxide production and intracellular signaling of neutrophils in Holstein calves. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 64 p. 69-75, 2000.

HOGAN, J. S.; WEISS, W. P.; TODHUNTER, D. A.; SMITH, K. L.; SCHOENBERGER, P. S. Bovine Neutrophil Responses To Parenteral Vitamin E. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 399-405, 1992.

HOLTENIUS, K.; PERSSON WALLER, K.; ESSEN-GUSTAVSSON, B.; HOLTENIUS, P.; HALLEN SANDGREN, C. Metabolic parameters and blood leukocyte profiles in cows from herds with high or low mastitis incidence. **Veterinary Journal**, v. 168, p. 65-73. 2004.

HORST, R. L.; GOFF J. P.; REINHARDT T. A. Calcium and vitamin D metabolism in the dairy cow. **Journal of Dairy Science**, v.77, p.1936–1951,1994.

HOWARD, A. C.; MCNEIL, A. K.; MCNEIL, P. L. Promotion of plasma membrane repair by vitamin E. **Nature Communications**, v. 2, n. 597, p.1–8, 2011.

HUDSON, S.; MULLFORD, M.; WHITTESTONE, W. Bovine plasma corticoids during parturition. **Journal of Dairy Science**, v. 59, n. 4, p. 744-746, 1975.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Anuário estatístico do Brasil, 2012**, disponível em: < <http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 01mar.2013.

INGVARTSEN, K. L.; ANDERSEN, J. B. Symposium: Dry matter intake of lactating dairy cattle. Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1573–1597, 2000.

JANERO, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 9, p. 515-540, 1990.

JONES, D. P.; VALERIAN, E. K.; STEVEN, D. A.; DONALD, J. R.; STANLEY, T. O. Impact of nutrients on cellular lipid peroxidation and antioxidant defense system. **Toxicological Sciences**, v. 26, n. 1, p. 1-7, 1995.

JORDÃO Jr A. A.; Chiarello P. G.; Bernardes, M. S. M.; Helio Vannucchi, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. **Medicina**, Ribeirão Preto. n. 31, p.434-449, 1998.

JUKOLA, E.; HAKKARAINEN, J.; SALONIEMI, H.; SANKAR, S.. Blood selenium, vitamin E, vitamin A and β -carotene concentrations and udder health, fertility treatments and fertility. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 838-845, 1996.

KALAITZAKIS, E.; PANOUSIS, N.; ROUBIES, N.; GIADINIS, N.; KALDRYMIDOU, E.; GEORGIADIS, M.; KARATZIAS, H. Clinicopathological evaluation of downer dairy cows with fatty liver. **Canadian Veterinary Journal**, v. 51, n. 6, p. 615-622, 2010.

KAMILOGLU, N. N.; BEYTUT E.; AKSAKAL M. Alteration in antioxidant status and lipid peroxidation of sheep previously treated with vitamin a and β -carotene during breeding and periparturient period. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, n. 50, p. 171–177, 2006.

KAMPEN A. H.; TOLERSRUD, T.; LUND, A. Flow cytometric measurement of neutrophil respiratory burst in whole bovine blood using live *Staphylococcus aureus*. **Journal of Immunological Methods**, v. 289, p. 47-55, 2004.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997. 932 p.

KIDA, K. Relationships of metabolic profiles to milk production and feeding in dairy cows. **Journal Of Veterinary Medicine Science**, v. 65, p. 671-677, 2003.

KIMURA, K.; REINHARDT, T. A.; GOFF, J. P. Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 2588-2595, 2006.

KLECZHOWSKI, M.; KLUCINSKI, W.; SIKORA, J.; JDANOCVIEZ, M.; DZIEKAN, P. Role of antioxidants in the protection against oxidative stress in cattle: non-enzymatic mechanisms (part 2). **Polish Journal of Veterinary Sciences**, n. 6, p. 301–308. 2003.

KNICKERBOCKER, J. J.; THATCHER, W. W.; BAZER, F. W.; DROST, M.; BARRON, D. H.; FINCHER, K. B.; ROBERTS, R. M. Proteins secreted by Day-16 to -18 bovine conceptuses extend corpus luteum function in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 77, p. 381-391, 1986.

KRETZSCHMAR, M. Regulation of hepatic glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 48, n. 5, p. 439-446, 1996.

KURATA, M.; SUZUKI, M.; AGAR, N. S. Glutathione regeneration in mammalian erythrocytes. **Comparative Haematology International**, London, v. 10, p. 59-67, 2000.

LAGO, E. P.; COSTA, A. P. D.; PIRES, A. V.; SUSIN, I.; FARÍAS, V. P.; DO LAGO, L. A. Parâmetros metabólicos em vacas leiteiras durante o período de transição pós-parto. **Brazilian Journal of Veterinary Science**, v. 11, p. 98-103, 2004.

LLAMAS MOYA S.; ALONSO GÓMEZ M.; BOYLE L. A.; MEE J. F.; O'BRIEN B.; ARKINS S. Effects of milking frequency on phagocytosis and oxidative burst activity of phagocytes from primiparous and multiparous dairy cows during early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 2, p. 587-595, 2008.

LEBLANC, S. J.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E.; BATEMAN, K. G.; TENHAG, J., WALTON, J. S.; JOHNSON, W. H. The effect of prepartum injection of vitamin e on health in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 6, p. 1416–1426, 2002.

LEBLANC, S. J.; HERDT, T. H.; SEYMOUR, W. M.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E. Peripartum serum vitamin e, retinol, and beta-carotene in dairy cattle and their associations with disease. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 609-619, 2004.
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. J. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 56, p. 29–35, 2010. Supplement.

LENG, R. A.; ANNISON, E. F. Metabolic activities of sheep erythrocytes. I. Glycolytic activities. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 13, p. 31-43, 1962.

LIPS, P. Vitamin D physiology. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 92, n. 1, p. 4-8, 2006.

LOOR J. J. ; DANN H. M. ; EVERTS R. E.; OLIVEIRA R.; GREEN C. A.; JANOVICKGURETZKY N. A.; LITHERLAND N.; RODRIGUEZ-ZAS S. L.; LEWIN H. A.; DRACKLEY J. K. Plane of nutrition prepartum alters hepatic gene expression and function in dairy cows as assessed by longitudinal transcript and metabolic profiling. **Physiological Genomics**, v. 27, n. 1, p. 29–41, 2006.

LOPES, S.T.A. atividade funcional neutrofílica em cabras com mastite induzida experimentalmente por *Staphylococcus aureus* e suplementadas com vitamina E (acetato dl-alfa-tocoferol). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 5, p. 515-521, 2003.

LOVETT-RACKE A. E.; RACKE M. K. The effect of vitamin A as retinyl palmitate on T-cell proliferation in MS patients. **Cellular Immunology**, v. 215, n. 1, p. 54-60, 2002.

LYKKESFELDT, J.; SVENDSEN, O. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. **The Veterinary Journal**, v. 173, p. 502–511. 2007.

MACHADO, L. P. Malondialdeído eritrocitário como índice de estresse oxidativo em eqüinos da raça Árabe. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, p. 237, 2007.

MACHADO, L. P.; KOHAYAGAWA, A.; SAITO, M. E.; FERNANDES, V., YONEZAWA, L. A. Lesão oxidativa eritrocitária e mecanismos antioxidantes de interesse na medicina veterinária, **Revista de Ciências Agroveterinárias**. v. 8, n. 1, p. 84-94, 2009.

MALLARD, B. A.; DEKKERS J. C.; IRELAND M. J.; LESLIE K. E.; SHARIF S.; LACEY VANKAMPEN C.; WAGTER L.; WILKIE, B. N. Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. **Journal of Dairy Science**, v.81, p. 585-595, 1998.

MARQUEZ, A. C.; RADEMACHER, M. A. Indicadores bioquímicos sanguíneos de los desequilibrios energéticos en ganado lechero. In: MEMÓRIAS DEL SEMINÁRIO INTERNACIONAL EN REPRODUCCIÓN Y METABOLISMO DE LA VACA LECHERA. Universidad de Caldas. Facultad de Ciencias Agropecuarias, 1999, Manizales, Co.

MCDOWELL, R. E.; WILK, J. C.; TALBOTT, C. W. Economic viability of crosses of *Bos taurus* and *Bos indicus* for dairying in warm climates. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 1292–1303. 1996.

MEHRZAD, J.; DUCHATEAU, L.; PYORALA, S.; BURVENICH C.. Blood and milk neutrophil chemiluminescence and viability in primiparous and pluriparous dairy cows during late pregnancy, around parturition and early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 3268–3276, 2002.

MEHRZAD, J.; DUCHATEAU, L.; BURVENICH, C. Viability of milk neutrophils and severity of bovine coliform mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 4150-4162, 2004.

MENGE C.; NEUFELD B.; HIRT W.; SCHMEER N.; BAUERFEIND R.; BALJER G.; WIELER L.H. Compensation of preliminary blood phagocyte immaturity in the newborn calf. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.62, n.4, p.309-321, 1998.

MERLO, M.; CELI, P. Relationships between oxidative status and pregnancy outcome in dairy cows. **Animal Production in Australia**, v. 27, n. 2003, p. 2812, 2008.

MICHIELS, C.; RAES M.; TOUSSAINT O.; REMACLE J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 17, p. 235–248, 1994.

MILLER, J.K.; BREZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E.; MADSEN, F.C., Oxidative stress, antioxidants and animal function. **Journal of Dairy Science**, n. 76, p. 2812–2823, 1993.

MILLER, J. K.; MADSEN F. C; LYONS T. P.; JACQUES K. A.. Transition metals, oxidative status, and animal health: Do alterations in plasma fast-acting antioxidant lead to disease in livestock? **Biotechnology in the feed industry**. In: Proc. Alltech's Tenth Annu. Symp. ed. Nottingham Univ. Press, Nottingham, UK. p. 283–301, 1994.

MORA J .R.; IWATA M.; VON ANDRIAN U. H. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. **Nature Reviews Immunology**, n. 8, p. 685–698, 2008.

MUEHLENBEIN, E. L.; BRINK D. R.; DEUTSCHER G. H.; CARLSON M. P.; JOHNSON A. B.. Effects of inorganic and organic copper supplemented to first-calf cows on cow reproduction and calf health and performance. **Journal of Animal Science**, n. 79, p. 1650–1659, 2001.

MULLIGAN, F. J.; DOHERTY M. L. Production diseases of the transition cow. **Veterinary Journal** n. 176, p. 3–9, 2008.

MUNDIM, A. V.; COSTA, A. S.; MUNDIM, S. A. P.; GUIMARÃES, E. C.; ESPINDOLA, F. S. Influência da ordem e estágio da lactação no perfil bioquímico sanguíneo de cabras da raça saanen. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p. 306-312, 2007.

MURRAY, R. K. Red and white blood cells. In: MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, O. V. W. (Ed) **Harper's Biochemistry**. 23 ed. Norwalk: Appleton And Lange, 1993. p. 688-703

NETO, J. M. F. A.; DONADON, C. C. Cinética de marcadores de estresse oxidativo para avaliação de “overreaching” induzido pelo exercício físico exaustivo. Revista Digital, Buenos Aires, v. 12, n. 162, 2011. Disponível em: <<http://www.efdeportes.com/efd162/avaliacao-de-overreaching-induzido-pelo-exercicio.htm>>. Acesso em 12 abr. 2012.

NDIWENI, N.; FINCH, J.M. Effects of in vitro supplementation with a -tocopherol and selenium on bovine neutrophil functions: implications for resistance to mastitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.51, p.67-78, 1996.

NOCKELS, C. F.; ODDE, K. G.; CRAIG, A. M. Vitamin E supplementation and stress affect tissue alpha-tocopherol content of beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 672-677, 1996.

NOCKELS, C. F. Protective effects of supplemental vitamin E against infection. **Federation Proceedings**. v. 38, p. 2134, 1979.

NRC: NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Committe on Animal Nutrition. Nutrient requeriments of beef cattle. 6. ed. Washingyon: National Academy of Science, 2011.

NUNES, E.; OLIVEIRA, S. Radicais livres: conceito, doenças, estresse oxidativo e antioxidantes. **Open Journal Systems**. 2006.

ODENSTEN, M. O.; CHILLIARD, Y.; HOLTENIUS, K. Effects of two different feeding strategies during dry-off on metabolism in high-yielding dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 11, p. 2072-2082, 2005.

OCHOA, L.; MCDOWELL, L. R.; WILLIAMS, S. N.; WILKINSON, N.; BOUCHER, J.; LENTZ, E. L. Alpha-Tocopherol concentrations in serum and tissues of sheep fed different sources of vitamin E. **Journal of Animal Science**, v. 70: p. 2568 – 2573, 1992.

OLIVEIRA, C.H.A. **Desenvolvimento fetal em cabras da raça anglonubiana alimentadas com farelo de mamona**. 2010. 68 f. Dissertação (Mestre em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2010.

OSPINA, P. A.; NYDAM, D. V.; STOKO, L. T.; OVERTON, T. R. 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, p. 1596–1603, 2010.

OVERTON T. R.; WALDRON M. R. Nutritional management of transition dairy cows: strategies to optimize metabolic health. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 105–119, 2004.

PAIVA, F. A.; NEGRÃO, J. A.; NETTO, A. S.; PORCIONATO, M. A. F.; LIMA, C. G. Efeito do manejo de aleitamento nos níveis de cortisol no metabolismo e na produção de leite de vacas holandesas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 6, p. 2376-2380, 2006.

PASSI, S.; STANCATO A.; COCCHI M. A monitoring of oxidative stress of ageing and ageing-related diseases. **Prog. Nutr.** v.3, p. 35–58, 2001.

PATHAN, M. M.; LATIF, A.; DAS, H.; SIDDIQUEE, G. M.; VADODARIA, V. P. Production Antioxidant Status In Parturient Meshana. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 9., 2010, Argentina. 2010.

PAYNE, J. M.; PAYNE, S. **The metabolic profile**. Oxford: Oxford University Press, 1987. 179 p.

PERSSON WALLER, K. P.; HALLEN SANDGREN C.; EMANUELSON U.; K.JENSEN S. Supplementation of RRR- α -tocopheryl acetate to periparturient dairy cows in commercial herds with high mastitis incidence. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 3640–3646, 2007.

PICCIONE, G.; CAOLA, G.; GIANNETTO, C. Selected biochemical serum parameters in ewes during pregnancy, post-parturition, lactation and dry period. **Animal Science Papers and Reports**, v. 27, n. 4, p. 321–330, 2009.

POLITIS, I.; HIDIROGLOU, M.; BATRA, T. R.; GILMORE, J. A.; GOREWIT, R. C.; SCHERF, H. Effects of vitamin E on immune function of dairy cows. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, p. 179-84, 1995.

POLITIS, I.; HIDIROGLOU, N.; WHITE, J. H.; GILMORE, J. A.; WILLIAMS, S. N.; SCHERF, H.; FRIGG, M. Effects of vitamin E on mammary and blood leukocyte function, with emphasis on chemotaxis in periparturient dairy cows. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, p. 468–471, 1996.

POLITIS, I.; BIZELIS I.; TSIARAS A.; BALDI A. Effect of vitamin E supplementation on neutrophil function, milk composition and plasmin activity in dairy cows in a commercial herd. **Journal of Veterinary Research**, v. 71, p. 273–278, 2004.

POND, W. G.; CHURCH, D. C.; POND, K. R.; SCHOKNECHT, P. A. **Basic animal nutrition and feeding**. 5. ed. New Jersey: John Wiley, 2005. p. 580.

PRATT D. S.; KAPLAN M. M. Diseases of the liver. In: LIPPEN- PRATT D. S.; KAPLAN M. M. **Diseases of the liver**. Philadelphia: Lippencott-Raven, 1999.

PREISLER, M. T.; WEBER, P. S. D.; TEMPELMAN, R. J.; ERSKINE, R. J.; HUNT, H.; BURTON, J. L. Glucocorticoid receptor down-regulation in neutrophils of periparturient cows. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, p. 14–19, 2000.

PULLEN, D. L., PALMQUIST D. L., EMERY R. S.. Effect of days of lactation and methionine hydroxy analog on incorporation of plasma fatty acids into plasma triglycerides. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p. 49-58, 1989.

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

RAJIV, C. **Influence of β -carotene and vitamin E supplementation on udder health and immunocompetence in dairy cattle**. 2001. Ph.D. Thesis, National Dairy Research Institute (Deemed University), Karnal, India, 2001.

RAMADAN, A. A.; GHONIEM A. A.; HASSAN, H. M.; YOUSSEF, A. E. Effects of beta-caroteno, selenium and vitamin A on in vitro polymorphonuclear leukocytic activity in peripartal buffalo. **Theriogenology**, v. 55, p. 693–704, 2001.

RAMOS, A.; WECHSLER, F. S.; ONSELEN, V. J.; GONCALVES, H. C. PROMEBUL: sumário de touros bubalinos. Botucatu: Unesp, 2004. 39 p.

REECE, W. O. **Dukes / fisiologia dos animais domésticos**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 926.

REID, I. M., ROBERTS, C. J., TREACHER, R. J. Effect of body condition at calving on tissue mobilization, development of fatty liver and blood chemistry of dairy cows. **Animal Production**, v. 43, n. 1, p. 7-15, 1986.

REYNOLDS, C. K., AIKMAN, P. C., LUPOLI, B., HUMPHRIES, D. J., BEEVER, D. E. Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. **Journal of Dairy Science**, n.86, p.1201-1217, 2003.

RIBEIRO, L., GONZÁLEZ, F. Perfil metabólico de borregas corriedale em pastagem nativa do Rio Grande do Sul. **Acta Scientiae**, v. 31, p. 167–170, 2003.

RICCÓ, D. Indicadores sanguíneos e corporais de avaliação metabólico-nutricional em ruminantes. In: SEMINÁRIO DE BIOQUÍMICA DO TECIDO ANIMAL, Programa de pós- graduação em ciências veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.

ROBERTS T.; CHAPINAL N.; LEBLANC S. J.; KELTON D. F.; DUBUC J.; DUFFIELD T. F. Metabolic parameters in transition cows as indicators for early-lactation culling risk. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 6, p. 3057-3063, 2012.

ROCHA, R. X. **Perfil oxidativo e hematologia em cordeiros intoxicados com altas doses de ferro**. 2010, 70 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2010.

RODRIGUES, C. A. F.; RODRIGUES, M. T.; BRANCO, R. H. Avaliação do consumo e de metabólitos plasmáticos de cabras gestantes, com duas condições corporais, alimentadas com dietas apresentando diferentes níveis de energia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 945-952, 2007.

ROVER JÚNIOR, L.; HÖEHR, N.F.; VELLASCO, A. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

RYAN, M. J.; DUDASH, H. J.; DOCHERTY, M.; GERONILLA, K. B.; BAKER, B. A.; HAFF, G. G.; CUTLIP, R. G.; ALWAYS, S. E. Aging-dependent regulation of antioxidant enzymes and redox status in chronically loaded rat dorsiflexor muscles. **The journals of gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 63, n. 10, p. 1015–1026, 2008.

SARDAR, S.; CHAKRABORTY, A.; CHATTERJEE, M. Comparative effectiveness of vitamin D3 and dietary vitamin E on peroxidation of lipids and enzymes of the hepatic antioxidant system in Sprague-Dawley rats. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 66, n. 1, p. 39-45, 1996.

SANTOS, M. V. **Correlação entre ácido ascórbico plasmático, contagem de células somáticas no leite e o perfil metabólico de vacas secas e em lactação**. 1998. 97 p. Dissertação (Mestrado em Nutrição Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 1998.

SATTTLER T.; FÜRLL M. Creatine Kinase and Aspartate Aminotransferase in Cows as Indicators for Endometritis. **Journal of Veterinary Medicine** v. 51, n. 3, p. 132-137. 2004

SCONBERG S.; NOCKELS C. F. ; BENNET D. W.; BRUYNINCLESE W.; BLANCQUARET A. M. B. ; CRAIG A. Effect of shipping handling, adrenocorticotrophic hormone and epinephrine on a-tocopherol content of bovine blood. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, p. 1287–1293, 1993.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, p. 213-219, 1993.

SIES, H., STAHL, W. Vitamins E and C, B-Carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 6, p. 1315-1321, 1995.

SILVA, G. A.; SOUZA, B. B.; ALFARO, C. E. P.; SILVA, E. M. N.; AZEVEDO, S. A.; AZEVEDO NETO, J. A.; SILVA, R. M. N. Efeito da época do ano e período do dia sobre os parâmetros fisiológicos de reprodutores caprinos no semiárido paraibano. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 10, n. 4, p. 903-909, 2006.

SMITH, K. L.; HARRISON, J. H.; HANCOCK, D. D. Effect of vitamin E and selenium supplementation on incidence of clinical mastitis and duration of clinical symptoms. **Journal of Dairy Science**, v.67, p.1293-1300, 1984.

SOMMER, H. Preventive medicine in dairy cows **Veterinary Medical Review**, p. 42-63, 1975.

SORDILLO L. M. Selenium-dependent regulation of oxidative stress and immunity in periparturient dairy cattle. **Veterinary Medicine International**, p. 1-8, 2013.

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

SORDILLO, L. M.; PIGHETTI G. M.; DAVIS M. R. Enhanced production of bovine tumor necrosis factor- α during the periparturient period. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 49, n. 3, p. 263-270, 1995.

SOUZA, P. M.; BIRGEL, E. H.; ARAUJO, W. P.; TAVORA, J. P. F. Valores de referência da glicose plasmática de bovinos da raça Gir, Holandesa e Girolanda criados no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 66, p. 138, 1999. Suplemento.

SPEARS, J. W.; WEISS W. P. Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. **Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 70-76, 2008.

STEFANON, B.; SGORLON, S.; GABAI, G. Usefulness of nutraceuticals in controlling oxidative stress in dairy cows around parturition. **Veterinary Research Communications**, v. 29, p. 387–390. 2005. Supplement 2.

SUCUPIRA, M. C. A. **Estudo comparativo de exames clínico-laboratoriais no diagnóstico de carência energética prolongada em garrotes**. 2003. 173 f. Tese (Doutorado em Clínica Médica) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. 11. ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1996. 856 p.

SZEJDA, P.; PARCE, J. W.; SEEDS, M. S.; BASS, D. A. Flow cytometric quantitation of oxidative product formation by polymorphonuclear leukocytes during phagocytosis. **Journal of Immunology**, v. 133, n. 6, p. 3303-3307, 1984.

TENNANT, B. C. Hepatic Function. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997. p. 327-352.

THAMER, C.; TSCHRITTER, O.; HAAP, M.; SHIRKAVAND, F.; MACHANN, J.; FRITSCH, A.; SCHICK, F.; HÄRING, H.; STUMVOLL, M. Elevated serum ggt concentrations predict reduced insulin sensitivity and increased intrahepatic lipids. **Hormone and Metabolic Research**, v. 37, n. 4, p. 246-251, 2005.

TODOVORA, I. Reference values of oxidative stress parameters (MDA, SOD, CAT) in dogs and cats. **Comparative Clinical Pathology**, London, v.13, p.190-194, 2005.

TREVISAN, M.; BROWNE, R.; RAM, M.; MUTI, P.; FREUDENHEIM, J., CAROSELLA, A. M.; ARMSTRONG, D. Correlates of markers of oxidative status in the general population. **American Journal of Epidemiology**, v. 154, p. 348–356, 2001.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 6. ed. São Paulo: Roca, 2002. 532 p.

URSO, M. L.; CLARKSON, P. M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, v. 189, p. 41–54, 2003.

WATHES, D. C.; CHENG, Z.; BOURNE, N.; TAYLOR, V. J.; COFFEY, M. P.; BROTHERTON, S. Differences between primiparous and multiparous dairy cows in the inter-relationships between metabolic traits, milk yield and body condition score in the periparturient period. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 33, n.2, p. 203–225, 2006.

VAN SAUN, R. J. Blood profiles as indicators of nutritional status. **Advances in Dairy Technology**, v. 12, p. 401, 2000. Trabalho apresentado Western Canadian Dairy Seminar, 2000.

VERBEEK E.; WAAS J. R. ; OLIVER M. H.; MCLEAY L. M.; FERGUSON D. M.; MATTHEWS L. R. Motivation to obtain a food reward of pregnant ewes in negative energy balance: Behavioural, metabolic and endocrine considerations. **Hormones and Behavior**, v. 62, n. 2, p. 162-72, 2012.

WEBER, P. S. D.; MADSEN, S. A.; SMITH, G. W.; IRELAND, J. J.; BURTON, J. L.; Pre-translational regulation of neutrophil L-selectin in glucocorticoid-challenged cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.83, p.213–240. 2001.

WEIGEL, R. A.; ORTOLANI, E. L.; SUCUPIRA, M. C. A. Avaliação do metabolismo oxidativo de ovinos intoxicados por cobre e tratados com tetratriomolibdato de amônio e vitaminas antioxidantes. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 47, n. 6, p. 421-428, 2010.

WEIGEL, R. **Avaliação do metabolismo oxidativo e da histopatologia renal e hepática de ovinos intoxicados por cobre e tratados com tetratriomolibdato e vitaminas antioxidantes**. 2008. 150 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) –

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

WEISS, W. P.; TODHUNTER, D. A.; HOGAN, J. S.; SMITH, K. L. Effect of duration of supplementation of selenium and vitamin E on periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 3187–3194, 1990.

WEISS, W. P.; HOGAN, J. S.; SMITH, D. A.; TODHUNTER, D. A.; WILLIAMS, S. N. Effect Of Supplementing Periparturient Cows With Vitamin E On Distribution Of alfa-Tocoferol In Blood. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p.3479-3485, 1992.

WEISS, W. P.; SMITH, K. L.; HOGAN, J. S. Effect of forage to concentrate ratio on disappearance of vitamins a and e during in vitro ruminal fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 1837-1842, 1995.

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

WEISS, W. P. Requirement of fat soluble vitamins for dairy cows : A review. **Journal of Dairy Science** n. 81, p. 2493-2501, 1998.

WENSING, T.; KRUIP T.; GEELLEN M. J. H, WENTINK G. H.; VAN DEN TOP A. M., Postpartum fatty liver in high-producing dairy cows in practice and in animal studies. The connection with health, production and reproduction problems. **Comparative Hematology International**, n. 7, p. 167-171, 1997.

WINKLER, G. C. Pulmonary intravascular macrophages in domestic animal species: review of structural and functional properties. **The American Journal of Anatomy**, v. 181, p. 217-234, 1988.

WITTWER, F. Diagnóstico dos desequilíbrios metabólicos de energia em rebanhos bovinos. In: GONZÁLEZ, F. H. D.; BARCELLOS, J. O.; OSPINA, H. et al. (Ed.). **Perfil metabólico em ruminantes**: seu uso em nutrição e doenças nutricionais. Porto Alegre: UFRGS, 2000. p. 9-22.

WINTERBOURN, C. C.; ASSMAN, W. B. Neutrophil oxidants: production and reactions. In: DAS, D. K.; ESSMAN, W. B. (Ed). **Oxygen radicals**: systemic events and disease processes. New York: Karger, 1990. p. 31-70.

WULLEPIT, N.; RAES, K. ; BEERDA, B. ; VEERKAMP, R. F.; FREMAUT, D.; DE SMET, S. Influence of management and genetic merit of milk yield on the oxidative status of plasma in heifers. **Livestock Science** v. 123, p. 276-282, 2009.

YOUNG, I. S.; WOODSIDE, J. V. Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical Pathology**. v. 54, p. 176–186, 2001.