EDUARDO CARVALHO MARQUES

**Efeitos da administração de um suplemento de microminerais
injetável contendo cobre, manganês, selênio e zinco sobre a saúde
uterina de vacas leiteiras**

São Paulo

2016

EDUARDO CARVALHO MARQUES

**Efeitos da administração de um suplemento de microminerais
injetável contendo cobre, manganês, selênio e zinco sobre a saúde
uterina de vacas leiteiras**

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

Orientador:

Profa. Dra. Lilian Gregory

São Paulo

2016

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.3429
FMVZ

Marques, Eduardo Carvalho

Efeitos da administração de um suplemento de microminerais injetável contendo cobre, manganês, selênio e zinco sobre a saúde uterina de vacas leiteiras / Eduardo Carvalho Marques. -- 2016.
76 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Lilian Gregory.

1. Bovinos. 2. Minerais. 3. Suplemento de microminerais injetável. 4. Saúde uterina. 5. Endometrite. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos de da administração de um suplemento de microminerais injetável contendo cobre, manganês, selênio e zinco sobre a saúde uterina de vacas leiteiras", protocolada sob o CEUA nº 1041221116, sob a responsabilidade de **Lilian Gregory e equipe; Eduardo Carvalho Marques** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 30/11/2016.

We certify that the proposal " Effects of an injectable trace minerals supplement containing copper, manganese, selenium and zinc on uterine health of dairy cows", utilizing 1500 Bovines (1500 females), protocol number CEUA 1041221116, under the responsibility of **Lilian Gregory and team; Eduardo Carvalho Marques** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 11/30/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **08/2016** a **11/2016**

Área: **Clínica Médica Veterinária**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **18 a 60 meses**

N: **1500**

Linhagem: **Holandes**

Peso: **400 a 700 kg**

Resumo: Os minerais são essenciais para a reprodução e a sua suplementação aumenta a fertilidade, está associado com vias metabólicas que são essenciais para o desenvolvimento e sobrevivência do embrião. O cobre, Magnésio, e zinco são essenciais para as enzimas que regulam a produção de progesterona e a concentração de progesterona tem sido associada com a perda precoce embrionário. Um membro da família de enzimas Zn endopeptidases está envolvido na reorganização dos folículos ovarianos em corpo lúteo plenamente competente, que são a fonte de progesterona. Manganês atua como um co-fator para a síntese de colesterol, o qual é o precursor para a síntese de progesterona. Além da sua importância na produção de progesterona, os minerais parecem desempenhar um papel importante no desenvolvimento dos embriões. Os objetivos do estudo proposto são avaliar os efeitos da utilização de um suplemento de minerais. Os objetivos do estudo proposto são avaliar os efeitos da utilização de um suplemento de minerais injetável 20 dias antes da inseminação artificial em tempo fixo no perfil de progesterona, desenvolvimento do embrião (PSPB, genes ISG e morfometria através da ultrassonografia) e saúde reprodutiva, avaliada por prevalência de doenças puerperais, perfil hormonal e fertilidade em vacas leiteiras após a IA. Um total de 1.500 vacas Holandesas em lactação distribuídos em 3 fazendas na região de Ithaca, NY, USA, serão atribuídos a 4 tratamentos, em delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2 x 2. Os animais serão bloqueados pela paridade (primíparas e multíparas) e dentro de cada bloco designados serão distribuídos aleatoriamente para um dos quatro tratamentos. Os tratamentos serão: (1) suplementação injetável de microminerais com um curto período voluntário de espera (CPVE), (2) sem suplementação injetável de microminerais com um curto período voluntário de espera (CPVE), (3) suplementação injetável de microminerais com um período voluntário de espera estendido (PVEE) e (4) sem suplementação injetável de microminerais com um período voluntário de espera estendido (PVEE). As vacas serão inscritos em um protocolo Ovsynch para sincronização da ovulação para IATF ou a 60 ± 3 DIM (CPVE, n = 750) ou a 88 ± 3 DIM (PVEE, N750). Todas as vacas atribuídas aleatoriamente aos tratamentos, receberam duas injeções de suplemento minerais em cerca de 230 e 260 dias de gestação. Corrímento vaginal e amostra citológica endometrial serão coletados de todas as vacas que participarem do estudo em 33 ± 3 dias em lactação (DEL) e 50 ± 3 DEL para CPVE e 61 ± 3 DEL e 78 ± 3 DEL para PVEE). Amostras de sangue serão coletadas a partir de um subconjunto de 120 vacas (60 vacas com suplementação injetável de microminerais e 60 vacas sem suplementação injetável de microminerais, inseminadas no CPVE, que compreende 30 primíparas e 30 multíparas, para a avaliação dos perfis de minerais, progesterona, PSPB, isolamento de leucócitos, a extração de ARN e RT-PCR quantitativo. Corrímento vaginal e amostra citológica endometrial serão coletados de todas as vacas que participarem do estudo em 33 ± 3 DEL e 50 ± 3 DEL para CPVE e 61 ± 3 DEL e 78 ± 3 DEL para PVEE, usando o dispositivo Metrichcek®. A gestação será diagnosticada no dia 30 pós inseminação artificial (IA) com a ultrassonografia transretal do útero. Vacas diagnosticadas como prenhes positiva serão reexaminadas 35 dias mais tarde, para a detecção de prenhez viável no dia 65 $\pm$ 3. A prenhez por IA será calculado com o número de vacas prenhes no dia 30 ou 65, dividido pelo número de vacas total de

vacas no estudo avaliados para a prenhez. Perda de prenhez entre os dias 30 e 65, será calculado como o número de vacas prenhes no dia 30 menos o número de vacas prenhez no dia 65, e depois dividido pelo número de vacas prenhes no dia 30. Um subconjunto de 60 vacas prenhes no dia 30 pós IA, serão reexaminado pelo ultrassonografia transretal nos dias 36 e 48, para avaliação morfométrica da vesícula amniótico e do embrião/feto.

Local do experimento: O experimento sera realizado nas fazendas Sunnyside Dairy, Allen Dairy e Walnut Dairy, localizadas na região de Ithaca, NY, EUA

São Paulo, 30 de novembro de 2016

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MARQUES, Eduardo Carvalho

Título: Efeitos da administração de um suplemento de microminerais injetável contendo cobre, manganês, selênio e zinco sobre a saúde uterina de vacas leiteiras

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: _____

Ao meu pai por sua sabedoria e carinho.

À minha mãe por todo seu carinho e apoio

As minhas irmãs Fabiana e Sylvia pelo carinho e apoio.

Aos meus sobrinhos Caio, Davi e Lucas por serem encantadores.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Lilian Gregory, pelos ensinamentos passados e por me dar a oportunidade de participar de sua equipe durante 10 anos.

Aos meus grandes amigos Enoch, Mário e Bruno Leonardo, que lutaram comigo durante os 4 anos do Doutorado.

Aos meus colegas da equipe da Profa. Dra. Lilian Gregory: Marjorie, Natalia e Mariane pela boa convivência, bons conselhos e ajuda fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Rodrigo Carvalho Bicalho da Cornell University, pela hospitalidade, pelos ensinamentos e pela ajuda fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos bons amigos feitos na Cornell University, André, Vinicius, Erika, Luciano, Carla, Daniel, Marcela, Rafael, Marcela, Svet e Richard pela agradável convivência.

A todos os proprietários que me permitiram estudar seus animais e aos tratadores que alteraram suas rotinas para que eu colhesse o material desta pesquisa.

Aos professores do Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP: Alice Maria Meilville Paiva Della Libera, Fernando José Benesi, Enrico Lippi Ortolani, Maria Claudia Araripe Sucupira, Fábio Poglioni, Vviani Gomes, Wilson Roberto Fernandes, Carlos Eduardo Larsson, Marcia Mery Kogika, Maria Helena Matiko Akao Larsson, Raquel Yvonne Arantes Baccarin, Sílvia Regina Ricci Lucas, Mitika Kuribayashi Hagiwara, Archivaldo Reche Júnior, Carla Bargi Belli, Denise Saretta Schwartz e Márcia Deosg. Pela convivência harmoniosa, conhecimentos transmitidos e pela amizade.

Aos funcionários do Hospital de ruminantes: Luizinho, Francisco, Édison e Duque pela amizade e convivência harmoniosa.

Aos residentes do Hospital de ruminantes dos anos de 2013, 2014, 2015 e 2016, pela amizade e convivência harmoniosa durante a realização deste trabalho.

Ao corpo de estagiários do Hospital de ruminantes que sempre me rendeu valorosos auxiliares.

À equipe do Prof. Enrico Ortolani, Fred, Carol, Frasson, Barreira, Rejane, Humberto e Natalia que sempre me foram valiosos amigos.

À secretária de pós-graduação Adelaide Borges, e secretarias do departamento: Cida e Silvana por toda atenção e solicitude.

As funcionárias Carmen e Dinha, pela alegria com que exercem sua atividade, sempre colaborando da melhor maneira possível.

Aos meus familiares separados pela distância, mas que sempre me apoiaram.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP que possibilitou a execução desta pesquisa e pela minha formação sou muito agradecido.

A todos que de alguma maneira contribuíram para execução deste trabalho.

E principalmente a todos os bovinos, por possibilitarem a obtenção dos resultados apresentados neste trabalho e por terem servido de aprendizagem e ensinamentos, devo meu respeito.

*“Que o senhor volte os
olhos para ti e te dê tua
paz.
Que o senhor te abençoe”*

São Francisco de Assis

*Senhor, fazei-me instrumento de vossa paz.
Onde houver ódio, que eu leve o amor;
Onde houver ofensa, que eu leve o perdão;
Onde houver discórdia, que eu leve a união;
Onde houver dúvida, que eu leve a fé;
Onde houver erro, que eu leve a verdade;
Onde houver desespero, que eu leve a esperança;
Onde houver tristeza, que eu leve a alegria;
Onde houver trevas, que eu leve a luz.
Ó mestre, fazei que eu procure mais consolar que ser consolado;
compreender, que ser compreendido;
amar, que ser amado.
Pois é dando que se recebe,
é perdoando que se é perdoado,
e é morrendo que se vive
para a Vida Eterna.*

Oração de São Francisco

RESUMO

MARQUES, E. C. **Efeitos da administração de um suplemento de microminerais injetável contendo cobre, manganês, selênio e zinco sobre a saúde uterina de vacas leiteiras.** [Effects of the management of an injectable trace element supplement containing copper, manganese, selenium and zinc on uterine health of dairy cows]. 2016. 76 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Os minerais são essenciais para a saúde e para reprodução de vacas leiteiras. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da utilização de um suplemento de microminerais injetável contendo cobre, manganês, selênio e zinco, 20 dias antes da inseminação artificial, sobre a saúde uterina, perfil de progesterona, desenvolvimento do embrião e fertilidade de vacas Holandesas. O experimento foi dividido em duas fases. Na primeira fase foram usados 306 vacas, entre 2 a 8 anos de idade, foram divididas em um grupo que recebeu suplemento de microminerais injetável (SIM) contendo cobre, manganês, selênio e zinco, 20 dias antes da inseminação artificial (IA) e um grupo controle, que não recebeu nenhum tratamento. Esses animais foram bloqueados por paridade (primíparas e múltíparas), período voluntário de espera (pequeno período de espera – PPE e longo período de espera - LPE) e por fazenda (fazenda 1 e 2). Nessa etapa foi avaliada a saúde uterina, através do corrimento vaginal uterino e pela endometrite citológica. Na segunda fase foram separados 130 animais, divididos em um grupo que recebeu suplemento de microminerais injetável contendo cobre, manganês, selênio e zinco, 20 dias antes da inseminação artificial e um grupo controle, que não recebeu nenhum tratamento, esses animais foram bloqueados por paridade (primíparas e múltíparas). Foi avaliada a concentração de progesterona, o diagnóstico de gestação e a morfometria da vesícula amniótica e do embrião/feto. Não foi encontrada diferença estatística entre grupos experimentais nas avaliações do corrimento vaginal purulento e na endometrite citológica, quando foi bloqueado por paridade, período voluntário de espera e fazenda, também não foi encontrada diferença estatística. Não houve diferença entre os grupos no perfil de progesterona, mas quando foi analisada a porcentagem de animais que estava púberes, encontrou-se diferença estatística dentre os grupos no dia 4 (dias após IA), onde a porcentagem de

animais púberes no grupo que recebeu SIM foi maior que o grupo tratamento ($P = 0,0319$). Não foi encontrada diferença no diagnóstico de gestação e na perda de prenhez. Na avaliação da morfometria do embrião, os animais que receberam SIM, a vesícula amniótica (longitudinal) e o comprimento do embrião (cabeça-nádega e abdominal) foram maiores que o grupo controle com 36 dias. Em conclusão o emprego com o tratamento com Sim 20 dias antes da IA, não tem efeito sobre a saúde uterina, prenhez e na perda de prenhez, mas melhorou a porcentagem de animais púberes e o tamanho do embrião.

Palavras-chave: Bovinos. Minerais. Suplemento de microminerais injetável. Saúde uterina. Endometrite.

ABSTRACT

MARQUES, E. C. **Effects of the management of an inject trace element supplement containing copper, manganese, selenium and zinc on uterine health of dairy cows.** [Efeitos da administração de um suplemento de microminerais injetável contendo cobre, manganês, selênio e zinco sobre a saúde uterina de vacas leiteiras]. 2016. 76 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Minerals are essentials to the health and reproduction of dairy cattle. The aim of this study was to evaluate the effect of the use of an injectable trace element supplement containing copper, manganese, selenium and zinc 20 days before the artificial insemination, on the uterine health, progesterone profile, embryo development and fertility of Holstein dairy cows. The trial was divided in two steps. In the first step, 306 cows, between 2 and 8 years old were divided in two groups. The first group received injectable trace element supplement (ITES) containing copper, manganese, selenium and zinc 20 days before the artificial insemination (AI). The second group did not receive the treatment, constituting the control group. These animals were blocked by parity (primiparous and multiparous), voluntary waiting period (short voluntary waiting period – SVWP and long voluntary waiting period - LVWP) and farm (farm 1 and 2). In this step, uterine health was evaluated by checking the uterine vaginal discharge and by cytological endometritis. In the second step, 130 cows were divided in two groups, which cows received same treatments used in the first step. These cows were blocked by parity (primiparous and multiparous) and progesterone concentration, pregnancy diagnosis, and amniotic vesicle and embryo/fetus morphology were evaluated. The evaluation of purulent vaginal discharge and cytological endometritis showed no statistical significance between treatment groups. When cows were blocked by parity, the voluntary waiting period and farm did not show any difference. While no differences were detected between groups when progesterone profile was evaluated, the percentage of pubescent animals on day 4 after showed differences. In the ITES group, the percentage of pubescent animals was increased compared to the treatment group ($P = 0.0319$). No differences were detected to pregnancy diagnosis and pregnancy loss.

Studying embryo morphometry, the amniotic vesicle (longitudinal) and embryo length (head-buttock) were higher in ITES group compared to treatment group at 36 days. In conclusion, although the use of ITES 20 days before AI did not show any effect on the uterine healthy, pregnancy and pregnancy loss, the percentage of pubescent animals and embryo length was increased.

Key words: Bovines. Injectable trace minerals supplement. Health Uterine. Endometritis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Cronograma do estudo 1	42
Figure 2 -	Protocolo de sincronização da ovulação Ovsynch duplo	43
Figura 3 -	Cronograma de avaliação dos corrimentos vaginais e endometrite citológica	44
Figura 4 -	Cronograma para coleta de sangue em série (P4 e IGF-1) e morfometria do embrião	45

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Efeito de tratamento e tempo sobre a quantidade de PMN ao longo do experimento	52
Gráfico 2 - Mediadas da vesícula amniótico e do embrião/feto em milímetros com 36 e 50 dias de prenhez.....	55

LISTA DE TABELA

Tabela 1 -	Número de animais em cada grupo experimental, pariedade, período voluntário de espera e fazenda.....	47
Tabela 2 -	Número de animais por tratamento para paridade, pariedade, período voluntário de espera e fazenda.....	47
Tabela 3 -	Avaliação geral do corrimento vaginal purulento.	48
Tabela 4 -	Avaliação do corrimento vaginal purulento entre as fazendas.	48
Tabela 5 -	Avaliação do corrimento vaginal purulento entre os períodos voluntário de espera	49
Tabela 6 -	Avaliação do corrimento vaginal purulento entre as pariedades.....	49
Tabela 7 -	Avaliação geral da endometrite citológica.....	49
Tabela 8 -	Avaliação da endometrite citológica entre as fazendas	50
Tabela 9 -	Avaliação da endometrite citológica entre os períodos voluntário de espera.....	50
Tabela 10 -	Avaliação da endometrite citológica entre entre as pariedades	50
Tabela 11 -	Efeito de tratamento, tempo e interação entre tempo e tratamento sobre a quantidade de PMN ao longo do experimento	51
Tabela 12 -	Efeito de tratamento, tempo e interação entre tempo e tratamento sobre a quantidade de PMN ao longo do experimento	52
Tabela 13 -	Porcentagem de animais que estavam púberes através do tempo	53
Tabela 15 -	Mediadas da vesícula amniótico e do embrião/feto em milímetros com 36 e 50 dias de prenhez.....	54

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	PRODUÇÃO DE LEITE NO BRASIL E NOS ESTADOS UNIDOS	21
2.2	CONTEXTO DAS DOENÇAS DA REPRODUÇÃO NO MERCADO DE LEITE.....	21
2.3	MINERAIS	22
2.3.1	Microminerais na reprodução.....	24
2.3.2	Microminerais e imunidade.....	25
2.3.3	Cobre	26
2.3.4	Manganês	28
2.3.5	Selênio.....	30
2.3.6	Zinco	31
2.4	ENDOMETRITE.....	33
2.4.1	Exame citológico	34
2.4.2	Corrimento vaginal purulento (CVP).....	35
2.5	SUPLEMENTO DE MICROMINERAIS INJETÁVEL.....	36
3	OBJETIVOS	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1	ANIMAIS E PROPRIEDADES UTILIZADAS	41
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	41
4.3	SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO (IATF)	43
4.4	AVALIAÇÃO DO CORRIMENTO VAGINAL PURULENTO E ENDOMETRITE CITOLÓGICA.....	43
4.5	AMOSTRAGEM DE SANGUE PARA OS PERFIS DE PROGESTERONA.....	44
4.6	DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO.....	45
4.7	AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DA VESÍCULA AMNIÓTICA E DO EMBRIÃO/FETO PELO ULTRASSOM.....	45
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	46

5	RESULTADOS	47
5.1	GRUPOS EXPERIMENTAIS	47
5.2	AVALIAÇÃO DO CORRIMENTO VAGINAL PURULENTO	48
5.3	ENDOMETRITE CITOLÓGICA.....	49
5.4	PERFIS DE PROGESTERONA E IGF-1	51
5.5	DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO.....	53
5.6	MORFOMETRIA DA VESÍCULA AMNIÓTICO E DO EMBRIÃO/FETO PELO ULTRA-SOM	54
6	DISCUSSÃO	56
6.1	GRUPOS EXPERIMENTAIS	56
6.2	MINERAIS	56
6.3	AVALIAÇÃO DO CORRIMENTO VAGINAL PURULENTO	57
6.4	CITOLOGIA ENDOMETRIAL	58
6.5	PERÍODO VOLUNTÁRIO DE ESPERA	60
6.6	PARIEDADE.....	61
6.7	PERFII DE PROGESTERONA	61
6.8	DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO.....	63
6.9	MORFOMETRIA DA VESÍCULA AMNIÓTICO E DO EMBRIÃO/FETO PELO ULTRA-SOM	64
7	CONCLUSÕES	66
	REFERÊNCIAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

Os minerais são essenciais para a reprodução (ST CLAIR et al., 1994) e a sua suplementação aumenta a fertilidade (RABIEE et al., 2010; MUNDELL et al., 2012), e estão associados com vias metabólicas responsáveis pelo desenvolvimento e sobrevivência do embrião (HOSTETLER; KINCAID; MIRANDO, 2003). O cobre, magnésio e zinco regulam enzimas que participam da produção de progesterona (GOTTSCH; VAN KIRK; MURDOCH, 2000; KENDALL et al., 2006). A concentração de progesterona tem sido associada com a perda precoce embrionária (MANN; LAMMING, 2001; FORDE et al., 2011). É necessário para formação de enzimas esteroidogênicas, tais como citocromo P450, 17 alfa-hidroxilase, citocromo P450 de clivagem de cadeia lateral e lisil oxidase, a presença do cobre (KENDALL et al., 2006). O zinco é um mineral que age nas enzimas endopeptidases e está envolvido na reorganização dos folículos ovarianos em um corpo lúteo eficiente, que são é responsável pela produção de progesterona, já o manganês atua como um co-fator para a síntese de colesterol, precursor da síntese de progesterona (OLSON, 1965).

Além da sua importância na produção de progesterona, os minerais parecem desempenhar um papel importante no desenvolvimento dos embriões. O zinco pode influenciar a prenhez através da modulação da ação do IGF, ao nível celular, diminuindo a afinidade de IGF para a IGFBP (SACKETT; MCCUSKER; MCKUSKER, 1998), e aumentando o IGF livre (MCCUSKER; KALEKO; SACKETT, 1998). IGFs são importantes moduladores da implantação embrionária, desenvolvimento fetal e crescimento do embrião (WATHES et al., 1998; KÖLLE et al., 2002; MOREIRA et al., 2002). Além disso, demonstrou-se que Mn-SOD promove a diferenciação de células do fibroblasto (ST CLAIR et al., 1994), e é expresso por uma pré-implantação embrionária, (LEQUARRÉ et al., 2001) desempenhando um importante papel durante o desenvolvimento fetal precoce (LEQUARRÉ et al., 2001).

Machado et al. (2013) demonstraram que a suplementação injetável de micro minerais (SIM) em 230 e 260 dias de gestação, e aos 35 dias pós-parto teve um impacto positivo na saúde do úbere, além de diminuir a incidência de endometrite e

natimorto. O Suplemento injetável de microminerais (SIM) aumentou o perfil da atividade da superóxido dismutase (SOD) de vacas leiteiras alimentadas com dietas balanceadas e excederam as recomendações do NRC de todos os minerais relevantes. No entanto, o SIM não melhorou a fertilidade (MACHADO et al., 2014). Em outras pesquisas a suplementação com SIM melhorou o desempenho reprodutivo em gado de corte (SALES et al., 2011; MUNDELL et al., 2012). Um estudo realizado em vacas de corte, a taxa de prenhes por inseminação artificial em tempo fixo (IATF) aumentou em 10% em vacas que receberam SIM 105 dias antes da data de parto esperado e 30 dias antes da inseminação artificial (IA) (MUNDELL et al., 2012). Além disso, em um estudo realizado com novilhas receptoras mestiças, a sobrevivência embrionária aos 23 e 48 dias após a transferência de embriões aumentou nos animais que receberam SIM 17 dias antes da transferência de embriões (SALES et al., 2011).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRODUÇÃO DE LEITE NO BRASIL E NOS ESTADOS UNIDOS

O efetivo de bovinos no Brasil, em 2015, foi de 215,20 milhões de cabeças. De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (United States Department of Agriculture - USDA), o Brasil deteve o segundo maior número de bovinos, sendo responsável por 22,5% do rebanho mundial, atrás apenas da Índia. O número de vacas ordenhadas, em 2015, foi de 21,75 milhões de animais, 10,1% do efetivo total de bovinos. Nesse mesmo ano, a produção de leite foi de 35,00 bilhões de litros. A produtividade média foi de 1.609 litros/vaca/ano. O Brasil foi o sexto maior produtor mundial de leite em 2015 (IBGE, 2015). Segundo USDA, o Estados Unidos teve um total de 9,257 milhões de vacas em lactação no ano de 2015, ficou somente atrás da União Europeia. A média de leite por vaca nesse período foi de 22.383 pounds², tendo uma produção total de 208,494 bilhões de pounds². O estado de New York é o terceiro maior em número de vacas lactantes (atrás da Califórnia e Wisconsin), com um total de 62 mil animais, tendo uma produtividade média por animal de 22816 pounds², e um total de 14,1 bilhões de pounds² no ano de 2015.

2.2 CONTEXTO DAS DOENÇAS DA REPRODUÇÃO NO MERCADO DE LEITE

Uma produção leiteira lucrativa carece de uma administração eficiente quanto ao manejo dos custos do rebanho leiteiro. O grande objetivo da indústria leiteira é abastecer o mercado consumidor. O desempenho reprodutivo insatisfatório é um importante entrave produtivo (GRÖHN; RAJALA-SCHULTZ, 2000).

Com o passar das décadas a capacidade produtiva leiteira das vacas aumentou marcadamente. O impacto deste aumento foi uma redução na fertilidade destes

animais, refletida pelo aumento de dias abertos, mais serviços por concepção e maior incidência de problemas reprodutivos (DHALIWAL; MURRAY; DOBSON, 1996). A alta produção leiteira pode contribuir para exacerbar o balanço energético negativo em alguns animais, especialmente em animais em crescimento, aumentando assim a ocorrência de doenças. O descarte seletivo atrapalha a identificação do problema, pois animais altamente produtivos têm tendência de permanecer mais no rebanho, embora causem mais despesas com tratamentos veterinários do que animais de menor produção (GRÖHN; RAJALA-SCHULTZ, 2000). É óbvio que animais doentes tenham perdas na produção leiteira e alguns estudos (RAJALA; GRÖHN, 1998) estimaram que animais que apresentam distocia, retenção de placenta e infecções com sede no útero nas primeiras 2 semanas após o parto tem respectivamente perdas produtivas de 2,2, 1,4 e 1,3 Kg de leite por dia (RAJALA; GRÖHN, 1998). Leblanc, (2007) estimou que o custo no Canadá é cerca de US\$1 a US\$3 por animal por dia aberto em função de problemas reprodutivos.

Um desempenho reprodutivo ruim afeta a lucratividade do rebanho com a diminuição da produção leiteira e do número de bezerros produzidos, aumento da taxa de descarte e aumento do número de dias abertos. (FOURICHON; SEEGER; MALHER, 2000; GRÖHN; RAJALA-SCHULTZ, 2000; DRILLICH; RAAB; LENZ; HEUWIESER, 2004; LEBLANC, 2007).

2.3 MINERAIS

Os minerais são considerados nutrientes fundamentais por participarem de diversas funções do metabolismo animal, compondo estruturas de biomoléculas, interferindo no crescimento e na manutenção de tecidos, participando como cofatores enzimáticos, ativando ações hormonais, regulando a pressão osmótica e equilíbrio ácido-básico. Estes nutrientes representam apenas cerca de 5% do peso total do corpo, mesmo assim, tem grande influência na produção do animal, acarretando

acréscimos ou decréscimos na produtividade do sistema (FILAPPI; PRESTES; CECIM, 2007).

A concentração e as formas de armazenamento dos minerais nos tecidos e fluidos do organismo podem sofrer alterações com a ingestão de dietas deficientes, desbalanceadas ou com excesso de minerais. Em alguns casos as funções fisiológicas são alteradas acarretando lesões e desordens estruturais, as quais variam de acordo com o elemento mineral, grau de duração da deficiência, toxicidade da dieta e fatores intrínsecos dos animais, como idade, sexo e espécie (UNDERWOOD; SUTTLE, 1999).

Os minerais podem ser classificados de várias formas que levam em consideração seus requerimentos e funções. Os que são necessários em grandes quantidades são denominados macrominerais, enquanto os que são exigidos em menores quantidades são os microminerais ou minerais traços. Os macrominerais são requeridos em quantidades maiores que 100 ppm (partes por milhão) e freqüentemente são mencionados como percentagem da dieta (ou g por kg), enquanto os microminerais são requeridos em quantidades menores que 100 ppm e expressos em ppm ou, muitas vezes, em ppb (partes por bilhão) (MCDOWELL, 2003).

Os elementos minerais podem exercer quatro funções no organismo animal (UNDERWOOD; SUTTLE, 1999). Apesar desta separação, cada função não é exclusiva de um determinado elemento mineral, de forma que, um único mineral pode exercer mais de uma função específica assim como diversos minerais podem exercer uma única função quando em interação no organismo animal.

- Estrutural: Compõem estruturas nos órgãos e tecidos do corpo. Por exemplo, Cálcio (Ca), Fósforo (P), Magnésio (Mg), Flúor (F) e Silício (Si) nos ossos e dentes e P e Enxofre (S) nas proteínas do músculo. Zinco (Zn) e P contribuem com a estabilidade estrutural de moléculas e membranas das quais fazem parte.
- Fisiológica: Ocorrem nos fluidos e tecidos como eletrólitos e estão envolvidos com a manutenção da pressão osmótica, do balanço ácido-básico, da permeabilidade de membranas e irritabilidade dos tecidos. Exemplo: Sódio (Na), Potássio (K), Cloro (Cl), Ca, e Mg no sangue, fluido cérebroespinal e suco gástrico.

- Catalítica: Agem como catalisadores nos sistemas enzimáticos e hormonais, como componentes da estrutura de metalproteínas ou como ativador do sistema.
- Reguladora: Recentemente, tem-se verificado ação reguladora dos minerais na replicação e diferenciação celular. Ca, por exemplo, influencia o sinal de transdução e o Zn na transcrição durante o mecanismo de síntese proteica no organismo animal.

De acordo Texeira (2001), a suplementação mineral dos rebanhos, apesar de se constituir um aspecto básico para o desenvolvimento da pecuária tem sido, quase sempre, deixada a um plano secundário pelos criadores, embora se reconheça que é uma prática necessária e altamente viável sob o ponto de vista prático e econômico. Por outro lado, é a suplementação mineral que proporciona aumento significativo nos índices zootécnicos dos animais, sobretudo, no ganho de peso e na taxa de fertilidade, pois o fornecimento de suplementos minerais de alta qualidade tornou-se indispensável e obrigatório para a manutenção das funções de crescimento, de reprodução e produção de animais criados a pasto.

O desempenho reprodutivo de rebanhos de leite e de corte pode ser também influenciado pelo balanço vitamínico e mineral; mesmo que de forma indireta. Todos os minerais e vitaminas tem algum tipo de relação com as funções reprodutivas em bovinos; entretanto, nesta revisão serão abordados apenas aqueles elementos que podem exercer algum tipo de efeito direto sobre a reprodução de vacas de leite e de corte, dentre eles: P, Ca, Mn, Cu, Iodo (I), Zn, Selênio (Se) e as vitaminas A e E (SANTOS; AMSTALDEN, 1998).

2.3.1 Microminerais na reprodução

Deficiências de Manganês (Mn) podem resultar em grande variedade de alterações metabólicas e estruturais. Animais deficientes em Mn tem desempenhos

reprodutivos inferiores, incluindo anormalidades no ciclo estral, estro silencioso, baixas taxas de concepção, aumento no número de abortos e maturidade sexual retardada (GONZÁLEZ; LUIZ; RIBEIRO, 2000).

Desordens reprodutivas estão relacionadas com deficiência de Cobre (Cu) em ruminantes sob pastejo, incluindo queda da fertilidade associada com diminuição ou depressão do estro e aumento do intervalo do parto ao 1o estro; e infertilidade associada com anestro, aborto e reabsorção embrionária (SMITH; AKINBAMIJO, 2000). Dados de literatura mostram relação inversa entre concentração sérica de Cu e importantes parâmetros reprodutivos entre os quais, dias para o primeiro serviço (56 a 70 dias), serviço por concepção (1,1 a 4,4) e dias para concepção (56 a 183) em vacas de leite com alta e baixa concentração sérica de cobre, respectivamente (SMITH; AKINBAMIJO, 2000).

A deficiência de zinco pode causar anormalidades nos sinais de estro e queda na taxa de concepção mesmo quando cobertas com reprodutores normais (SMITH; AKINBAMIJO, 2000).

Em bovinos, desordens reprodutivas como estro silencioso e irregular, redução nas taxas de fertilização e concepção, cisto ovariano, diminuição na motilidade espermática e uterina, metrite, mamite e retenção de placenta podem ser observadas quando há deficiência de Se (SMITH; AKINBAMIJO, 2000).

2.3.2 Microminerais e imunidade

Os mecanismos antioxidantes servem para estabilizar os radicais livres, mantendo a integridade funcional e estrutural das células. Tais mecanismos antioxidantes são de extrema importância no sistema imune e na saúde dos animais (MCDONALD et al., 2002).

Os mecanismos antioxidantes que estão presentes no organismo são dependentes de nutrientes essenciais como Cu, Zn, Se, Mn, vitamina E e vitamina A. Muitos desses minerais são co-fatores de enzimas, que reduzem os metabólicos

reativos de oxigênio (MRO), como glutathione peroxidase (GSH-Px), superóxido dismutase de cobre e zinco (Cu/Zn SOD) e superóxido dismutase de manganês (Mn SOD)(KURZ, 2004).

As exigências de microminerais na dieta, necessárias para otimizar a função imune, na maioria das vezes são mais altas que o máximo recomendado para crescimento e prevenção da deficiência clínica. Certos minerais como S, Mo, e Fe possuem a habilidade de inibir a eficiência do Cu, Zn, Se e Mn, pois se ligam a esses no rúmen diminuindo sua absorção (KURZ, 2004).

2.3.3 Cobre

O cobre possui número atômico 63,5 e está presente em diversas enzimas e proteínas. Suas funções fisiológicas estão ligadas a respiração celular, formação óssea, funções cardíacas, desenvolvimento do tecido conectivo, mielinização da medula espinhal, processos de queratinização e pigmentação. É um nutriente considerado tanto essencial quanto tóxico, e está presente como co-fator catalítico essencial em importantes metaloenzimas como a Cu-Zn superóxido dismutase, citocromo oxidase, lisil oxidase, dopamina- β -hidroxilase e tirosinase (MCDOWELL, 2003).

O cobre é componente de várias enzimas, como a citocromo oxidase, necessária para o transporte de elétrons durante a respiração aeróbica; lisil oxidase que catalisa a formação do colágeno e elastina; ceruloplasmina, que é essencial para absorção e transporte de ferro necessário para a síntese de hemoglobina; superóxido dismutase que protege as células dos efeitos tóxicos no metabolismo do oxigênio (NRC, 2001). É parte da citocromo-oxidase, enzima oxidase terminal na cadeia respiratória, que catalisa a redução de O₂ para água, passo importante na respiração celular (MCDOWELL, 2003). Por estar envolvido no mecanismo de oxidação, sua deficiência leva a transtornos no metabolismo oxidativo, podendo manifestar-se de múltiplas formas (GONZÁLEZ; SILVA, 2006).

Segundo Ricciardino e Piccinali (1998), podem ser relacionado ao cobre outras funções, como, regulação dos processos vitais de crescimento e diferenciação celular, respiração celular, formação da melanina, síntese de colágeno e elastina, e é essencial na formação da hemoglobina. Interfere também no tamanho dos adipócitos, na velocidade da lipólise e na composição lipídica em todos os sítios de deposição. Também auxilia o sistema imunológico e a reprodução.

A absorção de cobre em ruminantes é baixa (1 a 10%) relativa aos valores reportados para não ruminantes. A baixa absorção de cobre em ruminantes é devido a complexas interações que ocorrem no rúmen. Antes do completo desenvolvimento do rúmen a absorção de cobre é alta (70-85%), mas se reduz a até no máximo 10% após o desmame (SPEARS, 2000). A excreção do Cu é feita pelas fezes, bile, urina, leite e transpiração (MCDOWELL, 2003), e a disponibilidade em ruminantes é baixa, por sofrer interações com antagonistas formando agentes insolúveis pouco utilizados (SPEARS, 2000). As vantagens fisiológicas da utilização do Cu quelatado podem estar ligadas à sua composição química que permite a rápida formação de compostos solúveis, quimicamente estáveis e que resistem a interação com antagonistas (SPEARS, 2003).

O cobre participa ativamente do sistema imune, por meio da metaloenzima (Cu, Zn, Mn dependente) superóxido desmutase, que transforma o íon superóxido em peróxido, radical livre que a enzima glutationala peroxidase eliminará durante a fagocitose (LIMA et al., 2013).

Sua deficiência pode ser primária, como resultado de uma dieta com baixos níveis desse mineral, ou secundária, resultante de uma redução na sua absorção intestinal e/ou na sua utilização após a absorção. Níveis de molibdênio (Mo) e sulfatos na dieta são os fatores mais importantes que interferem com a absorção e utilização de Cu. A razão adequada de Cu/Mo para assegurar sua disponibilidade deve ser igual ou superior a 4:1 (GONZÁLEZ; SILVA, 2006).

A deficiência de cobre está associada com resposta limitada aos antígenos e com susceptibilidade acentuada a infecções bacterianas. Os neutrófilos circulantes mantêm a capacidade para a fagocitose de organismos estranhos, mas a atividade microbicida (que depende da mediação de radicais livres) cai progressivamente. A

perda de atividade microbiocida parece estar relacionada à queda da atividade da citocromo-oxidase do neutrófilo e à falha na produção de superóxido no fagossomo (GRAHAM, 1991).

2.3.4 Manganês

O manganês tem sido reconhecido como um micromineral essencial por se tratar de um cofator das enzimas fosfoglucomutase, piruvato carboxilase e fosfenolpiruvato carboxilquinase, tendo função chave na gluconeogênese (MCCLURE; ARIAS, 1995). Parece estar também relacionado com o desenvolvimento dos órgãos genitais e funcionamento do corpo lúteo, participando ainda da síntese de colina e de colesterol, interferindo diretamente na produção de hormônios esteroidais (GONZÁLEZ; LUIZ; RIBEIRO, 2000).

Segundo Carvalho, Barbosa e McDowell (2003), o manganês é necessário ao organismo dos bovinos em diversos processos biológicos, tais como:

- Atividade enzimática – metaloenzimas Mn-dependentes como arginase, piruvato carboxilase e Mn superóxido desmutase. Em situações extremas e com a deficiência de Mn, estas enzimas podem usar o magnésio para substituir o manganês.
- Metabolismo ósseo – o Mn está presente nos mucopolissacarídeos existentes na matriz orgânica óssea. A estrutura normal dos ossos é abalada quando há deficiência de Mn, que podem se apresentar menores e frágeis.
- Reprodução – principalmente de fêmeas bovinas, através do incremento da mitose das células ovarianas da granulosa e folicular (na foliculogênese) e das células luteínicas ovarianas que formam o corpo lúteo. Isso tem reflexo direto na reprodução dos bovinos pois há o controle do nível de estrógeno e progesterona no sangue.

- Metabolismo dos lipídeos – Mn está envolvido na biossíntese de colesterol e da colina.
- Metabolismo dos Carboidratos – participando da síntese e atividade do hormônio insulina no pâncreas.
- Processo de coagulação sanguínea – Mn participa na síntese de protrombina e influencia no metabolismo da vitamina k.
- Funcionalidade e manutenção da estrutura celular – Mn participa da integridade da membrana celular.
- Sistema imunológico – juntamente com o zinco, cobre e selênio faz parte de metaloenzimas fundamentais para o desempenho normal dos neutrófilos e macrófagos.
- Funcionamento normal do sistema nervoso central.
- Síntese de mucopolissacarídeos.

A deficiência de manganês em animais adultos causa baixos índices reprodutivos, estro irregular ou deprimido, baixas taxas de concepção, abortos, natimortos e baixo peso ao nascer, problemas de ovulação, reabsorção de fetos, retardamento do cio e consequente baixa na taxa de concepção (NRC, 2001). Nas pastagens, as concentrações de manganês variam amplamente dependendo da espécie forrageira, pH e drenagem do solo. De uma maneira geral, as pastagens não apresentam deficiência em manganês (UNDERWOOD; SUTTLE, 1999) e a deficiência de manganês é rara nos bovinos em pastagens tropicais, devido aos elevados teores de Mn dessas forragens (CARVALHO; BARBOSA; MCDOWELL, 2003).

O manganês é pouco absorvido pelos ruminantes (1% ou menos). Os fatores dietéticos que podem influenciar na biodisponibilidade do manganês têm recebido pouca atenção, provavelmente porque a deficiência de manganês não é considerada um grave problema na nutrição de ruminantes (SPEARS, 2003).

2.3.5 Selênio

O selênio é um dos elementos do grupo VI localizado imediatamente abaixo do enxofre (S) e assim como este, exibe as valências -2, +4, +6. É menos volátil mais metálico e potencialmente muito mais tóxico. Paradoxalmente, o selênio (+6) é o mais oxidado e menos estável que o sulfato. O selênio pode substituir o enxofre na maioria das substâncias quelatadas, incluindo os aminoácidos que contêm enxofre (VAN SOEST, 1994).

O selênio se caracteriza por uma versátil capacidade de oxiredução, sendo tal característica fundamental para sua atuação no centro ativo da enzima glutathiona-peroxidase, responsável pela eliminação de peróxidos (radicais livres). Grande parte do selênio absorvido é estocada no fígado (UNDERWOOD; SUTTLE, 1999). Ele também atua como parte integrante de enzimas tais como a glutathiona-peroxidase (responsável pela remoção de peróxidos) e a iodotironina-deiodinase (conversão da tiroxina para sua forma ativa) (WILDE, 2006).

Sua disponibilidade está relacionada com a forma química: quanto mais reduzida, menor será sua disponibilidade para os animais. Os ruminantes absorvem o selênio (em torno de 54%) menos eficientemente que os não-ruminantes (80%), pois o rúmen é um ambiente químico que favorece a redução (Ortolani, 2002). Há diminuição na atividade da glutathiona-peroxidase (GONZÁLEZ; SILVA, 2006). Esta determinação pode se realizada para auxiliar no diagnóstico da enfermidade.

O selênio atua em diversas funções corporais, como, o crescimento, reprodução, a prevenção de enfermidades e a integridade dos tecidos. A função biológica mais conhecida do selênio está associada à vitamina E, com atividade antioxidante e anti-inflamatória (RICCIARDINO; PICCINALI, 1998).

Outra importante função é na produção de hormônios da tiróide, quando participa da constituição da enzima iodotironina deiodinase, responsável pela conversão de T4 em T3 (BECKETT; ARTHUR, 2005).

Há provavelmente cerca de 50 tipos de selenoproteínas nos seres vivos, sendo que mais de 20 delas já foram estudadas e tiveram seus papéis identificados e

descritos pelos pesquisadores. Todas têm em comum a presença de Se ligado ao aminoácido cisteína em sua cadeia de peptídeos, que forma seu sítio ativo (CARVALHO; BARBOSA; MCDOWELL, 2003). A maioria destas proteínas tem potencial Redox, ou seja, reação que leva ao acréscimo ou retirada de elétrons, criando o sistema oxidação-redução que controla todas as funções vitais das células, inclusive o seu tempo de vida. Segundo Carvalho, Barbosa e McDowell (2003), a atividade dos macrófagos e neutrófilos está intimamente relacionada com o selênio, pois as selenoproteínas estimulam a atividade de encontrar e destruir os invasores microbianos no organismo de mamíferos. As selenoproteínas atuam no sistema imunológico dos mamíferos da seguinte forma:

- Selenoproteínas estruturais fornecem aminoácidos e Se para a síntese de glóbulos brancos, pela medula óssea.
- Selenoproteínas antioxidantes auxiliam no processo inflamatório permitindo que haja a leucopedese, ou seja, a saída dos glóbulos brancos da corrente sanguínea para os tecidos, através das paredes íntegras dos vasos. Isso só ocorre quando o tecido é atacado e sofre um processo inflamatório.
- Selenoproteínas “limpam a sujeira” que fica após ataque dos glóbulos brancos a um patógeno microbiano.

Para ruminantes o selênio é encontrado em diversos alimentos como cereais, leguminosas e forragens. No Brasil ele não se encontra facilmente disponível para os bovinos criados em regime de pastejo, pois como a grande maioria dos nossos solos é altamente lixiviado e com baixo teor de matéria quelatada, o selênio se perde facilmente (CARVALHO; BARBOSA; MCDOWELL, 2003).

2.3.6 Zinco

O zinco é componente de algumas metaloenzimas tais como superóxido-dismutase, anidrase carbônica, álcool-desidrogenase, carboxipeptidase, fosfatase

alcalina, DNA e RNA polimerases, com efeitos nos metabolismos dos carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (NRC, 2001). O local de absorção de zinco em animais não ruminantes é o intestino delgado (UNDERWOOD; SUTTLE, 1999) e nos ruminantes é no rúmen (NRC, 2001). A principal via de excreção é pelo fígado através das fezes, com pequenas quantidades eliminadas pela urina, onde a quantidade de zinco endógeno excretado pelas fezes é influenciado pelas necessidades do animal (MCDOWELL, 2003). A principal forma de armazenamento do zinco é como metalotioneína no fígado. Sua síntese é induzida pela presença do elemento no fígado (MCDOWELL, 2003).

A enzima metalotioneína representa a maior reserva de zinco no organismo animal e está presente em altas concentrações no fígado, rins, pâncreas e intestino. Apesar do Zn estar distribuído e estocado em diversos tecidos, há considerável dificuldade em mobilizar rapidamente essas reservas em casos de deficiência (MCDOWELL, 2003).

O Zn é um elemento essencial nas metaloenzimas como: anidrase carbônica (AC), polimerase de ácido nucleico e também na Cu/Zn SOD. A anidrase carbônica tem importante papel na regulação do pH do rúmen e absorção dos ácidos graxos voláteis, e a alta concentração de AC no epitélio ruminal aumenta a absorção dos ácidos graxos voláteis. Ou seja, o CO₂ absorvido nas células epiteliais combina com H₂O na presença de AC e produz HCO₃⁻. A produção de HCO₃⁻ no epitélio ruminal resulta em gradiente de próton favorável a absorção de ácidos graxos voláteis. A polimerase de ácido nucleico, responsável pela síntese de RNA, contém dois átomos de Zn. Animais deficientes em Cu e Zn mostram reduzida capacidade fagocitária. Fato associado à diminuição da disponibilidade da enzima Cu/Zn SOD requerida pelos macrófagos e neutrófilos (BATISTA, 2009).

Existem vários sítios potenciais em que os microminerais podem afetar o sistema imunológico. Muitos deles envolvem o Zn e sua deficiência é consistentemente associada com aumento da morbidade e mortalidade (KINCAID, 1995). A resposta imune a vários patógenos causa rápida diminuição do Zn sanguíneo. A deficiência de Zn está associada com redução da fagocitose e ação dos macrófagos, diminuição da população de linfócitos e atrofia do baço e timo. A resposta do linfócito T à mitogênese

e às citocinas são inibidas na deficiência de Zn. Também é importante na ativação das células B.

Quando há deficiência de zinco em algumas espécies, e provavelmente em ruminantes, a contagem de linfócitos circulantes no sangue diminui e há redução do peso do timo, o primeiro órgão formado por tecido linfóide, que surge na vida embrionária e forma a base inicial do sistema linfático durante o crescimento do animal até atingir a puberdade. Este órgão está ligado à produção de linfócitos, isto é, células de defesa do organismo contra qualquer célula diferente e que não pertença ao código genético do hospedeiro, que carregam em sua memória genética a resposta imune específica para cada tipo de bactéria, vírus, entre outros; e sem essa resposta imune plena há uma profunda depressão na capacidade de defesa do animal, que adoece facilmente, quando é desafiado por microrganismos patogênicos (CARVALHO; BARBOSA; MCDOWELL, 2003).

O efeito protetor das vacinações é muito prejudicado quando há deficiência nutricional, em especial do elemento zinco. Pois para a efetiva proteção vacinal é necessária uma memória imunológica máxima por parte do linfócito T, oriundo do timo. Sem esta memória não haverá uma boa resposta imune. A vacinação contra qualquer doença (brucelose, leptospirose, aftosa, clostridiose, IBR, etc.) possui respostas imunes ineficientes, ou mesmo insuficientes, para proteção dos animais, caso sejam desafiados (CARVALHO; BARBOSA; MCDOWELL, 2003).

2.4 ENDOMETRITE

A endometrite é definida como inflamação do endométrio. É uma doença local e não é acompanhada por sinais sistêmicos (GILBERT, 2016). Sheldon et al. (2006) propuseram que endometrite é determinada pela identificação da eliminação de catarro genital purulento, sem a manifestação de sintomas sistêmicos, a partir dos 21 dias pós-parto ou eliminação de catarro genital de aspecto muco-purulento após os 26 dias pós-parto. Sheldon et al. (2009) afirmaram que a função ovariana em bovinos está

diretamente prejudicada em casos de endometrite, dependendo da gravidade da contaminação uterina no puerpério, pois em alguns casos as endotoxinas inibem a secreção pulsátil do LH na glândula pituitária suprimindo a secreção hipotalâmica de GnRH. Alguns animais com liberação normal de LH não apresentam um aumento da concentração sanguínea de estradiol, sugerindo desta forma que as endotoxinas têm ação direta sobre os ovários (BATTAGLIA et al., 2000). Endotoxinas bacterianas estimulam o sistema imunológico ativando a liberação de citocinas como as interleucinas I, VI e VIII que por sua vez estimulam o fígado a secretar proteínas de fase aguda (SHELDON et al., 2001; BEUTLER et al., 2003).

A endometrite citológica foi definida como um quadro de inflamação endometrial, normalmente determinada pela citologia, na ausência de secreção purulenta identificada através da vaginoscopia. Em animais sem sinais aparentes a enfermidade é diagnosticada pela mensuração da proporção de neutrófilos presentes em um esfregaço de células endometriais coletadas por lavado uterino ou pelo uso de escova citológica (SHELDON et al., 2006)

2.4.1 Exame citológico

Gilbert et al. (1998) e Kasimanickan et al. (2004), defendem que a citologia endometrial ao contrário da biópsia uterina é um método prático, menos oneroso e eficiente para a avaliação dos processos infecciosos uterinos, ressaltando ainda que os neutrófilos são a principal linha de defesa do endométrio.

Kasimanickan et al. (2004) realizaram um trabalho pioneiro para avaliação dos métodos de diagnóstico das infecções uterinas por meio da utilização da citologia endometrial e da verificação da presença de fluidos uterinos pelo método ultrassonográfico. Esses autores estabeleceram que a porcentagem de neutrófilos em um processo infeccioso uterino inicial entre os dias 20 e 33 pós-parto e entre os 34 a 47 dias pós-parto eram, respectivamente, superiores a 18% e 10%. Concluíram, através de correlações com índices reprodutivos como intervalo entre partos, número

de inseminações e dias em aberto, que esta condição, assim como a detecção de fluidos uterinos acarretaria prejuízos no desempenho reprodutivos. Estas constatações confirmaram estudos anteriores que destacaram serem os neutrófilos as primeiras e mais importantes células fagocitárias recrutadas da circulação periférica para o lúmen uterino durante um processo infeccioso local (ZERBE et al., 2002). Zerbe et al. (2003) ainda verificaram que a interleucina 8 era responsável por esta migração de neutrófilos para o útero.

Em outro estudo, Kasimanickan et al. (2005) compararam a eficiência do método de colheita por meio do lavado uterino e pela escova citológica, para avaliar a citologia endometrial, com o intuito de diagnosticar a endometrite não aparente em vacas no puerpério. Evidenciaram que os resultados obtidos pela técnica da escova citológica foram superiores na detecção de animais com endometrite, indicando que este é um meio mais consistente e confiável de colheita que aquela do lavado uterino para avaliar a citologia endometrial em vacas no puerpério.

2.4.2 Corrimento vaginal purulento (CVP)

Para o diagnóstico endometrite clínica, pode ser utilizada a verificação do conteúdo da vagina quanto à presença de pus (BRETZLAFF, 1987; SHELDON; NOAKES, 1998; LEBLANC et al., 2002). O método é mais simples pode ser realizado por um exame manual da vagina, para retirar o muco para inspeção (SHELDON et al., 2002b). A vantagem desta técnica é que é barato, rápido, fornece informações sensoriais adicionais, como a detecção de lacerações vaginais e detecção do odor do muco na vagina. A vaginoscopia pode ser realizada usando vaginoscópios autoclaváveis, metal ou descartáveis, que permitem a inspeção do conteúdo da vagina. Pode ser utilizado também um dispositivo para o exame de muco vaginal (Metricheck®, Simcro, Nova Zelândia) que consiste de uma haste de aço inoxidável com um hemisfério de borracha que é utilizada para recuperar o conteúdo vaginais (SHELDON et al., 2006). Vários sistemas de pontuação tem sido descritos para estimar a gravidade

clínica da endometrite (MURRAY; ALLISON; GARD, 1990; SHELDON; NOAKES, 1998; WILLIAMS et al., 2005) . O muco vaginal pode ser marcado pela quantidade de muco recuperado, bem como o odor (pontuação 0 para nenhum odor e pontuação 3 para um odor fétido) (WILLIAMS et al., 2005). A pontuação do avaliador reflete a presença de carga semiquantitativa de certas bactérias no útero.

Em estudo realizado por Williams et al. (2005), a secreção muco-purulenta foi associada com *F. necrophorum* e a secreção purulenta foi associada com *A. pyogenes* e espécies de *Proteus*, enquanto um odor fétido foi associado a uma maior carga de *A. pyogenes*, *E. coli*, *Streptococci* e *Mannheimia haemolytica*. Muco claro com manchas de pus não foi associado com a presença de maior número de bactérias patogênicas no lúmen uterino, mas os efeitos sobre a fertilidade não foram consistentes (LEBLANC et al., 2002; WILLIAMS et al., 2005).

2.5 SUPLEMENTO DE MICROMINERAIS INJETÁVEL

Muitos estudos já foram realizados utilizando o suplemento de microminerais injetável (SIM) contendo zinco, manganês, selênio e cobre. Palomares et al. (2016) avaliaram o efeito do SIM nas respostas humoral e imune mediada por células (CMI) aos antígenos de vacina em bezerros leiteiros que receberam uma vacina viral modificada contendo BVDV, BHV1, PI3V e BRSV. O grupo que recebeu o tratamento com SIM concomitantemente com a vacinação com MLV resultou em títulos de anticorpos mais elevados para BVDV1 no dia 28 após a vacinação em comparação com o grupo de controle ($P = 0,03$). Os bezerros tratados com SIM mostraram um aumento mais cedo na proliferação de PBMC a BVDV1 após vacinação em comparação com o grupo de controle. A proliferação de PBMC após estimulação de BVDV tendeu a ser mais elevada no dia 14 após a vacinação no grupo SIM do que no grupo de controle ($P = 0,08$). Os bezerros que receberam SIM mostraram maior proliferação de PBMC à estimulação com BRSV no dia 7 após a vacinação em comparação com o grupo de controle ($P = 0,01$). Além disso, os bezerros no grupo SIM

também tiveram uma produção aumentada de IFN γ por PBMC após a estimulação com BRSV no dia 21 após a vacinação em comparação com o dia 0 ($P < 0,01$).

Ganda et al. (2016) avaliaram os efeitos da suplementação SIM na contagem de células somáticas (CCS), escore linear (SL), produção de leite, teor de gordura e proteínas de leite, cura da mastite subclínica e incidência de mastite clínica em vacas holandesas com CCS elevado. O tratamento não afetou as concentrações séricas de cálcio, magnésio, fósforo, potássio, cobre, ferro, manganês, selênio e zinco. O SIM não melhorou a cura geral da mastite subclínica (controle = 42,8 e SIM = 46,5%), embora se tenha observado uma tendência em vacas com 3 ou mais lactações (controle = 27,1 e SIM = 40,0%). A suplementação não reduziu a incidência de mastite clínica (controle = 48,2 e SIM = 41,7%); Entretanto, tendeu a reduzir a proporção de vacas diagnosticadas com mastite clínica crônica (controle = 16,9 e SIM = 12,0%), particularmente entre as vacas de primeira lactação (controle = 18,4 e SIM = 7,6%). A cura da mastite subclínica foi associada a maiores concentrações sérica de fósforo e selênio em 30 dias. A suplementação com SIM em vacas com SCC elevado não teve efeito sobre a produção de leite, teor de gordura e proteína de leite, CCS e SL.

Bicalho et al. (2014) entre outros objetivos, investigaram o efeito do SIM no metabolismo, função imunológica e saúde animal em condições de campo envolvendo um rebanho leiteiro de alta produção. Os pesquisadores descrevem que o grupo que foi tratado com SIM teve um aumento da concentração sérica de Cu, Se e Zn. Por outro lado, o SIM não afetou os metabolitos energéticos nem os parâmetros de estresse imunológico e oxidativo. A concentração sérica de Ca, Cu, K, Mg, Mo, Ps, Pt, Se e Zn variou de acordo com os dias em relação ao parto. As vacas com retenção de placenta reduziram as concentrações séricas de Ca, Mg, Mo e Zn quando comparadas às vacas sem retenção de placenta. As vacas afetadas com metrite apresentaram concentrações séricas significativamente menores de Ca, Mo, P solúvel, P total, Se e Zn do que as vacas não afetadas. A concentração sérica de Ca, Cu, Mo e Zn foi reduzida em vacas diagnosticadas com endometrite em comparação com as não afetadas.

Texeira et al. (2014) testaram o efeito da aplicação de 2 injeções de SIM com 3 e 30 dias após o nascimento na imunidade, saúde e crescimento de bezerros leiteiros durante o período de pré-desmama. Esses autores observaram que aos 14 dias de

vida, os bezerros tratados com sim tinham um aumento da atividade de neutrófilos em comparação com bezerros do grupo controle. Além disso, os bezerros tratados com SIM tiveram maior atividade de GPx no dia 14 após o nascimento do que os vitelos de controle. O tratamento com SIM reduziu a incidência de diarreia (SIM = 41,7% e controle = 49,7%) e incidência combinada de pneumonia ou otites ou ambos (SIM = 41,7% e controle = 49,1%). Adicionalmente, o GPx foi maior para bezerros diagnosticados com otite em no dia 35 após o nascimento. As concentrações séricas de SOD e de haptoglobina não foram afetadas pelo tratamento ou pela doença. Além disso, não foram observados efeitos sobre o ganho médio diário e a sobrevivência entre os bezerros tratados com SIM.

Machado et al. (2013) avaliaram o efeito do suplemento de microminerais injetável aplicado aos 230 e 260 dias de gestação e 35 dias após o parto, sobre a saúde, produção de leite e desempenho reprodutivo de vacas holandesas em lactação. Eles observaram que para as vacas multíparas, o SIM reduziu significativamente as contagens de células somáticas em comparação com as vacas de controle. A incidência de mastite subclínica para as vacas do grupo SIM e controle foi de 10,4% e 8,0%, respectivamente ($P = 0,005$). O efeito principal do tratamento na mastite clínica não foi significativo, mas a interação do tratamento e da paridade foi significativa. Para vacas multíparas, a incidência de mastite clínica para controle e vacas SIM foi de 25,4% e 19,7%, respectivamente ($P = 0,03$). Adicionalmente, as vacas de controle tinham aumentado as probabilidades de mortinatalidade e endometrite (odds ratio 1,69 e 1,30, respectivamente). A incidência de endometrite foi de 34,2% e 28,6% para as vacas SIM e controle, respectivamente ($P = 0,039$), porém o tratamento não teve efeito sobre o desempenho reprodutivo, produção de leite e outras de doenças estudadas.

Em um outro estudo Sales et al. (2011) usou o SIM para avaliar a sincronização de estro para transferência de embrião, taxa de concepção e perda de prenhez de novilhas cruzadas que foram tratadas 17 dias antes da transferência do embrião. A administração SIM não aumentou o número de novilhas sincronizadas com sucesso comparativamente aos ao grupo controle que não recebeu tratamento (grupo SIM = 82,1% (308/375) e grupo controle = 83,1% (375/451); $P = 0,76$). No entanto, as novilhas pertencentes ao grupo SIM ($n = 219$) tiveram uma probabilidade de estarem

prenhez de 1,58 vezes e 1,72 vezes mais ($P = 0,005$) do que quando comparadas com o grupo controle ($n = 276$) respectivamente. Em contraste, o tratamento com SIM não reduziu significativamente a taxa de perda de gravidez (grupo controle = 17,2% (17/99) e grupo SIM = 10,6% (11/105); $P = 0,18$).

3 OBJETIVOS

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da utilização de um suplemento de microminerais injetável contendo cobre, manganês, selênio e zinco, 20 dias antes da inseminação artificial, sobre a saúde uterina, perfil de progesterona, desenvolvimento do embrião e fertilidade de vacas Holandesas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS E PROPRIEDADES UTILIZADAS

Foram utilizadas vacas Holandesas de alta produção, em lactação, com idade entre 2 a 8 anos, distribuídas em 3 fazendas na região de Ithaca, NY, USA. Os animais eram ordenhados três vezes por dia, com intervalos de aproximadamente 8 horas, alimentados duas vezes por dia, com silagem de milho como volumoso e com um concentrado à base de farinha de milho e soja. A ração total foi equilibrada para atender ou exceder as necessidades nutricionais mínimas para o gado leiteiro segundo o NRC (NRC, 2001). Os animais tinham acesso a água fresca *ad libitum* e eram criados no sistema free-stall, com camas com colchão e areia.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento foi dividido em dois estudos. O primeiro ocorreu em duas fazendas, com total de 306 animais que foram distribuídos em dois grupos. Um grupo foi tratado com um suplemento injetável de microminerais (SIM) contendo 75 mg de cobre, 50 mg de manganês, 25 mg selênio e 300 mg de zinco (150 animais; Grupo Tratamento) e o outro grupo não foi tratado (156 animais; Grupo Controle). Os animais foram bloqueados por paridade (primíparas e multíparas), fazenda (fazenda 1 e 2) e período de espera voluntária (pequeno período de espera – PPE e longo período de espera - LPE). Dentro de cada bloco, em relação ao grupo de tratamento e controle, os animais foram designados aleatoriamente para um dos dois grupos. O grupo tratado recebeu duas doses de 5 ml do SIM com 230 e 260 dias de gestação e uma terceira dose 20 dias antes da inseminação artificial, sendo 40 ± 3 dias em lactação (DL) para o grupo PPE e 68 ± 3 DL para o grupo LPE (Figura 1).

O segundo estudo ocorreu em uma terceira fazenda, aonde 130 animais foram divididos em dois grupos, 70 animais receberam o suplemento injetável de microminerais (SIM) contendo 75 mg de cobre, 50 mg de manganês, 25 mg selênio e 300 mg de zinco com 230 e 260 dias de gestação e uma terceira dose 20 dias antes da inseminação artificial, e 60 animais que ficaram como grupo controle e não receberam nenhum tratamento. Os animais foram bloqueados por paridade, sendo 30 primíparas e 30 multíparas por grupo. Nessa fase foi avaliado a concentração de progesterona e de IGF-1, o diagnóstico de gestação e a morfometria da vesícula amniótica e do embrião/feto.

Durante o período do estudo, alguns animais foram vendidos, ou morreram e ou foram descartados.

Figura 1 - Cronograma de sincronizações

Legenda – SIM = Suplemento injetável de microminerais, IA = Inseminação Artificial e PE = Período de Espera.

4.3 SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO (IATF)

Os animais foram inscritos em protocolos Ovsynch duplo (PPE e LPE) para sincronização da ovulação para IATF de acordo com a Figura 2.

Figura 2 - Protocolo de sincronização da ovulação Ovsynch duplo

4.4 AVALIAÇÃO DO CORRIMENTO VAGINAL PURULENTO E ENDOMETRITE CITOLÓGICA

As avaliações para o corrimento vaginal e endometrite citológica ocorreram com 33 ± 3 DL e 50 ± 3 DL para PPE e 33 ± 3 DL e 78 ± 3 DL para LPE, de todas as vacas que participaram do primeiro estudo (Figura 3).

Para a avaliação do corrimento vaginal purulento foi usado o dispositivo Metrichcek®. Os corrimentos vaginais foram marcados de acordo com (SHELDON et al., 2006) e as vacas foram classificadas como tendo CVP se a pontuação do corrimento vaginal fosse > 2 .

As amostras da citologia endometrial foram recuperadas através da técnica cytobrush como descrito por (LIMA et al., 2013), onde foram contadas duzentas células em cada lâmina utilizando um microscópio com aumento de 400 x para determinar a porcentagem de células polimorfo nucleares (PMN) em relação ao número total de leucócitos e células do endométrio. Vacas com uma proporção de polimorfonucleares (PMN) $\geq 5\%$ foram classificadas como tendo endometrite citológica (GILBERT et al., 2005).

Figura 3 - Cronograma de avaliação dos corrimentos vaginais e endometrite citológica

Legenda – SIM = Suplemento injetável de microminerais, IA = Inseminação Artificial, PE = Período de Espera, CU = Citologia Uterina e MC = Metriceck

4.5 AMOSTRAGEM DE SANGUE PARA OS PERFIS DE PROGESTERONA

As amostras de sangue para a análise da concentração de progesterona e de IGF-1, foram coletadas por punção do vaso sanguíneo, usando tubos de vácuo contendo heparina (Vacutainer; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Foram coletadas amostras de sangue nos dias 0 (dia IA), 3, 7, 10, 14, 17, 21, 26, 30, após a IA (Figura 3). As amostras foram imediatamente colocadas em gelo após a coleta e centrifugadas a $2400 \times g$ durante 30 min a 4°C para separação do plasma. O plasma foi congelado a -80°C no mesmo dia da colheita. As concentrações de progesterona foram determinadas de acordo com o procedimento descrito por (MUNRO; STABENFELDT, 1984) com modificações descritas por (GALVÃO et al., 2004). Os animais foram considerados púberes quando as concentrações plasmáticas de progesterona foram superiores a $1,0 \text{ ng / mL}$.

Figura 4 - Cronograma para coleta de sangue em série (P4) e morfometria do embrião

Legenda – SIM = Suplemento injetável de microminerais, IA = Inseminação Artificial, PE = Período de Espera, AS = Amostra de Sangue, CU = Citologia Uterina, MC = Metriceck, US = Ultrassonografia e P4 = Progesterona.

4.6 DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO

A gestação foi diagnosticada no dia 30 pós IA com a ultrassonografia transretal do útero, através de um ultrassom portátil (Ibex, El Medical Imaging, Loveland, CO), equipado com um transdutor linear - matriz de 7,5 MHz. As vacas diagnosticadas como prenhes positiva foram reexaminadas 35 dias mais tarde, para a detecção de prenhez viável no dia 65 ± 3 . A taxa de prenhez foi calculada com o número de vacas prenhes no dia 30 ou 65, dividido pelo número total de vacas. Perda de prenhez entre os dias 30 e 65, foi calculado como o número de vacas prenhes no dia 30 menos o número de vacas prenhez no dia 65, e depois dividido pelo número de vacas prenhez no dia 30.

4.7 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DA VESÍCULA AMNIÓTICA E DO EMBRIÃO/FETO PELO ULTRASSOM

O subconjunto de vacas prenhes no dia 30 pós IA, foram reexaminado pela ultrassonografia transretal com um ultrassom portátil (Ibex, El Medical Imaging,

Loveland, CO), equipado com um transdutor linear de 7,5 MHz-array nos dias 36 e 48 (Figura 3), para avaliação morfométrica da vesícula amniótica e do embrião/feto de acordo com (RIBEIRO et al., 2014). A estrutura que conteve o posicionamento ideal e orientação do feto foi identificada e utilizada para medir o diâmetro longitudinal e transversal da vesícula amniótica extraindo duas linhas transversais de ângulo de 90°. O comprimento cabeça-nádega e diâmetro abdominal do embrião/feto também foram medidos.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Antes das análises propriamente ditas, os dados não binários foram analisados em relação à presença de informações discrepantes (“outliers”) e normalidade dos resíduos (Shapiro-Wilk). Quando a premissa de normalidade não foi atendida, a transformação logarítmica foi necessária. Estes dados foram então analisados de acordo com o PROC MIXED para modelos mistos (SAS Inst. Inc., Cary, NC), tendo os momentos de coleta (avaliação 1 e 2) como medidas repetidas.

Para essas análises, dentre as estruturas de covariância testadas, a que melhor se ajustou ao modelo estatístico foi escolhida baseado no menor valor do critério de informação Akaike corrigido (AICC). O modelo incluiu efeito fixo de Tratamento, de Tempo e a interação entre Tempo e Tratamento. Efeito de Bloco, formado em função das 2 fazendas, paridade e período voluntário de espera, foi incluído no modelo como efeito aleatório. Adicionalmente, as comparações de médias entre os tratamentos e entre os tempos foram realizadas através do teste de Tukey.

Já os dados binários, “resposta ao tratamento, cura ou não”, foram analisados de acordo com o PROC FREQ, usando o teste de qui- (SAS Inst. Inc., Cary, NC). Para todos os testes realizados foi adotado o nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos durante o estudo estarão compilados neste capítulo em tabelas e gráficos.

5.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

O número de animais em cada grupo experimental, paridade, período voluntário de espera e fazenda, está descrito na tabela 1.

Tabela 1 - Número de animais em cada grupo experimental, paridade, período voluntário de espera e fazenda

	Total de animais	
Controle	50,98%	(156/306)
Tratamento	49,02%	(150/306)
Primipara	37,58%	(115/306)
Multipara	62,42%	(191/306)
CPE	49,35%	(151/306)
LPE	50,65%	(155/306)
Fazenda 1	35,95%	(110/306)
Fazenda 2	64,05%	(196/306)

Legenda: CPE = Curto período de espera e LPE = Logo período de espera

O número de animais por tratamento para paridade, período voluntário de espera e fazenda, está descrito na tabela 2.

Tabela 2 - Número de animais por tratamento para paridade, paridade, período voluntário de espera e fazenda

	Controle		Tratamento	
Primipara	50,43%	(58/115)	49,57%	(57/115)
Multipara	51,31%	(98/191)	48,69%	(93/191)
CPE	48,34%	(73/151)	51,66%	(78/151)
LPE	53,55%	(83/155)	46,45%	(72/155)
Fazenda 1	51,82%	(57/110)	48,18%	(53/110)
Fazenda 2	50,51%	(99/196)	49,49%	(97/196)

Legenda: PE = Curto período de espera e LPE = Logo período de espera

5.2 AVALIAÇÃO DO CORRIMENTO VAGINAL PURULENTO

A avaliação do corrimento vaginal purulento não apresentou diferença estatística entre os grupos estudados nas duas avaliações (avaliação 1 $P = 0,4429$ e avaliação 2 $P = 0,7648$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Avaliação geral do corrimento vaginal purulento

	Controle		Tratamento		Valor de P
Avaliação 1	15,58%	(24/154)	18,92%	(28/148)	0,4429
Avaliação 2	11,59%	(16/138)	12,77%	(18/141)	0,7648

Na tabela 4 apresenta-se o resultado para a avaliação do corrimento vaginal purulento entre as fazendas. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais nas duas avaliações, mas foi encontrado uma tendência estatística na segunda avaliação na fazenda 2 ($P = 0,0726$), onde os animais que receberam SIM apresentaram um menor número de casos positivos para avaliação do corrimento vaginal purulento comparando com os animais do grupo controle (7,46 e 9,22% respectivamente).

Tabela 4 - Avaliação do corrimento vaginal purulento entre as fazendas

Tabela 4 – Avaliação do conteúdo vaginal positivo entre as fazendas					
Positivo	Controle		Tratamento		Valor de P
Avaliação 1					
Fazenda 1	16,07%	(9/56)	19,23%	(10/52)	0,6666
Fazenda 2	14,63%	(12/82)	16,90%	(12/71)	0,7006
Avaliação 2					
Fazenda 1	12,12%	(8/66)	17,57%	(13/57)	0,3651
Fazenda 2	9,22%	(13/74)	7,46%	(5/67)	0,0726

Quando foi bloqueado pelo o período voluntário de espera, não foi encontrado diferença estatística entre os grupos experimentais nas duas avaliações. (Tabela 5).

Tabela 5 - Avaliação do corrimento vaginal purulento entre os períodos voluntário de espera

Tabela 5 - Avaliação do conteúdo vaginal paduente entre os períodos voluntário de esp.					
Positivo	Controle		Tratamento		Valor de P
Avaliação 1					
CPE	16,67%	(12/72)	20,78%	(16/77)	0,5208
LPE	14,63%	(12/82)	16,90%	(12/71)	0,7006
Avaliação 2					
CPE	12,12%	(8/66)	17,57%	(13/74)	0,3676
LPE	11,11%	(8/72)	7,46%	(5/67)	0,4604

Legenda: CPE = Curto período de espera e LPE = Logo período de espera.

A tabela 6, apresentasenta-se os resultados da avaliação do corrimento vaginal quando foi bloqueado por pariedade, não foi encontrada diferença estatística entre os grupos experimentais nas duas avaliações.

Tabela 6 - Avaliação do corrimento vaginal purulento entre as pariedades

Tabela 3 - Análise de conteúdo vaginal, parturiente entre as paridade					
Positivo	Controle		Tratamento		Valor de P
Avaliação 1					
Primipara	12,28%	(7/57)	22,81%	(13/57)	0,1395
Multipara	17,53%	(17/7)	16,48%	(15/91)	0,8493
Avaliação 2					
Primipara	13,21%	(7/53)	16,36%	(9/55)	0,6444
Multipara	10,59%	(9/85)	10,47%	(9/86)	0,9791

5.3 ENDOMETRITE CITOLÓGICA

No exame de endometrite citológica, não teve diferença entre os grupos experimentais na primeira avaliação $P = 0,9249$ e na segunda avaliação $P = 0,9264$ (Tabela 7).

Tabela 7 - Avaliação geral da endometrite citológica

Positivo	Controle		Tratamento		Valor de P
Avaliação 1	40,26%	(62/154)	39,73%	(58/146)	0,9249
Avaliação 2	12,41%	(17/137)	12,78%	(17/133)	0,9264

Na tabela 8, apresentam-se os dados para endometrite citológica quando foi bloqueado por fazendas. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais nas duas avaliações.

Tabela 8 - Avaliação da endometrite citológica entre as fazendas

Tabela 6 - Avaliação da endometrite crônica entre as fazendas					
Positivo	Controle		Tratamento		Valor de P
Avaliação 1					
Fazenda 1	37,50%	(21/56)	44,23%	(23/52)	0,7469
Fazenda 2	41,84%	(41/98)	37,23%	(25/94)	0,5144
Avaliação 2					
Fazenda 1	14,81%	(8/54)	12,24%	(6/49)	0,7039
Fazenda 2	10,84%	(9/83)	13,10%	(11/84)	0,6541

Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais para endometrite citológica quando foi bloqueado por período voluntário de espera nas duas avaliações (Tabela 9).

Tabela 9 - Avaliação da endometrite citológica entre os períodos voluntário de espera

Tabela 5 – Avaliação da endometrite crônica entre os períodos voluntários de espera					
Positivo	Controle		Tratamento		Valor de P
Avaliação 1					
CPE	43,06%	(21/72)	38,16%	(29/76)	0,5441
LPE	37,80%	(31/82)	41,43%	(29/70)	0,6487
Avaliação 2					
CPE	18,75%	(12/64)	15,49%	(11/71)	0,6152
LPE	6,85%	(6/62)	9,68%	(6/62)	0,5495

Legenda: CPE = Curto período de espera e LPE = Logo período de espera.

Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais para endometrite citológica quando foi bloqueado por lactação (Tabela 10).

Tabela 10 - Avaliação da endometrite citológica entre as paridades

Tabela 16 - Avaliação da endometrite crônica entre as paridades					
Positivo	Controle		Tratamento		Valor de P
Avaliação 1					
Primipara	36,84%	(21/57)	33,93%	(19/56)	0,7461
Multipara	42,27%	(41/97)	43,33%	(39/90)	0,8830
Avaliação 2					
Primipara	11,76%	(6/51)	9,80%	(5/51)	0,7496
Multipara	12,79%	(11/86)	14,63%	(12/82)	0,7283

Não houve efeito de tratamento sobre a quantidade PMN. Notou-se no entanto, que o tempo exerceu um efeito de diminuição de PMN, para $P = < 0,0001$. Houve uma diferença dentro de cada tratamento sobre as avaliações. A avaliação 1 teve uma maior quantidade de PMN comparada com as outras duas avaliações. (Tabela 11).

Tabela 11 - Efeito de tratamento, tempo e interação entre tempo e tratamento sobre a quantidade de PMN ao longo do experimento

Tempo	Tratamento		Parição		PVE		Fazenda		Média	DP
	Controle	SIM	Primipara	Multipara	CPV	LPV	1	2		
Avaliação 1	11,8A	14,11A	11,14	14,77	13,03	12,88	13,24	12,7	12,95A	1,31
Avaliação 2	5,5B	6,53B	5,35	6,68	5,43	6,6	7,4	4,62	6,01B	0,91
Geral	6,93	8,25	6,82	8,36	7,6	7,58	8,47	6,71	8,41	0,64

Trat P = 0,2361; Tempo P = <0,0001 e Trat*Tempo = 0,8393

Legenda: Letras diferentes em uma coluna indicam diferença entre tempos; letras diferentes em uma linha indicam diferença entre tratamentos observada em um determinado tempo; dp = desvio padrão da média; P = significância; Trat = efeito de tratamento; tempo = efeito de tempo e trat*tempo = efeito da interação entre tempo e tratamento

5.4 PERFIS DE PROGESTERONA E IGF-1

Não houve efeito de tratamento sobre o perfil de progesterona, o gráfico 1 permite a visualização do comportamento semelhante da variável entre os grupos ao longo do experimento. Notou-se, no entanto que o tempo exerceu um efeito de aumento do perfil de progesterona, para $P = 0,0001$ (Tabela 12).

Gráfico 1 - Efeito de tratamento e tempo sobre a quantidade de PMN ao longo do experimento

Legenda – SIM = Suplemento injetável de microminerais e IA = Inseminação Artificial.

Tabela 12 - Efeito de tratamento, tempo e interação entre tempo e tratamento sobre a quantidade de PMN ao longo do experimento

Tempo	Tratamento		Média	DP
	Controle	Tratamento		
0	1,41	1,74	1,57	0,22
4	1,91	2,25	2,08	0,22
7	3,01	3,11	3,06	0,22
11	3,83	3,10	3,47	0,23
14	4,12	3,84	3,98	0,22
17	4,04	4,56	4,30	0,22
21	3,43	4,27	3,85	0,23
24	3,93	4,48	4,20	0,23
28	3,68	4,22	3,95	0,23

Trat P = 0,3357; Tempo P = <0,0001 e Trat*Tempo = 0,2634

Legenda: DP = desvio padrão da média; P = significância; Trat = efeito de tratamento; tempo = efeito de tempo e trat*tempo = efeito da interação entre tempo e tratamento

Quando foi analisada a porcentagem de animais que estava púbere por tempo (animais foram consideradas púberes quando as concentrações plasmáticas de progesterona foram superiores a 1,0 ng / mL), encontrou-se diferença estatística dentre os grupos no dia 4 (dias após IA), onde a porcentagem de animais púberes no grupo que recebeu SIM foi maior que o grupo tratamento (P = 0,0319); nos dias 11 e 14, a

porcentagem de animais púberes do grupo controle foi maior que o grupo que recebeu SIM ($P = 0,0493$ e $P = 0,0323$). No dia 21 a porcentagem do grupo que recebeu tratamento com SIM ficou maior que o grupo controle ($P = 0,0376$). Nos demais dias não houve diferença estatística entre os tratamentos para a porcentagem de animais púberes (Tabela 13).

Tabela 13 - Porcentagem de animais que estavam púberes através do tempo

Dias após IA	Controle		Tratamento		Valor de P
0	27,14	(19/70)	40,00	(26/60)	0,1133
4	53,73	(36/67)	71,88	(46/64)	0,0319
7	81,16	(56/69)	80,00	(48/60)	0,8680
11	79,10	(53/67)	63,16	(36/57)	0,0493
14	87,69	(57/65)	72,12	(45/62)	0,0323
17	73,13	(49/67)	75,41	(46/61)	0,7688
21	64,52	(40/62)	81,36	(48/59)	0,0376
24	67,65	(46/68)	75,44	(43/57)	0,3380
28	79,37	(17/35)	75,93	(16/36)	0,6555

Nota: Os animais foram consideradas púberes quando as concentrações plasmáticas de progesterona foram superiores a 1,0 ng / mL

5.5 DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO

O diagnóstico de gestação foi realizado com 30 e 65 dias de prenhez, não foi encontrado diferença estatística entre os grupos estudados nas duas avaliações ($P = 0,7484$ e $P = 0,8180$ respectivamente). Quando foi analisado a perda de prenhez com 60 dias de gestação, também não foi encontrado diferença estatística (Tabela 15).

Tabela 14 - Diagnóstico de gestação com 30 e 65 dias e perda de prenhez

Tabela 14 – Diagnóstico de gestações com 30 e 65 dias e perda de prenhez					
	Controle		Tratamento		Valor de P
Diagnóstico com 30 dias					
Prenhez	26,76%	(19/71)	29,23%	(19/65)	0,7484
Diagnóstico com 65 dias					
Prenhez	21,43%	(15/70)	23,08%	(15/65)	0,8180
Perda de prenhez	18,21%	(4/19)	18,21%	(4/19)	1

5.6 MORFOMETRIA DA VESÍCULA AMNIÓTICA E DO EMBRIÃO/FETO PELO ULTRA-SOM

A avaliação da vesícula amniótica feita pelo o uso do ultrassom, demonstrou uma diferença estatística entre os grupos estudados na medida longitudinal com 36 dias de prenhez ($P = <0,0001$), aonde os animais que foram tratados com SIM apresentaram maiores que o grupo tratamento. Essa diferença não foi encontrada com as medidas transversal. Com 50 dias de prenhez, não foi encontrado diferença entre os grupos estudados para as medidas da vesícula amniótica transversal e longitudinal. Na avaliação do tamanho do embrião/feto com 36 dias de prenhez, foi encontrado diferença estatística entre os grupos estudados no comprimento cabeça-nádega ($P = <0,0001$) e abdominal ($P = 0,0001$), os animais que foram tratados com SIM apresentaram-se maiores que os animais do grupo controle. Essa diferença no comprimento cabeça-nádega e abdominal do embrião/feto não foi encontrado com 50 dias de prenhez. Esses dados estão apresentados na Tabela 16 e no gráfico 2.

Tabela 145 - Mediadas da vesícula amniótica e do embrião/feto em milímetros com 36 e 50 dias de prenhez

Dias de Prenhez	Medidas	Control	DP	Tratamento	DP	Valor de P
36 dias	VA Transversal	11,1	0,46	12,2	0,48	0,1431
	VA Longitudinal	17,3	1,1	21,8	1,13	<0.0001
	Emb. CCN	12,6	0,72	15,6	0,75	<0.0001
	Emb. AB	6,7	0,33	10	0,35	0,0001
50 dias	VA Transversal	24,8	1	24,2	1,02	0,6731
	VA Longitudinal	42,2	1,63	43,4	1,67	0,6111
	Emb. CCN	32,3	1,47	30,5	1,5	0,4125
	Emb. AB	12,7	0,52	13,1	0,53	0,6747

Legenda: VA = Vesícula Amniótica, Emb. = Embrião/Feto, CCN = Comprimento Cabeça-Nádega, AB = Abdominal e DP = Desvio Padrão

Gráfico 2 - Mediadas da vesícula amniótica e do embrião/feto em milímetros com 36 e 50 dias de prenhez

Legenda: VA = Vesícula Amniótica, Emb. = Embrião/Feto, CCN = Comprimento Cabeça-Nádega, AB = Abdominal

6 DISCUSSÃO

6.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Conforme foi descrito nos materiais e métodos, durante o passar do tempo no estudo, houve perda de amostra entre as avaliações, por não se localizar o animal no grupo, ou porque o animal foi descartado ou morreu. Mas ainda assim permitiu a geração de informações valiosas para o entendimento desta enfermidade e de seu tratamento.

6.2 MINERAIS

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da utilização de um suplemento de microminerais injetável contendo cobre, manganês, selênio e zinco, 20 dias antes da Inseminação Artificial, sobre a saúde uterina, perfil de progesterona e desenvolvimento do embrião de vacas Holandesas. É importante ressaltar que o perfil mineral das vacas de estudo não foi estabelecido. No entanto, o estudo foi realizado em fazendas bem manejadas que não tinham histórico de deficiências minerais e onde as dietas também eram bem manejadas de acordo com as exigências do NRC.

Este estudo avaliou uma suplementação multimineral, por isso não foi possível relacionar qualquer resposta a um determinado mineral. No entanto, Pogge et al. (2012), usando o mesmo SIM, relataram que a suplementação promoveu um aumento das concentrações plasmáticas de Se e Cu durante 15 dias, enquanto as concentrações de Zn e Mn aumentaram ao longo de 24 horas. Esses achados também foram encontrados por Bicalho et al. (2014). Esses autores sugerem que apenas Se e Cu eram susceptíveis de serem armazenados de forma eficaz, enquanto a suplementação com Mn e Zn não era susceptível de ter um efeito a longo prazo. Esses

autores relatam que mais pesquisas são necessárias para validar quais respostas são devidas e a quais minerais são responsáveis por essas respostas. E para identificar se estes minerais são armazenados em outros tecidos do que o fígado ou se eles são excretados 24 h após a suplementação (MACHADO et al., 2013).

6.3 AVALIAÇÃO DO CORRIMENTO VAGINAL PURULENTO

Nesse estudo foi usada a avaliação do corrimento vaginal purulento para o diagnóstico de endometrite clínica. Esse é um método fácil e barato e com um poder de sensibilidade e especificidade muito alto (LEBLANC et al., 2002; SHELDON et al., 2006). A avaliação do corrimento vaginal purulento não apresentou diferença estatística na primeira e na segunda avaliação geral entre os grupos estudados. Esse resultado foi semelhante a Lima et al. (2013), que investigaram a eficácia da PGF2 α como terapia para reduzir a prevalência de endometrite subclínica e melhorar a gestação por inseminação artificial. Esses autores dividiram os grupos como: animais que receberam um único tratamento com PGF2 α com 39 $\pm$ 3 diam em lactação (DL), 2 tratamentos com PGF2 α a 25 $\pm$ 3 e 39 $\pm$ 3 DL e um grupo controle que não recebeu nenhum tratamento. Eles não encontraram diferença estatística entre os grupos estudados na avaliação do corrimento vaginal. Ametaj et al. (2014) investigaram a administração intravaginal de bactérias lácticas na incidência de descargas vaginais purulentas, metade das vacas receberam 1 mL bactérias lácticas intravaginal e a outra metade 1 mL de leite desnatado reconstituído (controle). Foi demonstrado que os animais que receberam a administração com bactérias lácticas intravaginal tiveram uma menor ocorrência de corrimento vaginal purulento com 3 semanas pós-parto.

Muitas pesquisas foram realizadas usando medicamentos no tratamento de endometrite clínica. Dubuc (2015) pesquisaram o efeito do tratamento intra-uterina com cefapirina em animais com corrimento vaginal purulento sobre a presença de anovulação prolongada. Esses autores observaram que o grupo que foi tratado com a cefapirina tiveram um aumento de prenhez comparado com o grupo que não foi tratado

(nenhum tratamento: 15,4%, tratamento: 31,4%). Kaufmann et al. (2010) compararam o tratamento sistêmico com ceftiofur, com um protocolo de tratamento consistindo de duas doses de prostaglandina e cloprostenol em um intervalo de 14 dias em animais que apresentavam corrimento vaginal purulento. Esses autores observaram que não teve diferença estatística ($P = 0,09$) entre os grupos estudados, tendo uma cura de 74,2% para o grupo tratado com ceftiofur e 80,2% para o grupo tratado com cloprostenol.

Bicalho et al. (2014) observaram que animais diagnosticados com metrite, foram significativamente deficientes em Zn e Se, vacas com endometrite tiveram concentrações significativamente menores de Zn e Cu, e as vacas com retenção de placenta foram significativamente deficientes em Zn comparados com animais saudáveis. Portanto, esses autores sugeriram que minerais, particularmente Cu, Zn e Se, poderia melhorar a saúde das vacas pós-parto. Isso não ocorreu nesse estudo, pode ser sugerido que a dose administrada não ter sido suficientemente absorvida, pois eram um experimento para testar se realmente esta formulação era eficiente. A administração do SIM no presente estudo diferiu do período aplicado por Bicalho et al. (2014) pois foi aplicado o suplemento antes da parição, e este estudo teve como objetivo a avaliação do suplemento após a parição, se os minerais são capazes de fornecer uma quantidade suficiente rapidamente dos microelementos em um curto período após a aplicação.

6.4 CITOLOGIA ENDOMETRIAL

Kasimanickan et al. (2004) e Gilbert et al. (2005) defendem que a citologia endometrial ao contrário da biópsia uterina é um método prático, menos oneroso e eficiente para a avaliação dos processos infecciosos uterinos, ressaltando ainda que os neutrófilos são a principal linha de defesa do endométrio.

Zerbe et al. (2002) destacaram que os neutrófilos são as primeiras e mais importantes células fagocitárias recrutadas da circulação periférica para o lúmen

uterino durante um processo infeccioso local. Madoz et al. (2014) relataram não haver influência das variações hormonais ligadas ao ciclo estral sobre as proporções de PMN recuperadas em amostras de citologia endometrial, comprovando assim a confiabilidade do método para a avaliação do *status* inflamatório do endométrio.

Neste trabalho, vacas com uma proporção de polimorfonucleares (PMN) $\geq 5\%$ foram classificados como tendo endometrite citológica. Não houve diferença estatística entre o grupo que foi tratado com SIM e o grupo controle na porcentagem de animais que apresentaram endometrite citologia nas duas avaliações. Esses dados são semelhantes ao encontrado por Lima et al. (2013), que usaram uma ou duas doses PGF2 α como terapia para reduzir a prevalência de endometrite citológica, Cerri et al. (2009) que avaliaram o efeito da suplementação de selênio sobre a saúde uterina e qualidade embrionária em vacas de leite de alta produção, e Priest et al. (2013) que estudaram a capacidade de resposta de um medicamento com anti-inflamaório não esteroidal sobre vacas criadas a pasto com endometrite citológica. Esses autores não encontraram diferença entre os grupos estudados na porcentagem de animais com endometrite citológica após os tratamentos. Machado et al. (2013) encontraram diferença na porcentagem de animais com endometrite citológica tratados com SIM com 230 e 260 dias de gestação e 35 dias pós-parto, a incidência de endometrite citológica foi de 34,2% e 28,6% para as vacas SIM e controle, respectivamente ($P = 0,039$).

Machado et al. (2012) verificou-se que a utilização do diminuiu significativamente a proporção de vacas com contaminação intra-uterina por *Fusobacterium* spp. E *Trueperella* spp., que são bactérias associadas a doenças uterinas, especialmente metrite e endometrite clínica (WILLIAMS et al., 2005; BICALHO et al., 2012).

Nesse estudo, foi observado o efeito de tempo sobre a porcentagem de PMN no exame de citologia endometrial, da primeira avaliação para a segunda, observou-se a diminuição da porcentagem de PMN ($P = 0,0001$). A técnica de estabelecimento do diagnóstico de endometrite através do método leva em consideração esta característica tendo diferentes pontos de corte para animais avaliados entre os dias 20 e 33 pós-parto e entre os 34 a 47 dias pós-parto (KASIMANICKAM et al., 2004). Entretanto, não foi

encontrado diferença estatística na porcentagem de PMN entre os grupos de tratamentos estudado.

6.5 PERÍODO VOLUNTÁRIO DE ESPERA

Quando foi bloqueado pelo o período voluntário de espera, não foi encontrada diferença estatística entre os grupos experimentais nas duas avaliações, para o corrimento vaginal purulento e para endometrite citológica. O período de espera voluntária (PEV), que se inicia após o parto e vai até o início do período de reprodução. O PVE é um componente importante do manejo reprodutivo, pois afeta a taxa de gravidez, dias abertos e o intervalo entre os partos (TENHAGEN et al., 2003). A determinação do PVE ótimo é um grande desafio para os produtores de leite, por causa da falta de dados reprodutivos, produtivos e econômicos associados a diferentes PVE (GOBIKRUSHANTH et al., 2014). Em geral, os PVE mais curtos são ótimos para as vacas de produção média de leite, enquanto que as vacas acima da média beneficiam de uma PVE mais longa (GOBIKRUSHANTH et al., 2014). Aumentar do PVE de 54 a 60 dias (de 71-93 dias em lactação para 124-154 dias em lactação) ao longo do ano em vacas com produção de leite acima da média, resultou em maior produção de leite na paridade subsequente em vacas primíparas e aumentou a rentabilidade tanto para primíparas como para multíparas (ARBEL et al., 2001).

Dejarnette et al. (2007) enviaram por correio aproximadamente 4.000 questionários para fazendas de leite nos Estados Unidos. Nesse questionário tinha perguntas como qual era o PVE usado na fazenda, qual raça era usada e por que a fazenda alterou o PVE. O PVE médio citado pelos entrevistados foi de $56 \pm 0,6$ dias (intervalo = 30 a 90 dias) e não diferiu por raça. Entre as fazendas que responderam, 64% (432/673) indicaram que o PVE foi seletivamente alterado por uma ou mais razões. As razões mais citadas para a alteração do PVE foram: saúde pós-parto (50%), estação (18%), produção de leite (18%), paridade (14%) e outras (14%). Mesmo sendo

ao principal motivo de alteração do PVE, não tem estudos que avaliam qual é o melhor PVE sobre a saúde pós parto.

O objetivo desse estudo não foi avaliar qual é o melhor PVE sobre o corrimento vaginal purulento e a endometrite citológica, e sim avaliar a aplicação do SIM 20 dias antes da IA, na saúde uterina e a reprodução. O bloqueio por PVE foi realizado para observar se os animais que foram suplementados com SIM, teriam uma melhora na saúde uterina dentro de cada PVE. Como foi dito anteriormente, não teve diferença entre os grupos estudados quando foi bloqueado por PVE curto ou longo.

6.6 PARIEDADE

Não houve diferença estatística entre os resultados da avaliação do corrimento vaginal e da endometrite citológica nas duas avaliações, quando foi bloqueado por paridade. Machado et. al. 2013 utilizando o mesmo SIM, mas com dias diferentes de aplicação, tiveram diferença para primípara e multíparas. Animais que receberam o SIM, tiveram uma menor porcentagem de casos positivos na avaliação do corrimento vaginal e da endometrite citológica. As primíparas possuem uma predisposição maior do que as multíparas de desenvolverem doenças uterinas, devido a inadaptação das primíparas a prenhez (LEBLANC et al., 2002; SHELDON et al., 2002). Como citado anteriormente, o objetivo desse estudo foi avaliar a aplicação do Sim 20 dias antes da IA sobre o corrimento vaginal purulento, endometrite citológica, desenvolvimento do embrião e a fertilidade, assim não foi realizada a diferença entre a multípara e primípara, sobre variáveis estudadas.

6.7 PERFIL DE PROGESTERONA

Deficiências minerais podem alterar o desenvolvimento de tecidos fetais específicos durante períodos críticos de desenvolvimento, ou podem levar a efeitos duradouros na secreção de hormônios ou na sensibilidade de tecidos aos hormônios

(GODFREY; BARKER, 2000). A taxa de crescimento fetal parece ser estabelecida precocemente, alterações durante a época de concepção na dieta materna e na concentração plasmática de progesterona podem mudar a expressão genética na fase de pré-implantação do embrião, e definir o ritmo de desenvolvimento (LUIZA et al., 2008). A taxa de crescimento parece acelerar com melhor nutrição periconcepção (GODFREY; BARKER, 2000).

Não houve efeito de tratamento sobre a concentração de progesterona nos grupos estudados. Notou-se, no entanto, que o tempo exerceu um efeito de aumento do perfil de progesterona, para $P = 0,0001$. Esses dados são semelhantes ao encontrado por Cerri et al. (2009), que utilizaram duas fontes de selênio (selenito de sódio ou Se levedura), 35 dias antes do parto a 70 dias de lactação, como suplementação de dietas de vacas holandesas. Esses autores não encontraram diferença entre os grupos estudados na concentração de progesterona durante o período de estudo. Diferente dos resultados encontrado nesse estudo, Kamada e Hodate (1998), que investigaram o efeito da suplementação de selênio na dieta sobre a concentração de progesteronas em vacas e de leite, acharam uma aumento nas concentrações na progesterona no plasmas durante o período do estudo. Sharma e Joshi (2005) pesquisaram a eficácia da suplementação de sulfato de zinco, em gado com deficiência de zinco sobre o efeito hormonais, e parâmetros de produção. Esses autores observaram que a suplementação com sulfato de zinco aumentou as concentrações de progesterona comparado com o grupo controle que não recebeu nenhuma suplementação.

A prenhez depende de concentrações específicas de progesterona e de estrógeno e as perdas embrionárias podem ser decorrentes de concentrações inadequadas desses hormônios (DODE, 2002). Alguns minerais influenciam diretamente a produção hormonal, a síntese de progesterona, necessária pelo menos durante o terço inicial da gestação na maioria dos mamíferos (HAFEZ, 1982), pode ser afetada por cálcio (Ca), zinco e manganês. O aumento pós-ovulatório da progesterona é particularmente importante, porque mantém a sincronia entre o embrião e o útero, essencial para o estabelecimento da gestação (MARSTON et al., 1995).

Sabe-se que animais que apresentam níveis de progesterona acima de 1mg/ml são considerados como púberes. A porcentagem de animais que estava púbere 4 dias após a IA foi maior para o grupo que recebeu o tratamento com SIM (71,88%) comparado com o controle (53,73%) com um $P = 0,0319$. Durante o resto do experimento a porcentagem de animais púbere variou, mas com taxas muito altas. Muitos estudos foram realizados usando a suplementação mineral, observando a fertilidade dos animais. Siciliano-Jones et al. (2008) e Machado et al. (2013), utilizaram a suplementação mineral e também não encontraram diferença nos grupos estudados para a fertilidade dos animais. Campbell, Miller e Schrick (1999) que também usaram um suplemento mineral em vacas de lactação observaram que os animais suplementados tiveram menos dias em estro comparado com o grupo controle.

6.8 DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO

Considera-se que as taxas de concepção, determinadas por embriões clivados no oviduto, são altas nos animais domésticos (90% a 95%) (HOSTETLER; KINCAID; MIRANDO, 2003). Para o estabelecimento da gestação, o embrião precisa sinalizar sua presença na chegada ao útero, processo conhecido por reconhecimento da gestação (BOWEN; BURGHARDT, 2000). A maior parte das perdas embrionárias ocorre nos primeiros dias depois da fertilização e durante o processo de implantação (VANROOSE; DE KRUIF; VAN SOOM, 2000). Não foi encontrada diferença estatística entre os grupos estudados nas duas avaliações ($P = 0,7484$ e $P = 0,8180$ respectivamente) na quantidade de animais prenhez. Kafilzadeh et al. (2014) comparando o efeito de uma suplementação oral de vitamina E, com um suplemento injetável contendo selênio e vitamina E, não encontraram diferença estatística na avaliação de prenhez. Esse resultado foi semelhante ao encontrado nesse estudo. Rabiee et al. (2010) realizaram uma meta-análise com 20 trabalhos avaliando efeitos da alimentação com minerais orgânicos na produção de leite e desempenho

reprodutivo em vacas de leite, e concluíram que não teve efeito significativo na taxa de prenhez em animais tratados com esses minerais.

Quando foi analisado a perda de prenhez com 60 dias de gestação, também não foi encontrada diferença estatística. Logo não houve efeito na taxa de prenhez e na absorção embrionária. A morte embrionária pode ser causada por erros de meiose - se a primeira ou a segunda divisão meiótica no ovócito for disfuncional, a meiose pode resultar em anomalias na segregação de cromossomos (KREY et al., 2001; MAGLI et al., 2006) - ou de fecundação e por efeitos nutricionais adversos, como excesso ou deficiência de nutrientes específicos e presença de compostos tóxicos. Machado et al. (2013) que utilizou o SIM no seu trabalho e Rutigliano et al. (2008) que testou a o efeito da suplementação com selenito de sódio e levedura selenizada na na saúde uterina e reprodução de vacas leiteiras, não encontraram diferença entre os grupos estudados na perda de prenhez.

6.9 MORFOMETRIA DA VESÍCULA AMNIÓTICA E DO EMBRIÃO/FETO PELO ULTRA-SOM

Os microelementos cobre, iodo, ferro, manganês, selênio e zinco influenciam o crescimento e o desenvolvimento do embrião, do feto e dos anexos. Concentrações inadequadas desses elementos nos tecidos podem contribuir para aumentar a incidência de morte embrionária precoce nos animais domésticos (HOSTETLER; KINCAID; MIRANDO, 2003) A transferência inadequada de minerais essenciais da mãe para o feto resulta em deficiência desses nutrientes no feto, causando danos ao crescimento e anomalias no metabolismo, no sistema nervoso central e nos ossos. Além disso, crias nascidas de matrizes que consumiram quantidade insuficiente de minerais durante a gestação têm baixas reservas corporais e são susceptíveis a deficiências precocemente (HOSTETLER; KINCAID; MIRANDO, 2003).

A avaliação da vesícula amniótica feita pelo o uso do ultrassom, demonstrou uma diferença estatística entre os grupos estudados na medida longitudinal com 36 dias de

prenhez ($P = <0,0001$), aonde os animais que foram tratados com SIM apresentaram maiores que o grupo tratamento. Essa diferença não foi encontrada com as medidas transversal. Na avaliação do tamanho do embrião/feto com 36 dias de prenhez, foi encontrado diferença estatística entre os grupos estudados no comprimento cabeça-nádega ($P = <0,0001$) e no comprimento abdominal ($P = 0,0001$), os animais que foram tratados com SIM apresentaram-se maiores que os animais do grupo controle. Esses dados são semelhantes aos encontrados por Ribeiro et al., (2014), que avaliaram o desenvolvimento fetal e a fertilidade em vacas leiteiras com baixas doses de somatotropina bovina (bST). Esses autores também acharam diferença na medida longitudinal com 36 dias de prenhez e no comprimento cabeça-nádega e no comprimento abdominal com os animais que foram tratados com bST. A avaliação da morfometria relacionando a aplicação do SIM é inédita neste trabalho, pois não encontrou-se na literatura veterinária, trabalhos que relacionam este tipo de tratamento na morfometria fetal.

7 CONCLUSÕES

Frente aos resultados deste um ensaio clínico podemos concluir que o emprego com o tratamento com suplemento injetável com microminerais 20 dias antes da inseminação artificial, não tem efeito na avaliação do corrimento vaginal purulento e da endometrite citológica. Não altera a porcentagem de animais prenhez e a porcentagem de perda de prenhez. O tratamento com suplemento injetável com microminerais 20 dias antes da inseminação artificial melhorou a porcentagem de animais púberes e aumentou tamanho do embrião e da vesícula amniótica.

REFERÊNCIAS

- AMETAJ, B. N.; IQBAL, S.; SELAMI, F.; ODHIAMBO, J. F.; WANG, Y.; GÄNZLE, M. G.; DUNN, S. M.; ZEBELI, Q. Research in Veterinary Science Intravaginal administration of lactic acid bacteria modulated the incidence of purulent vaginal discharges , plasma haptoglobin concentrations , and milk production in dairy cows. **Research in Veterinary Science**, v. 96, n. 2, p. 365–370, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.02.007>>. Acesso em: 12 nov. 2016.
- ARBEL, R.; BIGUN, Y.; EZRA, E.; STURMAN, H.; HOJMAN, D. The effect of extended calving intervals in high-yielding lactating cows on milk production and profitability. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 3, p. 600–8, mar. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11286412>>. Acesso em: 18 nov. 2016.
- BATISTA, C. G. **Utilização de complexos orgânicos de minerais no pré-parto de vacas, e durante o aleitamento de bezerras holandêsas**. 2009. 56p. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2009.
- BECKETT, G. J.; ARTHUR, J. R. Selenium and endocrine systems. **Journal of Endocrinology**, v. 184, p. 455–465, 2005. Disponível em: <Online version via <http://www.endocrinology-journals.org>>. Acesso em: 8 nov. 2016.
- BICALHO, M. L. S.; LIMA, F. S.; GANDA, E. K.; FODITSCH, C.; MEIRA, E. B. S.; MACHADO, V. S.; TEIXEIRA, A. G. V.; OIKONOMOU, G.; GILBERT, R. O.; BICALHO, R. C. Effect of trace mineral supplementation on selected minerals, energy metabolites, oxidative stress, and immune parameters and its association with uterine diseases in dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 7, p. 4281–95, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030214003683>>. Acesso em: 6 nov. 2016
- BICALHO, M. L. S.; MACHADO, V. S.; OIKONOMOU, G.; GILBERT, R. O.; BICALHO, R. C. Association between virulence factors of Escherichia coli, Fusobacterium necrophorum, and Arcanobacterium pyogenes and uterine diseases of dairy cows. **Veterinary Microbiology**, v. 157, n. 1–2, p. 125–131, maio 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378113511006250>>. Acesso em: 17 nov. 2016.
- BOWEN, J. A.; BURGHARDT, R. C. Cellular mechanisms of implantation in domestic farm animals. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 11, n. 2, p. 93–104, abr. 2000. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1084952100901551>>. Acesso em: 21 nov. 2016.
- BRETZLAFF, K. Rationale for treatment of endometritis in the dairy cow. **Veterinary Clinics of North America: food animal practice**, v. 3, n. 3, p. 593–607, 1987.

CAMPBELL, M. H.; MILLER, J. K.; SCHRICK, F. N. Effect of Additional Cobalt, Copper, Manganese, and Zinc on Reproduction and Milk Yield of Lactating Dairy Cows Receiving Bovine Somatotropin. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 5, p. 1019–1025, maio 1999. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030299753221>>. Acesso em: 18 nov. 2016.

CARVALHO, F. A. N.; BARBOSA, F. A.; MCDOWELL, L. R. **Nutrição de bovinos a pasto**. 2. ed. Belo Horizonte: Papel Form, 2003.

CERRI, R. L. A.; RUTIGLIANO, H. M.; LIMA, F. S.; ARAÚJO, D. B.; SANTOS, J. E. P. Effect of source of supplemental selenium on uterine health and embryo quality in high-producing dairy cows. **Theriogenology**, v. 71, n. 7, p. 1127–1137, abr. 2009.

Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X08008030>>. Acesso em: 17 nov. 2016.

DEJARNETTE, J. M.; SATTler, C. G.; MARSHALL, C. E.; NEBEL, R. L. Voluntary waiting period management practices in dairy herds participating in a progeny test program. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 2, p. 1073–1079, 2007. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71594-1](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71594-1)>. Acesso em: 12 nov. 2016.

DODE, M. A. N. **Eficiência no manejo reprodutivo**: sucesso no rebanho de cria. Campo Grande: EMBRAPA gado de corte, 2002. p. 117-134.

DUBUC, J. Randomized clinical trial of intrauterine cephalosporin infusion in dairy cows for the treatment of purulent vaginal discharge and cytological endometritis. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 10, p. 6856–6864, 2015. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-9129>>. Acesso em: 25 outubro 2016.

FILAPPI, A.; PRESTES, D.; CECIM, M.; Suplementação mineral para ovinos de corte sob pastejo. Revisão. **Veterinária Notícias**, v. 11, n. 2, p. 49, 2007. Disponível em: <<http://www.seer.ufu.br/index.php/vetnot/article/download/18660/9977>>. Acesso em: 6 out. 2016.

FORDE, N.; BELTMAN, M. E.; DUFFY, G. B.; DUFFY, P.; MEHTA, J. P.; O'GAORA, P.; ROCHE, J. F.; LONERGAN, P.; CROWE, M. A. Changes in the endometrial transcriptome during the bovine estrous cycle: effect of low circulating progesterone and consequences for conceptus elongation. **Biology of Reproduction**, v. 84, n. 2, p. 266–78, fev. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20881316>>. Acesso em: 28 set. 2016.

GALVÃO, K. N.; SANTOS, J. E. P.; JUCHEM, S. O.; CERRI, R. L. A.; COSCIONI, A. C.; VILLASEÑOR, M. Effect of addition of a progesterone intravaginal insert to a timed insemination protocol using estradiol cypionate on ovulation rate, pregnancy rate, and late embryonic loss in lactating dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 12, p. 3508, 2004. Disponível em:

<<https://www.animalsciencepublications.org/publications/jas/abstracts/82/12/0823508>>. Acesso em: 11 out. 2016.

GILBERT, R. O. Management of reproductive disease in dairy cows. **Veterinary Clinics of North America: food animal practice**, v. 32, n. 2, p. 387–410, 2016.

GILBERT, R. O.; SHIN, S. T.; GUARD, C. L.; ERB, H. N.; FRAJBLAT, M. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows.

Theriogenology, v. 64, n. 9, p. 1879–88, dez. 2005. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15961149>>. Acesso em: 28 set. 2016.

GILBERT, R. O.; SHIN, S. T.; GUARD, C. L.; ERB, H. N. Incidence of endometritis and effects on reproductive performance of dairy cows. **Theriogenology**, v. 49, p. 251, 1998.

GOBIKRUSHANTH, M.; DE VRIES, A.; SANTOS, J. E. P.; RISCO, C. A.; GALVÃO, K. N. Effect of delayed breeding during the summer on profitability of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 7, p. 4236–4246, jul. 2014. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030214003397>>. Acesso em: 19 nov. 2016.

GODFREY, K. M.; BARKER, D. J. Fetal nutrition and adult disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 5 Suppl, p. 1344S–52S, maio 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10799412>>. Acesso em: 20 nov. 2016.

GONZÁLEZ, F.H.; SILVA, S. C. **Introdução à bioquímica veterinária**. 2. ed. Rio Grande do Sul: Editora da UFRGS, 2006.

GONZÁLEZ, F. H. D.; BARCELLOS, J.; PATIÑO, H. O.; RIBEIRO, L. A. Perfil metabólico em ruminantes seu uso em nutrição e doenças nutricionais. Porto Alegre: UFRGS, 2000. v. 1, p. 63.

GOTTSCH, M. L.; VAN KIRK, E. A.; MURDOCH, W. J. Tumour necrosis factor alpha up-regulates matrix metalloproteinase-2 activity in periovulatory ovine follicles: metamorphic and endocrine implications. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 12, n. 1–2, p. 75–80, 2000. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11194561>>. Acesso em: 28 set. 2016.

GRAHAM, T. W. Trace element deficiencies in cattle. **The Veterinary Clinics of North America: food animal practice**, v. 7, n. 1, p. 153–215, mar. 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2049666>>. Acesso em: 7 nov. 2016.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1982.

HOSTETLER, C. E.; KINCAID, R. L.; MIRANDO, M. A. The role of essential trace elements in embryonic and fetal development in livestock. **Veterinary Journal**,

(London, England : 1997), v. 166, n. 2, p. 125–39, set. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12902178>>. Acesso em: 28 set. 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRÁFICA E ESTATÍSTICA. Rio de Janeiro: IBGE, 2015. v. 43.

KAFILZADEH, F.; KHEIRMANESH, H.; KARAMI SHABANKAREH, H.; TARGHIBI, M. R.; MALEKI, E.; EBRAHIMI, M.; YONG MENG, G. Comparing the Effect of Oral Supplementation of Vitamin E, Injective Vitamin E and Selenium or Both during Late Pregnancy on Production and Reproductive Performance and Immune Function of Dairy Cows and Calves. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–5, 2014. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/165841/>>. Acesso em: 29 nov. 2016.

KAMADA, H.; HODATE, K. Effect of dietary selenium supplementation on the plasma progesterone concentration in cows. **The Journal of Veterinary medical science**, v. 60, n. 1, p. 133–135, 1998.

KASIMANICKAM, R.; DUFFIELD, T.; FOSTER, R.; GARTLEY, C.; LESLIE, K.; WALTON, J.; JOHNSON, W. . Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. **Theriogenology**, v. 62, n. 1–2, p. 9–23, jul. 2004. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X03004746>>. Acesso em: 17 nov. 2016.

KAUFMANN, T. B.; WESTERMANN, S.; DRILLICH, M.; PLÖNTZKE, J.; HEUWIESER, W. Systemic antibiotic treatment of clinical endometritis in dairy cows with ceftiofur or two doses of cloprostenol in a 14-d interval. **Animal Reproduction Science**, v. 121, p. 55–62, 2010.

KENDALL, N. R.; MARSTERS, P.; GUO, L.; SCARAMUZZI, R. J.; CAMPBELL, B. K. Effect of copper and thiomolybdates on bovine theca cell differentiation in vitro. **The Journal of Endocrinology**, v. 189, n. 3, p. 455–63, jun. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16731777>>. Acesso em: 28 set. 2016.

KINCAID, R. The biological basis for selenium requirements of animals. **The Professional Animal Scientist**, v. 11, n. 1, p. 26–29, mar. 1995. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1080744615325468>>. Acesso em: 8 nov. 2016.

KÖLLE, S.; STOJKOVIC, M.; BOIE, G.; WOLF, E.; SINOWATZ, F. Growth hormone inhibits apoptosis in in vitro produced bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, n. 2, p. 180–6, fev. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11803552>>. Acesso em: 28 set. 2016.

KREY, L.; LIU, H.; ZHANG, J.; GRIFO, J. Fertility and maternal age strategies to improve pregnancy outcome. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 943,

p. 26–33, set. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11594545>>. Acesso em: 20 nov. 2016.

KURZ, M. W. **Nutritional modulation of immunity and physiological responses in beef calves**. Texas: A&M University, 2004.

LEBLANC, S. J.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E.; BATEMAN, K. G.; KEEFE, G. P.; WALTON, J. S.; JOHNSON, W. H. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 2223–2236, 2002.

LEQUARRÉ, A. S.; FEUGANG, J. M.; MALHOMME, O.; DONNAY, I.; MASSIP, A.; DESSY, F.; VAN LANGENDONCKT, A. Expression of Cu/Zn and Mn superoxide dismutases during bovine embryo development: influence of in vitro culture. **Molecular Reproduction and Development**, v. 58, n. 1, p. 45–53, jan. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11144220>>. Acesso em: 28 set. 2016.

LIMA, F. S.; BISINOTTO, R. S.; RIBEIRO, E. S.; GRECO, L. F.; AYRES, H.; FAVORETO, M. G.; CARVALHO, M. R.; GALVÃO, K. N.; SANTOS, J. E. P. Effects of 1 or 2 treatments with prostaglandin F₂α on subclinical endometritis and fertility in lactating dairy cows inseminated by timed artificial insemination. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 10, p. 6480–8, out. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23910554>>. Acesso em: 28 set. 2016.

NICODEMO, M. L. F.; SERENO, J. R. B.; AMARAL, T. B.; **Minerais na eficiência reprodutiva de bovinos**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2008. (Documentos / Embrapa Pecuária Sudeste, 80).

MACHADO, V. S.; BICALHO, M. L. S.; PEREIRA, R. V.; CAIXETA, L. S.; KNAUER, W. A.; OIKONOMOU, G.; GILBERT, R. O.; BICALHO, R. C. Effect of an injectable trace mineral supplement containing selenium, copper, zinc, and manganese on the health and production of lactating Holstein cows. **Veterinary Journal**, (London, England: 1997), v. 197, n. 2, p. 451–6, ago. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23598255>>. Acesso em: 28 set. 2016.

MACHADO, V. S.; OIKONOMOU, G.; BICALHO, M. L. S.; KNAUER, W. A.; GILBERT, R.; BICALHO, R. C. Investigation of postpartum dairy cows' uterine microbial diversity using metagenomic pyrosequencing of the 16S rRNA gene. **Veterinary Microbiology**, v. 159, n. 3–4, p. 460–469, out. 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378113512002829>>. Acesso em: 17 nov. 2016.

MACHADO, V. S.; OIKONOMOU, G.; LIMA, S. F.; BICALHO, M. L. S.; KACAR, C.; FODITSCH, C.; FELIPPE, M. J.; GILBERT, R. O.; BICALHO, R. C. The effect of injectable trace minerals (selenium, copper, zinc, and manganese) on peripheral blood leukocyte activity and serum superoxide dismutase activity of lactating Holstein cows.

Veterinary Journal (London, England : 1997), v. 200, n. 2, p. 299–304, maio 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24685102>>. Acesso em: 28 set. 2016.

MADOZ, L. V.; GIULIODORI, M. J.; MIGLIORISI, A. L.; JAUREGUIBERRY, M.; DE LA SOTA, R. L. Endometrial cytology, biopsy, and bacteriology for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 1, p. 195–201, jan. 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030213007297>>. Acesso em: 17 nov. 2016.

MAGLI, M. C.; FERRARETTI, A. P.; CRIPPA, A.; LAPPI, M.; FELICIANI, E.; GIANAROLI, L. First meiosis errors in immature oocytes generated by stimulated cycles. **Fertility and Sterility**, v. 86, n. 3, p. 629–635, set. 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028206009034>>. Acesso em: 20 nov. 2016.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. **Reproduction**, (Cambridge, England), v. 121, n. 1, p. 175–80, jan. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11226041>>. Acesso em: 28 set. 2016.

MARSTON, T. T.; LUSBY, K. S.; WETTEMANN, R. P.; PURVIS, H. T. Effects of feeding energy or protein supplements before or after calving on performance of spring-calving cows grazing native range. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 3, p. 657–64, mar. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7607998>>. Acesso em: 20 nov. 2016.

MCCLURE, T.; ARIAS, R. S. **Infertilidad nutricional y metabólica de la vaca**. Zaragoza: Acribia, 1995.

MCCUSKER, R. H.; KALEKO, M.; SACKETT, R. L. Multivalent cations and ligand affinity of the type 1 insulin-like growth factor receptor on P2A2-LISN muscle cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 176, n. 2, p. 392–401, ago. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9648927>>. Acesso em: 28 set. 2016.

MCDONALD, P.; EDWARDS, R. A.; GREENHALGH, J. F. D.; MORGAN, C. A.; SINCLAIR, L. A.; WILKINSON, R. G.. **Animal nutrition**. 7. ed. Singapore: Longman, 2002.

MCDOWELL, L. R. **Minerals in animal and human nutrition**. [S.l.]: Elsevier, 2003.

MOREIRA, F.; PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J.; BADINGA, L.; THATCHER, W. W. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of in vitro derived bovine embryos. **Theriogenology**, v. 57, n. 2, p. 895–907, 15 jan. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11991392>>. Acesso em: 28 set.

2016.

MUNDELL, L. R.; JAEGER, J. R.; WAGGONER, J. W.; STEVENSON, J. S.; GRIEGER, D. M.; PACHECO, L. A.; BOLTE, J. W.; AUBEL, N. A.; ECKERLE, G. J.; MACEK, M. J.; ENSLEY, S. M.; HAVENGA, L. J.; OLSON, K. C. Effects of prepartum and postpartum bolus injections of trace minerals on performance of beef cows and calves grazing native range. **The Professional Animal Scientist**, v. 28, n. 1, p. 82–88, 2012. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.15232/S1080-7446\(15\)30318-1](http://dx.doi.org/10.15232/S1080-7446(15)30318-1)>. Acesso em: 10 out. 2016

MUNRO, C.; STABENFELDT, G. Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. **The Journal of Endocrinology**, v. 101, n. 1, p. 41–9, abr. 1984. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6368729>>. Acesso em: 11 out. 2016.

MURRAY, R. D.; ALLISON, J. D.; GARD, R. P. Bovine endometritis: comparative efficacy of alfaprostol and intrauterine therapies, and other factors influencing clinical success. **The Veterinary Record**, v. 127, n. 4, p. 86–90, 28 jul. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2402862>>. Acesso em: 8 nov. 2016.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. Washington: NRC, 2001.

OLSON, J. A. The biosynthesis of cholesterol. **Ergebnisse der Physiologie, Biologischen Chemie und Experimentellen Pharmakologie**, v. 56, p. 173–215, 1965. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5325094>>. Acesso em: 28 set. 2016.

PALOMARES, R. A.; HURLEY, D. J.; BITTAR, J. H. J.; SALIKI, J. T.; WOOLUMS, A. R.; MOLIERE, F.; HAVENGA, L. J.; NORTON, N. A.; CLIFTON, S. J.; SIGMUND, A. B.; BARBER, C. E.; BERGER, M. L.; CLARK, M. J.; FRATTO, M. A. Veterinary Immunology and Immunopathology Effects of injectable trace minerals on humoral and cell-mediated immune responses to Bovine viral diarrhea virus, Bovine herpes virus 1 and Bovine respiratory syncytial virus following administration of a modifi. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 178, p. 88–98, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.07.003>>. Acesso em: 10 out. 2016.

POGGE, D. J.; RICHTER, E. L.; DREWNOSKI, M. E.; HANSEN, S. L. Mineral concentrations of plasma and liver after injection with a trace mineral complex differ among Angus and Simmental cattle. **Journal of Animal Science**, v. 90, n. 8, p. 2692–2698, 1 ago. 2012. Disponível em: <<http://www.journalofanimalscience.org/cgi/doi/10.2527/jas.2012-4482>>. Acesso em: 17 nov. 2016.

PRIEST, N. V.; MCDOUGALL, S.; BURKE, C. R.; ROCHE, J. R.; MITCHELL, M.;

MCLEOD, K. L.; GREENWOOD, S. L.; MEIER, S. The responsiveness of subclinical endometritis to a nonsteroidal antiinflammatory drug in pasture-grazed dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 7, p. 4323–4332, jul. 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030213003214>>. Acesso em: 17 nov. 2016.

RABIEE, A. R.; LEAN, I. J.; STEVENSON, M. A.; SOCHA, M. T. Effects of feeding organic trace minerals on milk production and reproductive performance in lactating dairy cows: a meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 9, p. 4239–51, set. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20723697>>. Acesso em: 28 set. 2016.

RIBEIRO, E. S.; BRUNO, R. G. S.; FARIAS, A. M.; HERNÁNDEZ-RIVERA, J. A.; GOMES, G. C.; SURJUS, R.; BECKER, L. F. V.; BIRT, A.; OTT, T. L.; BRANEN, J. R.; SASSER, R. G.; KEISLER, D. H.; THATCHER, W. W.; BILBY, T. R.; SANTOS, J. E. P. Low doses of bovine somatotropin enhance conceptus development and fertility in lactating dairy cows. **Biology of Reproduction**, v. 90, n. 1, p. 10, jan. 2014a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24285716>>. Acesso em: 28 set. 2016.

RICCIARDINO, M. Z.; PICCINALI, R. L. Actualización em funciones bioquímicas de cobre, selênio y zinc em ruminantes. Producción bovina de carne. **Revista Argentina de Producción Animal**, v. 1, p. 335, 1998.

RUTIGLIANO, H. M.; LIMA, F. S.; CERRI, R. L. A.; GRECO, L. F.; VILELA, J. M.; MAGALHÃES, V.; SILVESTRE, F. T.; THATCHER, W. W.; SANTOS, J. E. P. Effects of Method of Presynchronization and Source of Selenium on Uterine Health and Reproduction in Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 9, p. 3323–3336, set. 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030208710476>>. Acesso em: 29 nov. 2016.

SACKETT, R. L.; MCCUSKER, R. H.; MCKUSKER, R. H. Multivalent cations depress ligand affinity of insulin-like growth factor-binding proteins-3 and -5 on human GM-10 fibroblast cell surfaces. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 69, n. 3, p. 364–75, 1 jun. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9581874>>. Acesso em: 28 set. 2016.

SALES, J. N. S.; PEREIRA, R. V. V.; BICALHO, R. C.; BARUSELLI, P. S. Effect of injectable copper, selenium, zinc and manganese on the pregnancy rate of crossbred heifers (*Bos indicus* × *Bos taurus*) synchronized for timed embryo transfer. **Livestock Science**, v. 142, n. 1, p. 59–62, 2011.

SANTOS, J.E.; AMSTALDEN, M. Effects of nutrition on bovine reproduction. **Arquivos da faculdade de veterinária UFRGS**, v. 26, p. 19–89, 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000089&pid=S0102-0935201000010001800020&lng=en>. Acesso em: 09 out. 201.

SHARMA, M. C.; JOSHI, C. Therapeutic efficacy of zinc sulphate used in clustered model treatment in alleviating zinc deficiency in cattle and its effect on hormones, vitamins and production parameters. **Veterinary Research Communications**, v. 29, n. 7, p. 609–628, out. 2005. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11259-005-3382-x>>. Acesso em: 18 nov. 2016.

SHELDON, I. M.; LEWIS, G. S.; LEBLANC, S.; GILBERT, R. O. Defining postpartum uterine disease in cattle. **Theriogenology**, v. 85, p. 2223–36, 2002a.

SHELDON, I. M.; LEWIS, G. S.; LEBLANC, S.; GILBERT, R. O. Defining postpartum uterine disease in cattle. **Theriogenology**, v. 65, n. 8, p. 1516–30, maio 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16226305>>. Acesso em: 28 set. 2016.

SHELDON, I. M.; NOAKES, D. E. Comparison of three treatments for bovine endometritis. **The Veterinary Record**, v. 142, n. 21, p. 575–9, 23 maio 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9634707>>. Acesso em: 8 nov. 2016.

SHELDON, I. M.; NOAKES, D. E.; RYCROFT, A. N.; DOBSON, H. Effect of postpartum manual examination of the vagina on uterine bacterial contamination in cows. **The Veterinary Record**, v. 151, n. 18, p. 531–4, 2 nov. 2002b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12448489>>. Acesso em: 8 nov. 2016.

SICILIANO-JONES, J. L.; SOCHA, M. T.; TOMLINSON, D. J.; DEFRAIN, J. M. Effect of trace mineral source on lactation performance, claw integrity, and fertility of dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 5, p. 1985–1995, maio 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030208712359>>. Acesso em: 18 nov. 2016.

SMITH, O. B.; AKINBAMIJO, O. O. Micronutrients and reproduction in farm animals. **Animal Reproduction Science**, v. 6061, p. 549–560, 2000. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/animalreprosci>. Acesso em: 8 nov. 2016.

SPEARS, J. W. Micronutrients and immune function in cattle. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 59, n. 4, p. 587–94, nov. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11115794>>. Acesso em: 7 nov. 2016.

SPEARS, J. W. Trace mineral bioavailability in ruminants. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 5 p. 1506S–9S, maio 2003. Supplement 1. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12730454>>. Acesso em: 7 nov. 2016.

ST CLAIR, D. K.; OBERLEY, T. D.; MUSE, K. E.; ST CLAIR, W. H. Expression of manganese superoxide dismutase promotes cellular differentiation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 16, n. 2, p. 275–82, fev. 1994. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7516302>>. Acesso em: 28 set. 2016.

TEIXEIRA, A. G. V.; LIMA, F. S.; BICALHO, M. L. S.; KUSSLER, A.; LIMA, S. F.; FELIPPE, M. J.; BICALHO, R. C. Effect of an injectable trace mineral supplement containing selenium, copper, zinc, and manganese on immunity, health, and growth of dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 7, p. 4216–4226, 2014.

TENHAGEN, B.-A.; VOGEL, C.; DRILLICH, M.; THIELE, G.; HEUWIESER, W. Influence of stage of lactation and milk production on conception rates after timed artificial insemination following Ovsynch. **Theriogenology**, v. 60, n. 8, p. 1527–1537, 2003.

UNDERWOOD, E. J.; SUTTLE, N. F. **Book review — Boekresensie. The mineral nutrition of livestock.** (3rd edition). v. 71, p. 624, 1999.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant.** 2. ed. Ithaca: I Comstock Pub, 1994.

VANROOSE, G.; DE KRUIF, A.; VAN SOOM, A. Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 131–43, 2 jul. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10844190>>. Acesso em: 20 nov. 2016.

WATHES, D. C.; REYNOLDS, T. S.; ROBINSON, R. S.; STEVENSON, K. R. Role of the insulin-like growth factor system in uterine function and placental development in ruminants. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 6, p. 1778–89, jun. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9684184>>. Acesso em: 28 set. 2016.

WILDE, D. Influence of macro and micro minerals in the peri-parturient period on fertility in dairy cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 96, n. 3–4, p. 240–9, dez. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16971071>>. Acesso em: 28 set. 2016.

WILLIAMS, E. J.; FISCHER, D. P.; PFEIFFER, D. U.; ENGLAND, G. C. W.; NOAKES, D. E.; DOBSON, H.; SHELDON, I. M. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. **Theriogenology**, v. 63, p. 102–117, 2005.

ZERBE, H.; OSSADNIK, C.; LEIBOLD, W.; SCHUBERTH, H. J. Lochial secretions of Escherichia coli- or Arcanobacterium pyogenes-infected bovine uteri modulate the phenotype and the functional capacity of neutrophilic granulocytes. **Theriogenology**, v. 57, n. 3, p. 1161–77, fev. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12041909>>. Acesso em: 17 nov. 2016.