Priscilla Marques do Nascimento

Impacto da administração das vitaminas D e E na sensibilidade insulínica, metabolismo oxidativo e aspectos da imunidade em ovelhas no período periparto

São Paulo
2018

Priscilla Marques do Nascimento

Impacto da administração das vitaminas D e E na sensibilidade insulínica, metabolismo oxidativo e aspectos da imunidade em ovelhas no período periparto

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

Departamento:
Clínica Médica - VCM

Área de concentração:
Clínica Veterinária

Orientador:
Profa. Dra. Maria Claudia Araripe Sucupira

São Paulo
2018

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. 3619
FMVZ

Nascimento, Priscilla Marques do
Impacto da administração das vitaminas D e E na sensibilidade insulínica, metabolismo oxidativo e aspectos da imunidade em ovelhas no período periparto / Priscilla Marques do Nascimento. – 2018.
226 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Claudia Araripe Sucupira.

1. Colecalciferol. 2. Tocoferol. 3. Antioxidante. 4. Gestação. 5. Período de transição. I.
Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Impacto da administração das vitaminas D e E na sensibilidade insulínica, no metabolismo oxidativo e aspectos da imunidade em ovelhas no período periparto", protocolada sob o CEUA nº 3197050214, sob a responsabilidade de **Maria Cláudia Araripe Sucupira e equipe; Priscilla Marques do Nascimento** - 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 07/05/2014.

We certify that the proposal "título em inglês", utilizing 70 Ovinos (70 females), protocol number CEUA 3197050214, under the responsibility of **Maria Cláudia Araripe Sucupira and team; Priscilla Marques do Nascimento** - 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 05/07/2014.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **03/2015 a 03/2016**

Área: **Clínica Médica Veterinária**

Origem:

Espécie: **Ovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **a**

N: **70**

Linhagem: **N/A**

Peso: **a**

Resumo: Objetiva-se avaliar o efeito da suplementação com as vitaminas A, D e E intramuscular no período periparto no metabolismo oxidativo, perfil bioquímico e função polimorfonuclear de ovelhas. Serão selecionadas, a partir de um grupo de 70 ovelhas, da raça Santa Inês, adultas e hípidas, 32 ovelhas no último mês de gestação. Estas serão distribuídas em quatro grupos de oito animais que receberão, com intervalo de 14 dias, duas aplicações, pela via intramuscular profunda, de 2 mL de solução fisiológica (grupo controle-GC), ou 200.000 UI vitamina A (grupo tratado-GT1) ou 2000 de vitamina D (grupo tratado-GT2) ou 200 UI de vitamina E (grupo tratado-GT3). Amostras de sangue serão coletadas e analisadas as variáveis do perfil bioquímico e do metabolismo oxidativo. Durante o período experimental serão determinadas as concentrações de cálcio e das vitaminas A, D e E, nos momentos pré-determinados das coletas.

Local do experimento:

São Paulo, 30 de janeiro de 2018

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária Executiva
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

São Paulo, 29 de janeiro de 2018
CEUA N [3197050214](#)

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Maria Cláudia Araripe Sucupira
Área: Clínica Médica Veterinária
Profa Dra Maria Claudia Araripe Sucupira (orientador)

Título da proposta: "Impacto da administração das vitaminas D e E na sensibilidade insulínica, no metabolismo oxidativo e aspectos da imunidade em ovelhas no período periparto".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 04/dezembro/2017) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Com a alteração do título pretendemos inserir informações referente a avaliação de monócitos e neutrófilos por meio de citometria de fluxo e inumofenotipagem de anticorpos CD4, CD8, CD45, CD206, WC1.".

Comentário da CEUA: "".

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária Executiva
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: NASCIMENTO, Priscilla Marques do

Título: **Impacto da administração das vitaminas D e E na sensibilidade insulínica, metabolismo oxidativo e aspectos da imunidade em ovelhas no período periparto**

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: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Daisy Miriam e Nilson, pelo amor, apoio, força, incentivo, compreensão, paciência e ensinamentos

A minha filha Julia, razão da minha vida, pelo amor, força e paciência!

Ao amor da minha vida José Carlos, pelo amor, carinho, companherismo, paciência, apoio e encorajamento.

Agradeço a Deus por ter vocês em minha vida!

Prof^a. Dra. Maria Claudia Araripe Sucupira,

Muito obrigada pela oportunidade, pelos preciosos ensinamentos, orientação, confiança, amizade, paciência, carinho, pela compreensão, encorajamento e por estar ao meu lado em todos os momentos dos 9 anos de convívio!

Admiro muito você!

AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo que me concedeu!

À Prof^ª. Dra. Maria Claudia Araripe Sucupira, orientadora, amiga, agradeço muito pela paciência e compreensão, por não me deixar fraquejar! Agradeço à sua família, especialmente Léo e Cesar pela paciência e convívio!

À Marcela R. Faria (“irmã gêmea separada no nascimento”), te agradeço pela imensa ajuda, pela paciência, por mostrar o lado bom sempre, pelo agradável convívio, pelas viagens divertidíssimas, inúmeras horas de trabalho, obrigada pelo apoio e pela parceria. Foi um presente sua amizade!

À Débora Dias de Carvalho, amiga querida, super parceira! Sua ajuda foi fundamental e te conhecer foi um presente! Obrigada pela paciência, pelas risadas, pelas viagens, pelas sábias palavras e por confortar com sua calma!

À Carolinne Broglio Deusadado, muito obrigada pela ajuda, pela amizade, litros de café, pelas risadas, pelo apoio e parceria! Adorei conhecer você!

À Aline Alberti Morgado, obrigada pelos 9 anos de convívio (“quase uma década”) pelas viagens, pelo apoio, encorajamento, pela parceria e ajuda!

À André Martins Storti, Ronald Carvalho e Marcel Zei Grunwald, pela ajuda, por todos os momentos compartilhados e pela paciência!

À minha filha Julia, pela ajuda durante todo o experimento, muito orgulho de você!

À professora Ivanete Susin, da “Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) – Universidade de São Paulo - USP, pela concessão dos animais e pela colaboração.

À grande e querida amiga Clara Satsuki Mori, pela fundamental ajuda nas análises, pela paciência, disponibilidade, pelos ensinamentos, auxílio em toda a parte laboratorial deste experimento, companheirismo, amizade e agradável convívio. Obrigada Clara!!!

À Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini, docente do Departamento de Reprodução Animal (VRA), pelos ensinamentos e fundamental ajuda!

À Profa. Dra. Camila Infantsi Vannucchi, docente do Departamento de Reprodução Animal (VRA), pela participação, ensinamentos e agradável convívio.

À Profa. Dra. Cristina de Oliveira Massoco de Salles Gomes e Dra. Nicolle G. T. de Queiroz Hazarbassanov, do Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia, do Departamento de Patologia (VPT), pela disponibilidade nas análises, pelos ensinamentos, paciência e ajuda.

Ao Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues, pelos ensinamentos, paciência, disponibilidade e colaboração!

Ao Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani, pelos ensinamentos, apoio e agradável convívio.

À Profa. Dra Alice Maria Melville de Paiva Della libera, pelo incentivo desde o início, pelos ensinamentos e agradável convívio.

Ao Prof. Dr. Marcio Bruneto pelos ensinamentos e agradável convívio!

À Profa. Daniela Birgel, pela ajuda nas análises realizadas na FZEA, em Pirassununga/SP.

Ao Prof. Dr. Stéfano Filippo Hagen, pela colaboração na condução deste experimento, ensinamentos e convívio.

À Profa. Dra. Marcia de Oliveira S. Gomes, pelo apoio, incentivo, ajuda e agradável convívio.

A todos os professores do departamento de Clínica Médica, pelo agradável convívio e compartilhamento de informações e experiências.

Às técnicas de Laboratório Claudia, Dinha, Samantha, e Dona Carmem pela ajuda na parte laboratorial, pelo agradável convívio e pela paciência.

As secretárias do departamento de clínica médica da FMVZ-USP, Adelaide Borges, Maria Aparecida, Silvana e Carol pelo auxílio.

As funcionárias da Biblioteca pela colaboração na produção da ficha catalográfica.

À todos que ajudaram no experimento. Muito obrigada, pela disponibilidade e pela paciência.

A todos que não tiveram seus nomes citados aqui, e ajudaram com apenas um sorriso, sintam-se lembrados carinhosamente!

À minha irmã Patricia, meu cunhado Marcello Sapiensa e minha sobrinha Laura, pelo incentivo, colaboração, paciência e pela compreensão da ausência.

À Amância Aparecida, pela disponibilidade, carinho e compreensão.

Ao amigo Renato Jafet pelo apoio e ajuda técnica!

À amiga Nilda pelo apoio e encorajamento!

A todos os amigos e familiares, pela confiança e por acreditarem em mim!

Aos colegas de pós-graduação da FMVZ-USP - Camila Martin, Rodrigo Malzoni, Elisa Weiss, Ronaldo Gargano, Juliana Bombardelli, Gabriela Reis, Joel, Bruno Leonardo, Carolina dos Anjos, Joel, Mailson, Izabelle, Pedro, Deisiane, Marcos, Bruna Stanigher, Camila Costa, Rejane, Natália, Carolina Shekaira, Leonardo, Fabio Sella, Joyce. Muito obrigada à todos pelo convívio e pelos bons momentos compartilhados.

Aos colegas de pós-graduação da ESALQ – USP, Luciana e Marcos, pela valiosa ajuda durante análises.

Aos funcionários e amigos, Dinho e Aganildo pela ajuda durante o experimento e agradável convívio.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, FMVZ – USP pela formação e pelo presente trabalho de Doutorado.

À CAPES, pela concessão da bolsa.

À FAPESP, pelo auxílio pesquisa para realização das análises (processo nº 2014/17297-9).

Às ovelhas que participaram deste estudo, que além de conhecimento nos proporcionaram um convívio enriquecedor.

*“Só eu sei cada passo por mim dado
nessa estrada esburacada que é a vida,
passei coisas que até mesmo Deus duvida,
fiquei triste, capiongo, aperreado,
porém nunca me senti desmotivado,
me agarrava sempre numa mão amiga,
e de forças minha alma era munida,
pois do céu a voz de Deus dizia assim:
-Suba o queixo, meta os pés, confie em mim,
vá pra luta que eu cuido das feridas”*

Braulio Bessa

RESUMO

NASCIMENTO, P. M. **Impacto da administração das vitaminas D e E na sensibilidade insulínica, no metabolismo oxidativo e aspectos da imunidade em ovelhas no período periparto** [Impact of administration of vitamins D and E on insulin sensitivity, on oxidative stress and aspects of immunity in ewes in the peripartum period]. 2018. 226 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Trinta ovelhas, mestiças (Santa Inês X Dorper), adultas e híginas foram selecionadas para avaliar o efeito da suplementação intramuscular com as vitaminas D e E no perfil bioquímico, metabolismo energético, metabolismo oxidativo, sensibilidade insulínica e imunidade no periparto. Após confirmação da gestação essas fêmeas foram distribuídas em três grupos de dez animais e no 108º dia de gestação receberam pela via intramuscular profunda, única aplicação ou de veículo oleoso (grupo controle-GC); ou 70.000 UI/kg de P.V. de vitamina D3 (colecalfiferol) (grupo tratado-GD); ou 60UI/kg de P.V. de vitamina E (α -tocoferol) (grupo tratado-GE). As amostras de sangue foram coletadas previamente à aplicação da vitamina (-45), quatro (-30); e duas semanas (-15) antes do parto; até duas horas do parto (0), uma (7); duas (15); e quatro semanas após o parto (30). Foram analisadas as concentrações plasmáticas de glicose, beta hidroxibutirato (BHB), ácidos graxos não esterificados (AGNEs) e as concentrações séricas de colesterol, triglicérides, ureia, creatinina, cálcio total, cálcio iônico, proteína total, ácido úrico, aspartato amino transferase (AST), gamaglutamil transferase (GGT), e ainda a creatina quinase (CK). Foram também analisadas as concentrações de insulina e cortisol. Do metabolismo oxidativo foram determinadas as atividades da superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GSH-Px), a habilidade de redução férrica plasmática (HRFP), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), bem como o status antioxidante total (TAS). Para avaliar aspectos relacionados à imunidade de monócitos e neutrófilos, por método *in vitro*, foram utilizadas 24 ovelhas (seis de cada tratamento). As amostras de sangue foram obtidas nos momentos -30; 0; e 30 e foram avaliadas a produção de espécies reativas de oxigênio de monócitos e neutrófilos sem estímulo (burst basal) e com estímulo por DCFH-DA, SaPI e PMA. A imunofenotipagem com anticorpos monoclonais CD8, CD4, CD14, CD16, CD45R, WC1, CD206, foi realizada aos dias -30, -15, 0, 7 e 30. Foram determinadas as concentrações das vitaminas D e E, nos momentos pré-determinados das coletas e no dia do teste de tolerância à glicose (TTG), realizado

para avaliar a sensibilidade insulínica, e foi calculado RQUICKI e RQUICKI BHB. Todas as variáveis estudadas apresentaram efeito de tempo. Houve interação tempo*tratamento em TBARS ($P=0,0217$) e tendência para vitamina E (0,0811), SOD (0,0886) e GSH-Px ($P=0,0643$). Houve efeito de tratamento no colesterol ($P=0,0088$) e vitamina D ($P<0,0001$) e tendência para TAS ($P=0,0830$). No TTG, com resultados de AUC de BHB e AGNE apresentaram efeito de número de fetos gestados ($P=0,0006$ e $0,0005$, respectivamente) e o RQUICKIBHB mostrou-se melhor indicador de sensibilidade insulínica do que o RQUICKI em ovelhas. A suplementação com vitamina D influenciou os teores plasmáticos de alfa tocoferol e a resposta imune das ovelhas. A suplementação com vitamina E reduziu a peroxidação lipídica no parto e relacionou-se positivamente com a melhora oxidativa dos monócitos sem estímulo e estimulados por PMA.

Palavras-chave: coлекаlциферол, токоферол, антиоксидант, беременность, период перехода, тест толерантности к глюкозе.

ABSTRACT

NASCIMENTO, P. M. **Impact of parenteral administration of vitamins D and E on insulin sensitivity and on oxidative stress in ewes in the peripartum period.** [Impacto da administração parenteral das vitaminas D e E na sensibilidade à insulina e no metabolismo oxidativo em ovelhas no período periparto]. 2018. 226 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Thirty healthy adult ewes were selected to evaluate the effect of supplementation with intramuscular vitamins D and E in peripartum period on the biochemical profile, energetic metabolism, oxidative metabolism, insulin sensitivity and immunity. After pregnancy confirmation these females were distributed into three groups of ten animals treated with intramuscular injection containing oily vehicle (control-to-control group) on the 108th day of pregnancy, (CG); or 70,000 IU / kg of body weight of vitamin D3 (cholecalciferol) (treated group-GD); or 60 IU / kg of body weight of vitamin E (α -tocopherol) (treated group-GE). Blood samples were collected before the application of the vitamins and vehicle (-45), four (-30); and two weeks (-15) before lambing; until 2 hours of lambing (0); one (7), two (15) and four weeks postpartum (30). Plasma concentrations of glucose, beta hydroxybutyrate (BHB), non-esterified fatty acids (NEFA) and serum concentrations of cholesterol, triglycerides, urea, creatinine, total calcium, ionic calcium, total protein, uric acid, aspartate amino transferase (AST), gammaglutamyl transferase (GGT), and creatine kinase (CK) were measured. The concentrations of insulin and cortisol, the activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px), plasma ferric reduction ability (FRAP), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), as well as total antioxidant status (TAS) were determinate. Monocytes and neutrophils were assessed by *in vitro* method to identify aspects related to immunity in 24 ewes (six from each treatment) at -30, 0 and 30. Blood samples were evaluated without stimulus (basal burst), with DCFH-DA, SaPI and PMA stimulus. Immunophenotyping with monoclonal antibodies CD8, CD4, CD14, CD16, CD45R, WC1, CD206 were performed at -30, -15, 0, 7 and 30. The concentrations of vitamins D and E were determinate at the predetermined collection times and on the day of the Intravenous Glucose Tolerance Test (IVGTT), realized to evaluate the insulin sensitivity, as well as RQUICKI and RQUICKI BHB. All variables studied showed time effects. There were interaction time * treatment in TBARS ($P = 0.0217$) and tendency for vitamin E (0.0811), SOD (0.0886) and GSH-Px

($P = 0.0643$). Treatment effect on cholesterol ($P = 0.0088$) and vitamin D ($P < 0.0001$) and tendency for TAS ($P = 0.0830$) were observed. About of IVGTT, AUC results of BHB and AGNE showed number of fetuses effect ($P = 0.0006$ and 0.0005 respectively). RQUICKIBHB was a better indicator of insulin sensitivity than RQUICKI in ewes. Vitamin D supplementation influenced the plasma levels of alpha tocopherol and the immune response of ewes. Vitamin E supplementation reduced lipid peroxidation at parturition and was positively related to the oxidative improvement of the monocytes without stimulation and stimulated by PMA. High doses of vitamins D or E administered 45 days before parturition on healthy ewes can be beneficial; however more studies are needed about this topic.

Key words: cholecalciferol, tocopherol, antioxidant, pregnancy, transition period, glucose tolerance test.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) do peso (kg) de ovelhas no periparto suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018	83
Tabela 2 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) do ECC de ovelhas no periparto suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018	85
Tabela 3 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) da temperatura (°C) de ovelhas no periparto suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018.....	86
Tabela 4 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações plasmáticas de glicose (mmol/L) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018.....	88
Tabela 5 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações plasmáticas de betahidroxibutirato (BHB) (mmol/L) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018	89
Tabela 6 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações plasmáticas de ácidos graxos não esterificados (AGNE) (μmol/L) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018	91
Tabela 7 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações séricas de colesterol (mmol/L) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018	92
Tabela 8 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações séricas de triglicérides (mmol/L) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018.....	94
Tabela 9 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações séricas de ureia (mmol/L) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018	95
Tabela 10 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações séricas de creatinina (μmol/L) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018	96
Tabela 11 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações séricas de ácido úrico (μmol/L) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018	98

Tabela 12 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) da atividade de AST (UI/L 30° C) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 201899

Tabela 13 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) da atividade sérica da GGT (UI/L 30° C) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018101

Tabela 14 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) da atividade sérica de CK (UI/L 30°) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018102

Tabela 15 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações séricas de albumina (g/L) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018104

Tabela 16 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações séricas de proteína total (g/L) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018105

Tabela 17 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações séricas de cálcio (mmol/L) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018107

Tabela 18 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações séricas de cálcio ionizável (mmol/L) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018108

Tabela 19 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) do RQUICKI no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018110

Tabela 20 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) de RQUICKI BHB no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018111

Tabela 21 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações séricas de cortisol (ug/dL) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018113

Tabela 22 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações séricas de insulina (uIU/mL) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018114

Tabela 23 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações plasmáticas de colecalciferol (ng/mL) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018116

Tabela 24 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações plasmáticas de Vitamina E (α -tocoferol) (ng/mL) no periparto de

ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018	117
Tabela 25 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) da atividade de SOD (U/g de Hb) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018	119
Tabela 26 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) da atividade de GSH-Px (U/g de Hb) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018	120
Tabela 27 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações séricas de TAS (mmol/L) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018	122
Tabela 28 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações plasmáticas de TBARS (μ M) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018	123
Tabela 29 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações plasmáticas de HRFP (μ mol/L) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018	125
Tabela 30 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) da AUC de glicose (mmol/L/minuto) de ovelhas submetidas ao teste de tolerância à glicose (TTG) aos 128 dias de gestação, suplementadas ou não com vitaminas D ou E no 108º de gestação – São Paulo 2018	126
Tabela 31 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) da AUC de BHB (mmol/L/minuto) de ovelhas submetidas ao teste de tolerância à glicose (TTG) aos 128 dias de gestação, suplementadas ou não com vitaminas D ou E no 108º de gestação – São Paulo 2018	127
Tabela 32 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) do AUC de AGNE (μ mol/L/minuto) de ovelhas submetidas ao teste de tolerância à glicose (TTG) aos 128 dias de gestação, suplementadas ou não com vitaminas D ou E no 108º de gestação – São Paulo 2018	128
Tabela 33 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) do AUC da insulina (uIU/mL/ minuto) de ovelhas submetidas ao teste de tolerância à glicose (TTG) aos 128 dias de gestação, suplementadas ou não com vitaminas D ou E no 108º de gestação – São Paulo 2018	129
Tabela 34 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) burst basal de neutrófilos (UAF) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018	130
Tabela 35- Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) do burst oxidativo de monócitos (burst basal) (UAF) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018	131

Tabela 36 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) do burst oxidativo de neutrófilos com estímulo SaPI (UAF), no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018.....132

Tabela 37 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) burst oxidativo de monócitos com estímulo SaPI (UAF) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018.....133

Tabela 38 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) do burst oxidativo de neutrófilos com estímulo PMA no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018135

Tabela 39 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) burst oxidativo de monócitos com estímulo PMA (UAF) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018136

Tabela 40 – Valores médios e erros padrão da média (EPM) percentual da fagocitose de neutrófilos (%) no periparto de ovelhas suplementadas ou não ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018137

Tabela 41 – Valores médios e erros padrão da média (EPM) da intensidade da fagocitose de neutrófilos (UAF) no periparto de ovelhas suplementadas ou não ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018138

Tabela 42 – Valores médios e erros padrão da média (EPM) percentual da fagocitose de monócitos (%) no periparto de ovelhas suplementadas ou não ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018139

Tabela 43 – Valores médios e erros padrão da média (EPM) intensidade da fagocitose de monócitos (UAF) no periparto de ovelhas suplementadas ou não ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018140

Tabela 44 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) de CD8 (%) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018141

Tabela 45 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) de CD4 (%) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018142

Tabela 46 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) de ratio (razão) CD4/CD8 (%) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018143

Tabela 47 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) de CD16- e CD14+ (%) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018144

Tabela 48 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) de CD16+ e CD14+ (%) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018145

Tabela 49 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) de CD16+ e CD14- (%) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018146

Tabela 50 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) de CD206 (%) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018.....147

Tabela 51 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) de WC1 (%) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018.....148

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Valores médios e respectivos erros padrão da média do peso (kg) no período periparto de ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....	84
Gráfico 2 - Valores médios e respectivos erros padrão da média do ECC no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018	85
Gráfico 3 – Valores médios e respectivos erros padrão da média da temperatura (°C) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....	87
Gráfico 4 - Valores médios e respectivos erros padrão da média das concentrações plasmáticas de glicose (mmol/L) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E aos 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....	88
Gráfico 5 - Valores médios e respectivos erros padrão da média das concentrações plasmáticas de BHB (mmol/L) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....	90
Gráfico 6 – Valores médios e respectivos erros padrão da média das concentrações plasmáticas de (AGNE) (µmol/L) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....	91
Gráfico 7 - Valores médios e respectivo erros padrão da média das concentrações plasmáticas de colesterol (mmol/L) no período periparto das ovelhas do grupo controle, das ovelhas suplementadas com a vitamina D e das ovelhas suplementadas com a vitamina E no 108º dia de gestação durante o período experimental – São Paulo 2018.....	93
Gráfico 8 – Valores médios e respectivos erros padrão da média das concentrações séricas de triglicérides (mmol/L) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....	94
Gráfico 9 – Valores médios e respectivos erros padrão da média das concentrações séricas de ureia (mmol/L) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....	96
Gráfico 10 – Valores médios e respectivos erros padrão da média das concentrações séricas de creatinina (µmol/L) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....	97

Gráfico 11 – Valores médios e os respectivos erros padrão da média das concentrações séricas de ácido úrico ($\mu\text{mol/L}$) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....98

Gráfico 12 – Valores médios e respectivos erros padrão da média da atividade de AST (UI/L 30º C) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....100

Gráfico 13 – Valores médios e respectivos erros padrão da média da atividade séricas da GGT (UI/L 30º C) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....101

Gráfico 14 – Valores médios e respectivos erros padrão da média da atividade sérica de CK (UI/L 30º) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....103

Gráfico 15 – Valores médios e respectivos erros padrão da média das concentrações séricas albumina (g/L) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....104

Gráfico 16 – Valores de médios e respectivos erros padrão da média das concentrações séricas de proteína total (g/L) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....106

Gráfico 17 – Valores médios e respectivos erros padrão da média das concentrações séricas de cálcio (mmol/L) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....107

Gráfico 18 – Valores médios e respectivos erros padrão da média das concentrações séricas de cálcio ionizável (mmol/L) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....109

Gráfico 19 – Valores médios e respectivo erros padrão da média do RQUICKI no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....110

Gráfico 20 – Valores médios e respectivos erros padrão da média do RQUICKI BHB no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....112

Gráfico 21 – Valores de média geral e respectivos erros padrão da média das concentrações séricas de cortisol (ug/dL) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....113

Gráfico 22 – Valores médios e respectivos erros padrão da média das concentrações séricas de insulina (uIU/mL) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....115

Gráfico 23 – Valores médios e respectivos erros padrão da média das concentrações plasmáticas de colecalciferol (ng/mL) no período periparto das ovelhas do grupo controle, das ovelhas suplementadas com as vitaminas D e das ovelhas suplementadas com E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....116

Gráfico 24 – Valores médios e respectivos erros padrão da média das concentrações plasmáticas de Vitamina E (α -tocoferol) (ng/mL) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....118

Gráfico 25 – Valores médios e respectivos erros padrão da média da atividade de SOD (U/g de Hb) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....119

Gráfico 26 – Valores médios e respectivos erros padrão da média da atividade de GSH-Px (U/g de Hb) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....121

Gráfico 27 – Valores médios e respectivos erros padrão da média das concentrações séricas de TAS (mmol/L) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....122

Gráfico 28 – Valores médios e respectivos erros padrão da média das concentrações plasmáticas de TBARS (μ M) no período periparto das ovelhas do grupo controle, das ovelhas suplementadas com as vitaminas D e das ovelhas suplementadas com a vitamina E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....124

Gráfico 29 – Valores médios e respectivos erros padrão da média das concentrações plasmáticas de HRFP (μ mol/L) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....125

Gráfico 30 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) da AUC de glicose (mmol/L/minuto) de ovelhas submetidas ao teste de tolerância à glicose (TTG) aos 128 dias de gestação, do grupo controle ou suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018126

Gráfico 31 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) da AUC de BHB (mmol/L/minuto) de ovelhas submetidas ao teste de tolerância à glicose (TTG) aos 128 dias de gestação, do grupo controle ou suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018127

Gráfico 32 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) DO AUC de AGNE (μ mol/L/minuto) de ovelhas submetidas ao teste de tolerância à glicose (TTG) aos 128 dias de gestação, do grupo controle ou suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018128

Gráfico 33 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) do AUC da insulina (uIU/mL/ minuto) de ovelhas submetidas ao teste de tolerância à glicose (TTG) aos 128 dias de gestação, do grupo controle ou suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....129

Gráfico 34 – Média e erro padrão da média do burst basal de neutrófilos (UAF) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....131

Gráfico 35 – Valores médios e respectivos erros padrão da média do burst oxidativo de monócitos (burst basal) (UAF) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018132

Gráfico 36 – Valores médios e respectivos erros padrão da média do burst oxidativo de neutrófilos com estímulo SaPI (UAF), no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018133

Gráfico 37 – Valores médios e respectivos erros padrão da média da burst oxidativo de monócitos com estímulo SaPI (UAF) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....134

Gráfico 38 – Valores médios e respectivos erros padrão da média do burst oxidativo de neutrófilos com estímulo PMA (UAF) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018135

Gráfico 39 – Valores médios e respectivos erros padrão da média de burst de monócitos com estímulo PMA (UAF) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....136

Gráfico 40 - Valores médios e respectivos erros padrão da média do percentual da fagocitose de neutrófilos (%) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....137

Gráfico 41 - Valores médios e respectivos erros padrão da média da intensidade da fagocitose de neutrófilos (UAF) no período periparto das ovelhas do grupo controle e

das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....	138
Gráfico 42 – Valores médios e respectivos erros padrão da média do percentual da fagocitose de monócitos (%) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....	140
Gráfico 43 – Valores médios e respectivos erros padrão da média da intensidade da fagocitose de monócitos (UAF) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....	141
Gráfico 44 – Valores médios e respectivos erros padrão da média de CD8 (%) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....	142
Gráfico 45 – Valores médios e respectivos erros padrão da média de CD4 (%) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....	143
Gráfico 46 – Valores médios e respectivos erros padrão da média da ratio CD4/CD8 (%) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....	144
Gráfico 47 – Valores médios e respectivos erros padrão da média de CD16- e CD14 + (%) no período periparto das ovelhas do grupo controle, do grupo tratado com vitamina D e das tratadas com vitamina E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....	145
Gráfico 48 – Valores médios e respectivos erros padrão da média de CD16+ e CD14+ (%) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....	146
Gráfico 49 - Valores médios e respectivos erros padrão da média de CD16+ e CD14+ (%) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....	147
Gráfico 50 - Valores médios e respectivos erros padrão da média de CD206 (%) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....	148
Gráfico 51 - Valores médios e respectivos erros padrão da média de WC1 (%) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....	149
Gráfico 52 - Relação entre a determinação de vitamina D e vitamina E (ng/dL) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....	149

- Gráfico 53 – Relação entre a concentração sérica de colesterol (mmol/L) e TAS (mmol/L) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....150
- Gráfico 54 - Relação entre a concentração de HRFP ($\mu\text{mol/L}$) e vitamina E (ng/dL) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....151
- Gráfico 55 - Relação entre burst basal de monócitos (UAF) e HRFP ($\mu\text{mol/L}$) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....151
- Gráfico 56 - Relação entre burst basal de monócitos (UAF) e vitamina E (ng/dL) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....152
- Gráfico 57 -Relação entre burst oxidativo com estímulo PMA (UAF) e HRFP ($\mu\text{mol/L}$) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....152
- Gráfico 58 - Relação entre percentual de fagocitose de monócitos (%) e HRFP ($\mu\text{mol/L}$) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018153
- Gráfico 59 - Relação entre percentual de fagocitose de monócitos (%) e vitamina E (ng/dL) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018154
- Gráfico 60 - Relação entre intensidade de fagocitose de neutrófilos (UAF) e GSH-Px (U/g de Hb) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018154
- Gráfico 61 - Relação entre intensidade de fagocitose de neutrófilos (UAF) e SOD (U/g de Hb) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018155
- Gráfico 62 - Relação entre intensidade de fagocitose de neutrófilos (UAF) e TBARS (μM) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....156
- Gráfico 63 - Relação entre CD16+CD14- (%) e a atividade de SOD (U/g de Hb) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....156
- Gráfico 64 - Relação entre CD16+CD14- (%) e a atividade de GSH-Px (U/g de Hb) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....157

Gráfico 65 - Relação entre CD16+CD14+ (%) e TBARS (μM) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018158

Gráfico 66 - Relação entre CD16-CD14+ (%) e HRFP ($\mu\text{mol/L}$) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018158

Gráfico 67 - Relação Relação entre GSH-Px (U/g de Hb) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....159

Gráfico 68 - Relação Relação entre TAS (mmol/L) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018.....160

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Estímulos utilizados na citometria de fluxo de ovelhas submetidas ao teste de tolerância à glicose (TTG) aos 128 dias de gestação, do grupo controle ou suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação..... 80

Quadro 2 - Anticorpos utilizados na imunofenotipagem de ovelhas submetidas ao teste de tolerância à glicose (TTG) aos 128 dias de gestação, do grupo controle ou suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação.....81

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	33
2 REVISÃO DE LITERATURA	35
2.1 PERÍODO PERIPARTO	35
2.2 PERFIL METABÓLICO	37
2.3 RESISTÊNCIA INSULÍNICA	42
2.4 METABOLISMO OXIDATIVO	50
2.5 IMUNIDADE	57
2.6 VITAMINAS D e E	61
3 OBJETIVOS	68
4 MATERIAL E MÉTODOS	69
4.1 ANIMAIS E INSTALAÇÕES	69
4.2 PROCEDIMENTOS	70
4.3 MÉTODOS ANÁLITICOS	71
4.3.1 VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS	73
4.3.1.1 Glicose	73
4.3.1.2 Betahidróxibutirato	74
4.3.1.3 Ácidos graxos não esterificados	74
4.3.1.4 Colesterol	74
4.3.1.5 Triglicérides	74
4.3.1.6 Ureia	75
4.3.1.7 Creatinina	75
4.3.1.8 Ácido úrico	75
4.3.1.9 Aspartato aminotransferase	75
4.3.1.10 Gamaglutamiltransferase	76
4.3.1.11 Creatino quinase	76
4.3.1.12 Albumina	76
4.3.1.13 Proteína total	76
4.3.1.14 Cálcio total	77
4.3.1.15 Cálcio iônico	77
4.3.2 HORMÔNIOS	77
4.3.2.1 Cortisol	77
4.3.2.2 Insulina	78
4.3.3 DETERMINAÇÃO DAS VITAMINAS	78
4.3.3.1 Determinação de colecalciferol (vitamina D) e acetato de α - tocoferol (vitaminaE)	78
4.3.4 METABOLISMO OXIDATIVO	78
4.3.4.1 Superóxido dismutase (SOD) e Glutathione Peroxidase (GSH-Px)	78
4.3.4.2 Status antioxidante total (TAS)	78
4.3.4.3 Concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	79
4.3.4.4 Habilidade de redução férrica plasmática (HRFP)	79
4.3.5 AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE: ENSAIOS FUNCIONAIS DE METABOLISMO OXIDATIVO E FAGOCITOSE E IMUNOFENOTIPAGEM	79
4.3.5.1 Ensaio de fagocitose e metabolismo oxidativo	79

4.3.5.2 Lise de hemácias e congelamento	80
4.3.5.3 Descongelamento para imunofenotipagem	81
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	82
5. RESULTADOS	83
5.1 Peso, ECC e temperatura	83
5.1.1 Peso	83
5.1.2 Escore de condição corporal (ECC)	84
5.1.3 Temperatura retal	86
5.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	87
5.2.1 Glicose	87
5.2.2 Betahidróxibutirato (BHB)	89
5.2.3 Ácidos graxos não esterificados (AGNE)	90
5.2.4 Colesterol	92
5.2.5 Triglicérides	93
5.2.6 Ureia	95
5.2.7 Creatinina	96
5.2.8 Ácido úrico	97
5.2.9 Aspartato aminotransferase	99
5.2.10 Gamaglutamiltransferase	100
5.2.11 Creatino quinase	102
5.2.12 Albumina	103
5.2.13 Proteína total	105
5.2.14 Cálcio	106
5.2.15 Cálcio iônizável	108
5.3 RQUICKI CALCULADOS	109
5.3.1 RQUICKI	109
5.3.2 RQUICKI BHB	111
5.4 HORMÔNIOS	112
5.4.1 Cortisol	112
5.4.2 Insulina	114
5.5 DETERMINAÇÃO DAS VITAMINAS	115
5.5.1 Concentração de colecalciferol (vitamina D)	115
5.5.2 Concentração de acetato de α - tocoferol (vitamina E)	117
5.6 METABOLISMO OXIDATIVO	118
5.6.1 Superóxido dismutase (SOD)	118
5.6.2 Glutathiona Peroxidase (GSH-Px)	120
5.6.3 Status antioxidante total (TAS)	121
5.6.4 Concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	123
5.6.5 Habilidade de redução férrica plasmática (HRFP)	124
5.7 Teste de tolerância à glicose (TTG)	126
5.7.1 Área abaixo da curva (AUC) - glicose	126
5.7.2 Área abaixo da curva (AUC) - betahidroxibutirato (BHB)	127
5.7.3 Área abaixo da curva (AUC) - ácidos graxos não esterificados (AGNE)	128
5.7.4 Área abaixo da curva (AUC) - insulina	129
5.8 AVALIAÇÃO DE ASPECTOS DA IMUNIDADE	130
5.8.1 Burst oxidativo de neutrófilos (Burst basal)	130
5.8.2 Burst oxidativo de monócitos (burst basal)	131
5.8.3 Burst oxidativo de neutrófilos com estímulo SaPI	132
5.8.4 Burst oxidativo de monócitos com estímulo SaPI	133
5.8.5 Burst oxidatvo de neutrófilos com estímulo PMA	134

5.8.6 Burst oxidatvo de monócitos com estímulo PMA	135
5.8.7 Percentual da fagocitose de monócitos	137
5.8.8 Intensidade da fagocitose de monócitos	138
5.8.9. Percentual da fagocitose de neutrófilos	139
5.8.10 Intensidade da fagocitose de neutrófilos	140
5.8.11 CD8	141
5.8.12 CD4	142
5.8.13 Razão CD4/CD8	143
5.8.14 CD16 ⁻ CD14 ⁺	144
5.8.15 CD16 ⁺ CD14 ⁺	145
5.8.16 CD16 ⁺ CD14 ⁻	146
5.8.17 CD206	147
5.8.18 WC1	148
5.10 RELAÇÕES ENTRE VARIÁVEIS.....	149
5.10 RELAÇÕES ENTRE VARIÁVEIS.....	149
5.10.1 Relação entre vitamina D e vitamina E	149
5.10.2 Relação entre colesterol e TAS.....	150
5.10.3 Relação entre HRFP e vitamina E	150
5.10.4 Relação entre burst basal de monócitos e HRFP	151
5.10.5 Relação entre burst basal de monócitos e vitamina E	152
5.10.6 Relação entre burst oxidativo com estímulo PMA e HRFP	152
5.10.7 Relação entre o percentual de fagocitose de monócitos e HRFP.....	153
5.10.8 Relação entre o percentual de fagocitose de monócitos e vitamina E.....	153
5.10.9 Relação entre a intensidade de fagocitose de neutrófilos e GSH-Px	154
5.10.10 Relação entre a intensidade de fagocitose de neutrófilos e SOD.....	155
5.10.11 Relação entre a intensidade de fagocitose de neutrófilos e TBARS.....	155
5.10.12 Relação entre CD16+CD14 ⁻ e SOD.....	156
5.10.13 Relação entre CD16+CD14 ⁻ e GSH-Px	157
5.10.14 Relação entre CD16+CD14 ⁺ e TBARS	157
5.10.15 Relação entre CD16-CD14 ⁺ e HRFP.....	158
5.10.16 Relação entre GSH-Px e temperatura.....	159
5.10.17 Relação entre TAS e temperatura.....	159
6.DISSCUSSAO	161
7.CONCLUSÕES	188
REFERÊNCIAS.....	189

1 INTRODUÇÃO

Nos sistemas intensivos de criação, junto com a melhora da eficiência produtiva, observa-se aumento dos problemas nutricionais e metabólicos em relação aos problemas parasitários e infecciosos. A intensificação tem levado ao aumento de alguns transtornos nutricionais e metabólicos, especialmente os associados ao metabolismo energético, como é o caso do excesso de peso dos animais. Dentre as enfermidades metabólicas nos pequenos ruminantes domésticos, a toxemia da prenhez (TP) é a doença que ainda necessita de estudos em relação à patogenia e à terapia. Assim, estudos que possam contribuir em algum sentido para esclarecer a patogenia e auxiliar no tratamento, são considerados de suma importância.

Trabalhos recentes têm apontado a resistência à insulina como um dos importantes fatores envolvidos na patogenia destes processos (DUEHLMEIER et al., 2013). Os corpos cetônicos aumentados nestes quadros ou até mesmo nos casos de balanço energético negativo podem gerar radicais superóxido e hidroxila e causar estresse oxidativo e disfunção celular, como observado em ovelhas com TP, em vacas com cetose inaparente ou até mesmo em pessoas diabéticas (YAP et al., 2014; MUTINATI, et al., 2013; AL-QUDAH, 2011;). Neste contexto tem crescido o interesse científico em estudar o envolvimento de espécies reativas de oxigênio na patogenia destes processos (CELI, 2010; AGARWAL, 2005; BERNABUCCI, 2002).

Assim, estudos em diferentes espécies têm sido conduzidos para minimizar ou prevenir as consequências decorrentes da ação das espécies reativas de oxigênio (EROS), que são capazes de modificar qualquer molécula biológica e alterar a função e viabilidade celular (HATHERILL et al., 1991; FERREIRA, 2007; CELI, 2010). Boa parte dos estudos que consideram a utilização de antioxidantes exógenos, o fazem pela via oral (MILLER et al., 1993; SPEARS & WEISS, 2008; NAYYAR, S. & JINDAL, R., 2010). Porém, estudos com apenas uma administração parenteral de vitamina no pré-parto mostrou importantes efeitos antioxidantes

(HIDIROGLOU et al., 1986; LE BLANC et al., 2002; CHATERJEE et al., 2003; CELI et al., 2008; BOUWSTRA et al., 2010).

Nesse sentido, a utilização de antioxidantes exógenos para fêmeas no período periparto, onde ocorre a maior parte das doenças metabólicas em um sistema intensivo de produção, tem sido fundamental para minimizar estes efeitos. Desta forma, merecem destaque as vitaminas antioxidantes, como as vitaminas E (LEBLANC et al., 2002), C e até mesmo a vitamina D, que embora classicamente tenha sua importante função unicamente associada ao metabolismo do cálcio e do fósforo, mais recentemente suspeita-se de sua importância tanto na sensibilidade insulínica como na melhora da resposta imune (MUTINATI, et al., 2013; CELI, 2010; LEBLANC et al., 2002).

Por ainda faltarem dados que comprovem ou ao menos apontem para o real benefício da suplementação destas vitaminas nesta fase da vida produtiva de uma fêmea ruminante, o presente trabalho de pesquisa tem por objetivo avaliar o impacto da administração de dose única de vitamina E ou D no início do terço final da gestação na sensibilidade insulínica, metabolismo oxidativo e imunidade de ovelhas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Devido à complexidade do assunto, o mesmo será abordado em tópicos na revisão de literatura.

2.1 PERÍODO PERIPARTO

Para os ruminantes de produção, isto é para vacas, cabras e ovelhas, o período periparto é a fase de maior importância (DRACKLEY et al., 2001). Corresponde às três semanas que antecedem o parto até três semanas após o parto (INGRAHAM & KAPPEL, 1988; GRUMMER, 1995). É marcado pelo final da gestação e início da lactação, onde ocorrem grandes mudanças adaptativas, somadas à maior demanda por nutrientes, devido ao crescimento fetal em 70%, além da menor capacidade de consumo de matéria seca por parte da matriz que entra em balanço energético negativo (RUSSEL, 1979; CAMPOS, 2007; OLIVEIRA, 2010). Devido a isso, as principais doenças metabólicas que afetam pequenos ruminantes ocorrem durante esse período, caracterizadas pela mobilização de gordura, aumento de ácidos graxos não esterificados (AGNEs) circulantes e BEN (CELI, 2010, MOHAMMADI et al., 2016).

A mais importante doença metabólica que acomete ovelhas no terço final da gestação, geralmente múltipla é a toxemia da prenhez (TP), distúrbio metabólico e hormonal, multifatorial comum nos sistemas intensivos de criação (ORTOLANI e BENESI, 1989; ORTOLANI, 1994; ROOK, 2000). Embora a TP possa ocorrer tanto em ovelhas magras (Tipo I), subalimentadas durante a gestação, como em ovelhas com sobrepeso (Tipo II), a frequência desta última tem aumentado consideravelmente em função da intensificação (ORTOLANI, 1994; ARAÚJO, 2010; SANTOS et al., 2011).

Na TP do tipo I, a hipoglicemia por volta do 120º dia de gestação é estabelecida, diferindo da forma aguda de hipoglicemia observada na TP do tipo II. Dentre os fatores predisponentes para ambas, destacam-se a nutrição inadequada no final da gestação e altas exigências de glicose por fetos múltiplos ou um único feto

grande, baixo ECC (<2,0) ou muito alto (> 4,0) (KAHN e LINE, 2005; RADOSTITIS et al., 2007; SCHLUMBOHM & HARMEYER, 2008; LOTFOLLAHZADEH et al., 2016).

A doença do tipo II é atribuída a um fator desencadeante de reação adrenal, com intensa mobilização de gordura pelo fígado, promovendo esteatose, com consequente redução de gliconeogênese e inibição do apetite (ORTOLANI, 1994; ARAÚJO 2010). A hipoglicemia decorrente do aumento das concentrações de betahidroxibutirato, inibem a gliconeogênese hepática, aumentando a hipoglicemia materna (SCHLUMBOHM & HARMEYER, 2004; DUEHLMEIER et al., 2011). A TP tipo II, isto é, que acomete ovelhas com elevado escore de condição corporal, é mais frequente nos sistemas intensivos de produção e raramente ocorre nas unidades de pastejo extensivo (ANDREWS, 1997; RADOSTITS et al., 2007; SANTOS, et al., 2011). Sua fisiopatologia não está completamente elucidada, porém está associada à alteração no metabolismo energético no final de gestação (ROOK, 2000; SCHLUMBOHM & HARMEYER, 2007).

Para a adaptação homeorrética, ocorre intensa atividade metabólica, e há partição de nutrientes favorecendo a produção de leite (BAUMAN, 2000; LEBLANC, 2010), e mecanismos homeostáticos são superpostos, dos quais a resistência insulínica está presente, além de redução no consumo da ração, balanço energético negativo (BEN), lipólise e perda de peso no início da lactação, hipocalcemia pós-parto, diminuição da função imune uma ou duas semanas pré-parto e duas a três semanas pós-parto e contaminação bacteriana do útero durante duas a três semanas pós-parto.

Durante o período periparto, todos os fatores mencionados, somados às alterações hormonais, contribuem para diminuição da resposta de neutrófilos, comprometendo a resposta imune inata, que é a principal forma de resposta imunitária no útero, e a migração de neutrófilos aliada à atividade fagocitária e oxidativa relaciona-se com a ocorrência de retenção de placenta (RP) (KIMURA et al., 2002), metrite e endometrite (HAMMON et al., 2006). Dentre as alterações hormonais, o aumento da concentração de estradiol e de prostaglandina F2 α tende a aumentar o fluxo sanguíneo para o útero e o influxo de células imunes, e ainda o aumento na concentração de cortisol suprime a resposta imune, por causar a infra-regulação da expressão de L-selectina e integrinas- β 2 por neutrófilos, e de moléculas de adesão envolvidas no tráfego de neutrófilos a partir do endotélio para o local de infecção

(BURTON & KEHRLI, 1995; BURTON et al., 1995; BURTON et al., 2005; SANTOS et al., 2014).

Dentre às alterações hormonais relacionadas ao parto, temos que o período é influenciado pelo principal hormônio glicocorticoide do metabolismo, o cortisol, com importante papel gliconeogênico, funciona como sinalizador do momento do parto (PAIVA et al., 2006), devido sua função de transportador de glicose para os tecidos placentários (SWENSON; REECE, 1996), suas concentrações encontram-se aumentadas no final da gestação (REECE 2007; CAMPOS et al., 2009; ARAÚJO et al., 2010), e tendem a reduzir progressivamente no pós-parto em relação às últimas semanas de gestação (CAMPOS et al., 2009). Outros autores também observaram aumento nas concentrações de cortisol em vacas no momento do parto (HUDSON et al., 1975; AURICH et al., 1993; LIMA, 2013). Em situações de estresse também podem elevar concentrações deste glicocorticoide (FORD et al. 1990). Porém, Araújo (2010), trabalhando com ovelhas gestantes, não observou aumento na concentração do cortisol até 6 horas pós-parto, provavelmente pelo pico glicêmico que ocorre no parto. Khan & Ludri (2002) observaram em cabras concentrações menores 1 dia antes do parto. De modo geral, como as concentrações de cortisol aumentam em situações de estresse, e podem resultar em imunossupressão, suas concentrações são frequentemente utilizadas como indicador de estresse (NANDA et al., 1990; SANTOS et al., 2014).

Diante de todos os eventos adaptativos metabólicos que ocorrem no período periparto, somados ao objetivo de manter a saúde e bem-estar da fêmea e de seus produtos, é de fundamental importância o manejo alimentar e sanitário bem controlados, bem como instalações e monitoramento adequados. Desta forma, o acompanhamento pode ser realizado por ferramentas diagnósticas como a avaliação do perfil metabólico, avaliação do escore de condição corporal (ECC) e parâmetros fisiológicos obtidos a partir de exame físico são importantes (BRONDANI et al., 2016).

2.2 PERFIL METABÓLICO

Durante o período periparto problemas metabólicos e infecciosos ocasionados pela redução no consumo da ração, balanço energético negativo, lipólise e perda de peso no início da lactação, queda na função imune no periparto,

contaminação bacteriana do útero durante duas a três semanas após o parto são comuns (LEBLANC, 2012). O monitoramento da fêmea gestante é impreterível para preservar sua saúde e bem-estar, bem como de sua progênie.

Além das medidas de manejo nutricional e sanitário, instalações adequadas, e avaliação clínica, ferramentas diagnósticas podem ser utilizadas. O perfil metabólico (PM), proposto por Payne em 1970, está entre os métodos mais utilizados no monitoramento de alterações metabólicas e permite a partir de análises sanguíneas de indivíduos do rebanho, uma avaliação da capacidade de adequação das vias metabólicas energética, proteica e de minerais, bem como a avaliação da funcionalidade de órgãos vitais, como o fígado. Porém, apesar de sua efetiva contribuição no monitoramento de rebanhos, sua utilização para predizer doenças metabólicas é discutido (INGRAHAM & KAPPEL, 1988; GONZALEZ et al., 2000; RUSSEL & RUSSEL, 2007; LAGER & JORDAN, 2012; OLIVEIRA et al., 2014; SÁ et al., 2014; SUCUPIRA, 2015; OLIVEIRA et al., 2016).

O PM é utilizado na avaliação do estado nutricional e da saúde animal (HERDT et al., 2000B; ANTUNOVIC et al., 2009; ANTUNOVIC et al., 2011; BRONDANI et al., 2016). As variações significativas dos parâmetros sanguíneos dependem de muitos fatores genéticos ou não, e do estado fisiológico (ANTUNOVIC et al., 2002; ROUBIES et al., 2006; ANTUNOVIC et al., 2011). No entanto, a maioria das pesquisas não inclui todos os parâmetros bioquímicos e hematológicos importantes, bem como alguns hormônios (leptina, insulina e hormônios tireoidianos) no sangue de ovelhas (SANTOS et al., 2011). A escolha das variáveis para avaliação do PM depende da suspeita clínica, estabilidade da amostra até a análise, facilidade da análise e custo (GONZÁLEZ & SCHEFFER, 2003).

Avaliar o perfil energético de um rebanho de ovelhas durante a gestação torna-se importante ferramenta para monitorar o status nutricional e detectar possíveis alterações metabólicas decorrentes das modificações de manejo (PAYNE & PAYNE, 1987; ARAÚJO et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2015; BRONDANI et al., 2016). Dentre as variáveis associadas ao metabolismo energético, temos betahidroxibutirado (BHB) e ácidos graxos não esterificados (AGNE) (CALDEIRA et al., 2007; KARAGIANNIS, et al., 2014), glicose, colesterol, triglicérides (AEGERHARD et al., 2001; KIDA, 2003; LAGO et al., 2004).

Para ruminantes, os dois principais indicadores do metabolismo protéico capazes de demonstrar o estado proteico a curto e longo prazo, são as concentrações

séricas de uréia e albumina respectivamente (PAYNE & PAYNE, 1987). Menores concentrações de proteínas totais no plasma relacionam-se com deficiência protéica na alimentação, sem influência patológica. Estima-se que dietas com menos de 10% de proteína causam diminuição dos teores protéicos no sangue (KANEKO et al., 1997). Em vacas leiteiras, 11 semanas após o parto, foi encontrada relação inversa entre ECC e teores de proteína total, nitrogênio uréico e colesterol (SHRESTHA et al., 2005). As concentrações de uréia sérica, em ovinos tendem ser sempre mais altas que em bovinos (RIBEIRO et al., 2003; BEZERRA et al., 2006). O metabolismo proteico pode ser avaliado a partir das mensurações das concentrações de ureia, proteína total, albumina, globulinas (GONZÁLEZ & SCHEFFER, 2003) e hemoglobina (WITTEWER et al., 2000; CONTRERAS et al., 2000). A função hepática a partir da atividade das enzimas aspartato amino transferase (AST), gamaglutamil transferase (GGT), e ainda a creatina quinase (CK) descrita como o melhor marcador indireto de dano ao tecido muscular (MUNDIM et al., 2007) e creatinina são mensuradas classicamente recomendadas para a avaliação da função renal (ARAÚJO, 2010).

Le Blanc et al. (2012), observaram em seus estudos que todas as vacas vivenciaram algum grau de hipocalcemia ao parto e até 3 dias após. Aparentaram ainda, que dados sobre os limites circulantes de cálcio, especialmente aqueles associados a resultados indesejáveis são conflitantes. Esses autores mostraram que as concentrações plasmáticas de cálcio inferiores a 2,2 mmol/L na semana após o parto, apesar de estar na faixa de vacas saudáveis, foi associada ao aumento da probabilidade de ocorrência de deslocamento de abomaso, devido a diminuição de suas concentrações na musculatura lisa, além de queda na produção leiteira no início da lactação e menor probabilidade de prenhez no primeiro serviço. O cálcio (Ca) sanguíneo apresenta-se nas formas livre ionizada (cerca de 45%) ou associado a moléculas orgânicas, como proteínas, principalmente albumina (cerca de 45%), ou ácidos orgânicos (Cerca de 10%). Desempenha importante função estrutural no músculo esquelético, atua no controle da entrada de íons através das membranas celulares e ativa funções secretoras e de contração celular (THRALL, 2007). Sua totalidade é mensurada no sangue (cálcio total), e sua forma biologicamente ativa, a forma ionizada se mantém em equilíbrio com a forma não-ionizada, sua distribuição depende do pH, concentração de albumina e relação ácido-base. Menores concentrações de albumina diminuem o cálcio sanguíneo (GONZÁLEZ & SCHEFFER, 2002).

A forma ionizada do cálcio, mais importante fisiologicamente atua na contração do músculo cardíaco, reações enzimáticas, transporte de membrana, secreção hormonal, controle no metabolismo do glicogênio hepático, motilidade espermática, coagulação do sangue, reabsorção tubular renal e absorção intestinal (SCHENCK et al., 2006). Sua mensuração é recomendada para a avaliação da posição do cálcio em ovelhas (SMITH, 1996). Concentrações séricas de cálcio total são observadas abaixo dos valores de referência no parto em ovelhas. Suas concentrações séricas podem apresentar diminuição nas últimas 6 semanas de gestação (BLOOD, 1991). Lotfollahzadeh et al. (2016) observaram redução das concentrações de cálcio sérico mais importante em ovelhas em gestação gemelar quando comparadas a ovelhas em gestação única ($P = 0,0003$). Teores séricos de cálcio 50-60% menores no final da gestação, foram apontados como causa de hipocalcemia em ovelhas (LOTFOLLAHZADEH et al., 2016; JENSEN e SWIFT, 1982). Dentre os mecanismos de homeostase das concentrações de cálcio, estão envolvidos os rins, ossos e trato gastrointestinal e respostas adaptativas às concentrações de cálcio sanguíneo incluem alterações nas concentrações de hormônio da paratireoide, vitamina D e calcitonina (DHUPA & PROULX, 1998).

Desde a década de 70, a relação entre a concentração de cálcio na diminuição da secreção de insulina foi apontada (BLUM et al., 1972). Foi demonstrada participação do cálcio nas diferentes fases de secreção de insulina pelas células β -pancreáticas (WALZ, 2007) e no metabolismo de carboidratos (SCHLUMBOHM et al., 2003; RUTTER et al., 2006). A participação do cálcio durante a gestação relaciona-se com a mineralização do esqueleto fetal, o que promove adaptações metabólicas importantes, incluindo o fato da participação deste mineral em diferentes sistemas (SCHMITT et al., 2012).

Além da avaliação do PM, pode-se presumir a atividade metabólica através da avaliação da condição nutricional de ruminantes, pelo escore de condição corporal (ECC), que é a ferramenta mais difundida (CALDEIRA, et al., 2007). Apesar de subjetiva, não requer investimentos e permite mensurar a gordura corporal (ROCHE et al., 2009). Em ovelhas, menores ECC são observados quanto mais se aproxima o parto e a lactação (RIBEIRO et al., 2002). SMITH & SHERMAN (1994) e Barbosa et al. (2016) sugerem ECC entre 3,0 e 3,5 no terço final da gestação, 3,5 no parto e entre 2,5 (SMITH & SHERMAN, 1994) a 2,0 (SUSIN et al., 1996; SMITH & SHERMAN, 1994) no desmame em escala de 0 a 5. Entretanto, Caldeira et al. (2007)

preconiza que alterações metabólicas sejam detectadas antes que o ECC seja afetado. Nos casos de TPI, o ECC de ovelhas encontra-se inferior à 2,5 e na TPIL, relaciona-se a superalimentação (ORTOLANI & BENESI, 1989).

A alta demanda energética, promove intensa mobilização de tecido adiposo da gestante, há redução das concentrações maternas de insulina (REGNAULT et al., 2004), aumentando teores de ácidos graxos não esterificados (AGNEs) (VERNON, 1998). Tanto na cetose bovina, que comumente acomete vacas de alta produção leiteira no início da lactação, como na toxemia da prenhez em ovinos ou cetose ovina (ARAÚJO, 2010), que acomete fêmeas multíparas, há envolvimento de alterações no metabolismo e tecido adiposo, com produção de altas concentrações de cetonas no plasma, hipoglicemia e teores elevados de AGNE. Os AGNE são os principais precursores de cetonas em animais cetóticos, sendo que substâncias como o ácido nicotínico, que inibem a lipólise, reduzem os teores plasmáticos de AGNE e de cetona. Concentrações aumentadas de AGNE estão relacionadas como importante fator de risco para o acúmulo de gordura hepática podendo ter efeito sobre a função de neutrófilos (LEBLANC, 2012). Os fatores responsáveis pela taxa aumentada de lipólise durante a cetose não estão claramente definidos. Porém, a hipoglicemia pode reduzir a reesterificação através da liberação de ácidos graxos. Outros fatores que podem estar envolvidos, e a redução de concentrações plasmáticas de insulina que podem diminuir durante a cetose, contudo as alterações tendem a ser pequenas, o que dificulta sua observação (VERNON, 1988). No início da lactação, os AGNEs garantem a energia para a produção do leite, auxiliam no fornecimento de energia em diferentes tecidos, priorizando a utilização de glicose e aminoácidos para glândula mamária (CHILLIARD, 1999), porém, quando a mobilização de AGNEs é muito intensa, a produção de corpos cetônicos no fígado aumenta (ANDREWS, 1997; HENZE et al., 1998; PANOUSIS et al., 2001; SARGISON, 2007; FTHENAKIS et al., 2012), desencadeando desta forma o quadro de cetose (LOOR et al., 2007), quando ocorre no pós-parto ou toxemia da prenhez (TP), quando ocorre no período anterior ao parto (ARAÚJO, 2010).

A obtenção de glicose como fonte de energia nos ruminantes, se dá a partir da gliconeogênese, com a digestão de carboidratos no rúmem, metabolizados em ácidos graxos de cadeia curta (ácidos propiônico, acético e butírico). Dos quais, o ácido propiônico produz 50% da glicose disponibilizada a partir de sua transformação no fígado (GONZÁLEZ & SILVA, 2006). A alanina e o aspartato, fornecem 30 a 35%

de glicose a partir de vias gliconeogênicas, e pode ainda haver obtenção de glicose através do metabolismo anaeróbico lactato e do glicerol a partir de triglicerídios plasmáticos (ORTOLANI, 1994). A glicose é indispensável para o desenvolvimento do feto, uma vez que é considerada principalmente como fonte de energia. O feto de ovelha a utiliza como principal metabólito e devido ao seu rápido desenvolvimento, as necessidades energéticas da ovelha aumentam ao longo da gestação (HAFFAF et al., 2016).

O maior requerimento energético ocorre no início e pico da lactação, porém não o suficiente para desencadear qualquer transtorno metabólico (SILVA et al., 2013; CONTRERAS et al., 2000). Trabalhos recentes têm apontado a resistência à insulina como um dos importantes fatores envolvidos na patogenia destes processos (KUNZ et al., 1985; CAMPOS et al., 2007; LEBLANC, 2012; DUEHLMEIER et al., 2013).

2.3 RESISTÊNCIA INSULÍNICA

A glicose é a principal fonte de energia para todos os tipos celulares de mamíferos, de onde provém ATP em condições aeróbicas e anaeróbicas, trata-se de uma molécula polar, insolúvel na membrana plasmática (MACHADO, 1998), com peso molecular 180, o que permite seu transporte por difusão facilitada, já que a difusão de poros da membrana se dá apenas com moléculas de peso molecular até 100. Sua captação para os tecidos é constituída por várias etapas, onde as adipocinas secretadas pelo tecido adiposo principalmente o TNF α e os ácidos graxos livres, associados ao consumo elevado de gorduras, ativam proteínas inflamatórias como c-jun N-terminal kinase (JNK), Ikappa kinase (ikK), fator de transcrição kB (NF-kB) e assim a sinalização da insulina pode ser alterada, o que compromete a entrada de glicose para as células. Diferente de monogástricos, que dependem da absorção de glicose intestinal como um suprimento exógeno, os ruminantes absorvem apenas pequenas quantidades de glicose nos intestinos. Em seres humanos, evidências científicas mostram que o exercício físico aumenta a captação de glicose por uma via distinta a da insulina, sendo dependente da ativação de proteína quinase ativada por AMP (AMPK) que diminui a expressão de proteínas inflamatórias (FREITAS et al.,

2014). A maioria da glicose circulante em ruminantes é originária de gluconeogênese hepática e renal (DE KOSTER et al., 2013).

Quanto aos mecanismos de transporte de glicose, existem dois mecanismos na membrana celular: transporte facilitado, mediado por transportadores de membrana específicos (GLUT) e o co-transporte com o íon Sódio (SGLT). O transporte dependente da presença de proteínas transportadoras (GLUTs) ocorre na superfície de todas as células. Os GLUTs têm capacidade de realizar fluxo bidirecional de glicose que será determinado pelo gradiente do substrato intra ou extracelular. Portanto, basta a concentração intracelular de glicose ser maior que a extracelular para que as forças de gradiente promovam um efluxo do substrato através da isoforma presente (FREITAS et al., 2014). No músculo esquelético e no tecido adiposo, a glicose é transportada para as células pelas moléculas GLUT1 e GLUT4 (DE KOSTER et al., 2013). Entretanto, os maiores consumidores de glicose são músculos esqueléticos, glândula mamária e útero gestante (DE KOSTER et al., 2013). O GLUT4 é responsável pela absorção de glicose estimulada por insulina, sendo localizado no músculo esquelético, coração e tecido adiposo (DUHLMEIER et al., 2005). Porém, com a diminuição da expressão de GLUT4, durante a lactação foi demonstrada a independência da glândula mamária para a absorção de glicose (Zhao e Keating, 2007). Enquanto, GLUT1, independente de insulina encontra-se na glândula mamária, tecidos fetais e no fígado. A expressão de todos os transportadores de glicose na glândula mamária, especialmente GLUT-1, aumenta entre 5 até 100 vezes no início da lactação (ZHAO e KEATING, 2007).

Assim, GLUT1 explica o suprimento de glicose basal, enquanto GLUT4 medeia a absorção de glicose estimulada por insulina, quando são armazenados intracelularmente, translocados e fundidos com a membrana plasmática (MACHADO, 1998). A absorção de glicose na placenta ovina é realizada por GLUT1 e GLUT3 (DE KOSTER et al., 2013). Nos hepatócitos, a gluconeogênese eleva a concentração intracelular de glicose, através de GLUT 2, e em células epiteliais intestinais e tubulares renais por GLUT 1 ou GLUT 2, onde a glicose é transportada acoplada ao Na^+ pelos SGLTs, elevando a concentração intracelular do substrato, para que desta forma ocorra efluxo a favor do gradiente na membrana celular (MACHADO, 1998).

Pesquisas tem sido realizadas para elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na resistência a insulina relacionados à obesidade. Fatores envolvidos, como o excesso de tecido adiposo e o consumo elevado de gorduras, são capazes de

sintetizar e ativar proteínas com ações inflamatórias (HOLLAND et al., 2011; FREITAS et al., 2014). A RI, considerada uma disfunção metabólica com alterações intracelulares que resulta em prejuízos na translocação de vesículas, que contém GLUT4, para a membrana (CASTRO et al., 2013; FREITAS et al., 2014), diminuindo a capacidade do músculo esquelético e outros tecidos de captar glicose para as células levando a um estado hiperglicêmico (CASTRO et al., 2013). Ou seja, o aumento de GLUT4 na membrana celular é responsável pela redução da glicose no sangue induzida por insulina. Para ovelhas, no terço final da gestação, quando há maior atividade metabólica, os requisitos de glicose uterina, fetal e placentária aumentam substancialmente, e há exigência de glicose, o que está associado ao aumento do número de GLUT3 (BELL et al., 1997), enquanto que em bovinos, a expressão placentária de GLUT1, GLUT3, GLUT4 e GLUT5 foi demonstrada (DE KOSTER et al., 2013).

Os mecanismos para o desenvolvimento da resistência à insulina relacionados à obesidade são caracterizados por alterações em etapas da sinalização da insulina, como redução na concentração e atividade quinase do receptor IR, da fosforilação de tirosina em IRS-1 e IRS-2 e redução da atividade de PI3q18. Entretanto, a fosforilação de IRS-1 pode ser em tirosina com subsequente fosforilação de PI3q como em resíduos de serina, onde algumas proteínas inflamatórias podem promover esta alteração e assim comprometer a atividade de PI3q e translocação do GLUT4 para a membrana plasmática (MAYER et al., 2010; FREITAS et al., 2014).

A insulina é o hormônio responsável por regular a absorção de glicose pelo tecido periférico, porém pode sofrer influências do ambiente fetal e neonatal, o que inclui a subnutrição materna ou o parto prematuro, assim a sensibilidade à insulina e a secreção de insulina na vida adulta são alteradas (HOFMAN et al., 2004; DEVASKAR E THAMOTHARAN 2007; GLUCKMAN et al., 2007; TODD et al., 2009; LONG et al., 2010; SHORTEN et al., 2016). A insulina é um hormônio anabólico secretado pelas células-beta do pâncreas, sua síntese é estimulada pelo aumento da glicose sanguínea após refeições e sua ação se dá em músculo esquelético, fígado e tecido adiposo. Dentre as funções metabólicas da insulina, a captação de glicose, aumento da síntese de proteínas, ácidos graxos e glicogênio, reduzem a produção hepática de glicose, lipólise e proteólise (LIN, et al., 2011).

A menor sensibilidade e secreção de insulina a longo prazo constituem problemas como obesidade e diabetes (KAHN et al., 2006; LORENZO et al., 2010;

SHORTEN et al., 2016), sendo que a obesidade, considerada uma epidemia mundial, está associada à inflamação sistêmica, doenças cardiovasculares e metabólicas, considerada o principal fator de risco para a resistência insulínica e diabetes tipo 2 em humanos (FREITAS et al., 2014).

A resistência à insulina (RI), é definida como um estado pelo qual uma concentração normal de insulina induz uma diminuição da resposta biológica nos tecidos sensíveis a ela (BERGMAN et al., 1979; KAHN, 1978; DE KOSTER et al., 2013). Importante distinguir a resistência à insulina (RI) e secreção de insulina. A RI é determinada pela resposta insuficiente dos tecidos sensíveis à insulina a uma concentração normal de insulina, ou como a falta de resposta apropriada à insulina endógena. A sensibilidade é determinada pela capacidade de secreção do pâncreas em resposta a um fator que estimule sua secreção (DE KOSTER et al., 2013). A exemplo, a diferença entre diabetes tipo 1 e diabetes tipo 2 na medicina humana, diabetes tipo 1 é causada por uma destruição das células β do pâncreas, resultando em uma deficiência absoluta de insulina, enquanto diabetes tipo 2 é causada por uma combinação de resistência à insulina e uma deficiência relativa de secreção de insulina, sendo esta a forma mais comum em humanos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2007; DE KOSTER et al., 2013). Assim, a RI possui duas características distintas: sensibilidade à insulina e capacidade de resposta da insulina (DE KOSTER et al., 2013).

Em função do aumento da resistência à insulina nos tecidos periféricos maternos e uma redução na produção de insulina, a glicose é "poupada" e com isso torna-se mais disponível o seu uso para atender a demanda fetal (REGNAULT et al., 2004). Cumpre ressaltar, que resistência à ação da insulina (RI), caracteriza-se pela diminuição da habilidade da insulina no estímulo da utilização de glicose pelo músculo e tecido adiposo, interferindo de forma prejudicial na mediação da supressão da lipólise (BODEN et al., 1997), que aumenta a produção hepática de glicose, e inicialmente essas concentrações são compensadas pelo aumento da secreção insulínica, que torna-se glicotóxica a medida que o processo persiste (GABBAY et al., 2003).

Além da utilização de glicose pelo organismo, há diminuição da resposta da insulina em relação à lipólise e mobilização de AGNE (ácidos graxos não esterificados) (PETTERSON et al., 1994; CAMPOS et al., 2007). A mobilização de gordura durante o final da gestação é facilitada em parte pela diminuição da

habilidade da insulina em promover a lipogênese e se opor a lipólise (BELL, 1995; CAMPOS et al., 2007). Para os ruminantes, um mecanismo exato da insulina sobre o metabolismo da glicose ainda é rudimentar, mas provavelmente o mecanismo de ação da insulina apresenta-se da mesma forma que em outras espécies (SASAKI, 2002). Assim como em ruminantes, observa-se estes eventos metabólicos em humanos durante o final da gestação (PATTERSON et al, 1993; PATTERSON et al. 1994; CAMPOS et al., 2007;).

Estudos foram realizados sobre resistência insulínica com ovelhas e vacas durante a gestação e lactação e mostraram, em ovelhas, diminuição da sensibilidade e da capacidade de resposta da absorção de glicose estimulada por insulina nos músculos esqueléticos de animais em lactação em relação a animais não lactantes e não prenhes (VERNON et al., 1990). Ovelhas em lactação apresentaram redução da capacidade de resposta e diminuição da sensibilidade da absorção de glicose estimulada pela insulina no tecido adiposo em lactação quando comparadas com ovelhas não lactantes e não gestantes (VERNON & TAYLOR, 1988; PETTERSON et al., 1993). Já em cabras, Debras et al. (1989), observaram redução da capacidade de resposta da absorção de glicose estimulada por insulina em cabras em lactação inicial. Vacas, no início da lactação comparadas com vacas secas mostraram sinalização de insulina reduzida (fosforilação de tirosina IRS-1) no tecido adiposo (JI et al., 2012). Ainda em vacas leiteiras de média produção, Kerestes et al. (2009) observaram a redução da glicose sanguínea estimulada por insulina.

O diabetes mellitus (DM) foi descrito em bovinos jovens e vacas leiteiras e o papel da RI no desenvolvimento da doença em bovinos ainda não foi elucidado (TANIYAMA et al., 1993; NAZIFI et al., 2004). Em contrapartida, a capacidade de secreção de insulina do pâncreas parece ser influenciada por AGNEs em vacas leiteiras (DE KOSTER et al., 2013). Ceriello (2000), defenderam a hipótese de que o estresse oxidativo possa estar envolvido na regulação da glicemia na diabetes. Tanto a hiperglicemia quanto a resistência à insulina são acompanhados por redução da ação da insulina. Porém, foi sugerido que as características de diabetes tipo 2, a hiperglicemia e a resistência à insulina, possam ser acompanhadas de estresse oxidativo, capaz de promover a diminuição da secreção e ação da insulina (CERIELLO, 2000).

Para avaliar a RI em humanos e animais existem diversos métodos, segundo Defronzo et al. (1979), o teste de hiperinsulinêmico (HEC), é considerado o

método padrão ouro para medir a resistência à insulina em humanos e animais. O teste que mensura a captação total de glicose em resposta a uma hiperinsulinemia fixa. A secreção endógena de insulina e a produção de glicose são suprimidas por uma infusão de insulina exógena contínua, enquanto a concentração de glicose é mantida dentro dos valores de referência, já que sua taxa de infusão é regulada (DEFRONZO, 1979). O HEC baseia-se no conceito de que, em condições constantes de glicemia e hiperinsulinemia, a quantidade de glicose consumida pelos tecidos seria igual à quantidade de glicose infundida durante um teste, pressupondo-se a completa supressão da produção hepática de glicose, que também pode ser quantificada independentemente pela infusão concomitante de glicose marcada radioativamente (GELONEZE et al., 2006). A limitação para aplicação do teste se dá pelo alto custo e elevado tempo para realização (RABASA-LHORET et al., 2003; GELONEZE e TAMBASCIA, 2006; DE KOSTER et al., 2013). Debras et al. (1989), utilizando clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico em cabras, observaram, durante o início da lactação, meio da lactação e período seco; redução da capacidade de resposta da absorção de glicose estimulada por insulina, apenas no início da lactação. A insulina foi infundida a 0,4, 0,7, 1,9, 4,4 e 10 pg / min. e a glicemia plasmática basal foi constante durante todos os períodos, porém apresentou-se maior durante a lactação em relação ao período seco e a insulina basal aumentou durante a fase intermediária. A infusão de insulina resultou em estimulação dose-dependente da utilização da glicose, e também resultou em diminuição da produção de glicose, contudo a capacidade da insulina para diminuir a produção de glicose foi significativamente melhorada durante a lactação inicial quando comparada com o período seco, o que pode fornecer um mecanismo para utilização de substratos gluconeogênicos durante a lactação inicial.

O teste de tolerância à insulina intravenosa (TTIIV), também pode ser realizado, consiste em uma injeção em bolus de insulina intravenosa com coletas de sangue seriadas para obtenção das concentrações de glicose, assim, calcula-se a área sob a curva (AUC) de glicose após a administração da insulina. Quanto maior a redução da glicemia estimulada pela insulina, maior a resposta à insulina do metabolismo da glicose dos tecidos periféricos (PIRES et al., 2007; BOSSAERT et al., 2009, DE KOSTER et al., 2013). O TTIIV tem como desvantagens maior possibilidade de efeitos colaterais devido a hipoglicemia provocada pelo teste, sendo que mecanismos contra-regulatórios poderão alterar a estimativa da sensibilidade à insulina (DE KOSTER et al., 2013).

O teste de tolerância à glicose intravenosa (TTGIV), este, de fácil realização, muito aplicado em medicina veterinária, consiste na administração de bolus intravenosos de glicose e realização de coletas de amostras sanguíneas seriadas, a partir dos quais obtém-se a curva de variação da glicemia ao longo do tempo (AIRES et al., 2008). No TTGIV, a resistência à insulina pode ser identificada quando a depuração da glicose é baixa, a área abaixo da curva para a glicose é alta e o tempo para atingir metade da concentração máxima de glicose e a concentração basal de glicose são altos. Sua interpretação consiste nas concentrações de secreção normal de insulina pelo pâncreas obtidas após a administração do bolus de glicose (PIRES et al., 2007; BOSSAERT et al., 2009; DE KOSTER et al., 2013).

Com o objetivo de prever a RI em tecidos periféricos, foram criados métodos baseados em modelos matemáticos (MUNIYAPPA et al., 2008). Foram propostos estes modelos que estimam o nível de resistência à insulina, inicialmente desenvolvidos em medicina humana e posteriormente aplicados em medicina veterinária, o índice HOMA e RQUICKI (KATZ et al., 2000; RABASA-LHORET et al., 2003; MUNIYAPPA et al., 2008; BALOGH et al., 2008; DE KOSTER et al., 2013).

HOMA, avaliação do modelo de homeostasia, é um modelo matemático que prevê a concentração de glicose e insulina em jejum de um indivíduo usando a melhor combinação possível de resistência à insulina e secreção de insulina. Pode ser simplificado para a fórmula de HOMA-IR, e quanto menor valor apresentar, menor a resistência à insulina de um indivíduo (MUNIYAPPA et al., 2008; DE KOSTER et al., 2013).

Os QUICKIs, índices quantitativos de verificação da sensibilidade à insulina, baseiam-se na transformação logarítmica das concentrações de glicose em jejum e insulina, e podem ser incluídos outros parâmetros sanguíneos (NEFA, BHB, glicerol). Valores baixos indicam maior resistência à insulina de um indivíduo (MUNIYAPPA et al., 2008; DE KOSTER et al., 2013).

Entretanto, teores de glicose, insulina, NEFA, BHB e glicerol de vacas leiteiras podem mudar enormemente no final da gestação e início da lactação, o que requer adequação desses índices nesses períodos. E estas mudanças são necessárias para garantir o suprimento suficiente de glicose para o útero gestante, feto e para a glândula mamária principalmente quando em lactação (BAUMAN e CURRIE, 1980). Para vacas leiteiras, o tecido adiposo desempenha um importante papel na determinação e modulação da sensibilidade à insulina e no metabolismo da

glicose (DE KOSTER, 2013), sendo que a diminuição da capacidade de resposta à insulina pode ser um ponto importante em relação ao acúmulo de lipídeos no fígado seguido da rápida perda de ECC (OIKAWA e OETZEL, 2006).

A absorção e utilização de glicose por tecidos muscular, adiposo, fígado, etc., são reduzidos para que mais glicose esteja disponível para a captação de glicose pela glândula mamária, que é independente de insulina, e produção de lactose, o fator osmótico mais importante para volume de leite produzido (BAUMAN, 2000; LUCY, 2008). Ruminantes evoluíram e a glicose é substituída por ácidos graxos voláteis e seus derivados como fontes de energia para respiração celular de muitos tecidos (BAUMAN e CURRIE, 1980), mas glicose e glicogênio continuam sendo fundamentais para funções de alguns sistemas, a exemplo, o sistema nervoso central e sistema imunológico (SANTOS et al., 2014).

O jejum e estresse durante a coleta, técnicas laboratoriais e espécie-especificidade de kits podem levar a mudanças importantes na glicose, NEFA e insulina, o e desta forma os resultados dos testes poderão ser afetados. Por exemplo, a insulina e humana possuem reatividade cruzada em 100%, o que não permite a comparação entre estudos (HOLTENIUS et al., 2007; BALOGH et al., 2008; Kerestes et al., 2009; Schoenberg et al., 2011; ABUELO et al., 2012). Alguns estudos relataram mudanças semelhantes de valor para QUICKI, RQUICKI, RQUICKIBHB e parâmetros de testes de tolerância à glicose (BALOGH et al., 2008; BOSSAERT et al., 2009; KUSENDA, 2010; HAARSTRICH, 2010; KOSTER et al., 2013), outros, no entanto, não concordam com essas observações (KERESTES et al., 2009). A aplicação prática dessas técnicas requer maior aprofundamento para validação em ruminantes.

Estudos realizados em modelos animais indicam que ratos com resistência à insulina apresentam sinais de aumento da peroxidação lipídica, a partir da avaliação de adipócitos cultivados *in vitro*, onde a insulina aumenta a produção de peróxido de hidrogênio (CERIELLO et al., 2000). Assim como observou-se que a hiperinsulemia, *in vivo*, diminui as concentrações de vitamina E, sugerindo que o aumento dos teores de insulina pode favorecer o estresse oxidativo. Assim, estes achados sustentam a hipótese de que a resistência à insulina está relacionada à presença de estresse oxidativo.

2.4 METABOLISMO OXIDATIVO

A intensificação dos sistemas de produção de ruminantes associado às adaptações metabólicas importantes aumenta o interesse científico em estudar o envolvimento de espécies reativas de oxigênio na patogenia destes processos (BERNABUCCI, 2002; AGARWAL, 2005; CELI, 2010). Merlo et al. (2008), relataram que animais mantidos em sistemas intensivos de produção necessitam mais de antioxidantes do que animais criados extensivamente, especialmente se os primeiros forem alimentados com silagem ou volumosos conservados conhecidos por seu baixo teor em substâncias antioxidantes (BALLETT et al., 2000).

Como já mencionado, a resistência insulínica tem sido estudada como fator envolvido em doenças metabólicas de fêmeas no periparto. A hiperglicemia é uma causa conhecida de concentrações aumentadas de radicais livres no plasma. Estudos publicados mostram que aumento agudo na concentração de glicose compromete a homeostase fisiológica em vários sistemas, assim antioxidantes podem se opor a esses efeitos. Esses resultados fornecem evidências indiretas de que a hiperglicemia induz o estresse oxidativo (CERIELLO et al., 2000).

Quando as espécies reativas de oxigênio (ERO) são geradas em grandes quantidades ou então nas situações de baixo status antioxidante ocorre, o então conhecido estresse oxidativo (MUTINATI et al., 2013). EROs são produzidas naturalmente, por meio de processos metabólicos oxidativos ou em disfunções biológicas, sendo a oxidação essencial na vida aeróbica e no metabolismo (VISIOLI; PIETTA, 2000; NASCIMENTO, 2012). No periparto, os corpos cetônicos aumentados em ovelhas acometidas pela TP ou até mesmo nos casos de balanço energético negativo, vacas com cetose ou mesmo em pessoas diabéticas, podem gerar radicais superóxido e hidroxila e causarem estresse oxidativo e disfunção celular (AL-QUDAH, 2011; MUTINATI et al., 2013).

Durante a gestação, o aumento da utilização de oxigênio pelas mitocôndrias da placenta, que conseqüentemente aumentam o estresse oxidativo

ajuda a explicar a maior exigência por energia na gestação (Pathan et al., 2010). Por esse motivo, a gestação e a lactação são considerados estados fisiológicos capazes de induzir estresse metabólico (DRACKLEY, 1999; PICCIONE et al., 2009), pois o metabolismo antioxidante demanda gasto energético e possui uma relação intrínseca com o sistema glicolítico, assim animais com deficiência de enzimas glicolíticas são mais propensos às lesões oxidativas (MACHADO et al., 2009).

Esse aumento da atividade metabólica, principalmente no fígado, úbere e ovários, favorece o estresse oxidativo intenso (MILLER et al., 1994; LEBLANC et al., 2004; BERNABUCCI et al., 2005; CELI et al., 2008; BOUWSTRA et al., 2009) sustentando a hipótese de que o aumento da taxa metabólica após o parto possa ser responsável pelo aumento da transferência de elétrons durante a respiração e produção de ROMS (*Reactive Oxygen Metabolites*). Ou ainda, há a hipótese de que a alteração do estado oxidativo no pós-parto possa estar relacionada com a redução da concentração de SH (tióis) plasmático nos eritrócitos (BERNABUCCI et al., 2005). Outros mecanismos, incluem exaustão do sistema de defesa antioxidante, acidose metabólica e processos inflamatórios agudos ou crônicos, também podem causar estresse oxidativo em animais (AL-QUDAH, 2011).

As ERO exercem efeito citotóxico induzindo lipoperoxidação de membranas celulares, com consequente formação e armazenamento dos subprodutos da oxidação, como as TBARS ("substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico") (AL-QUDAH, 2011; MUTINATI et al., 2013). Ovelhas afetadas por TP também têm aumento de TBARS plasmático (HALFEZ EL-FARE et al., 2010). A combinação de corpos cetônicos aumentados e baixos teores de cálcio no terço final da gestação (ARAÚJO, 2010), pode agravar a diminuição da produção endógena de glicose, desta forma intensificando o BEN (SCHLUMBOHM & HARMEYER, 2003).

Nos estudos humanos e animais, demonstrou-se a existência de indivíduos dentro de uma população com diferentes padrões de reação estresse (KOOLHAAS et al., 1999; KUNZ-EBRECHT et al., 2003). Caroprese et al. (2010), estudaram a relação entre as concentrações de cortisol, após um estresse agudo, atividades comportamentais, perfil imunológico e desempenho produtivo em ovinos utilizando 30 ovelhas Comisana individualmente sujeitas a um teste de isolamento em um ambiente específico para avaliação frente ao estresse, os animais foram distribuídos de acordo com as concentrações de cortisol, amostras de sangue foram coletadas antes e logo após o isolamento, também foram obtidas imagens do ambiente durante o teste.

Como resultado, as diferenças individuais na reatividade ao estresse podem desempenhar importante papel na capacidade do animal enfrentar situações adversas, bem como desafios imunológicos (CAROPRESE et al., 2010).

A resposta fisiológica ao estresse inclui a ativação do sistema nervoso central, do sistema endócrino e imunológico e pode afetar o desempenho da produção animal (CELI, 2010). Em pequenos ruminantes, o estresse oxidativo, apesar de associado à diversas condições, muito ainda precisa ser elucidado. Estudos mostraram que manejos estressantes comprometem o desempenho de ovinos (CAROPRESE et al., 2009). Portanto, maior compreensão da fisiopatologia do estresse oxidativo permitirá o estabelecimento de terapias antioxidantes específicas. E ainda, estudos que estabeleçam referências de biomarcadores que possam refletir de forma confiável o estado oxidativo do tecido no animal individual são necessários (CELI 2010).

O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre substâncias oxidantes e antioxidantes no organismo, e pode decorrer do aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) ou da diminuição de substâncias antioxidantes, danificando macromoléculas biológicas, induzindo distúrbios metabólicos e alterações fisiológicas (TREVISAN et al., 2001; BERNABUCCI et al., 2002; BOUWSTRA et al., 2008).

As metodologias numerosas utilizadas para avaliar o estresse oxidativo, possuem vantagens e desvantagens distintas, e estão disponíveis para pesquisadores e clínicos. Porém, comparações não podem ser realizadas em função de diferentes modelos experimentais e metodologias. O estresse oxidativo pode ser quantificado a partir de medidas diretas ou indiretas de oxidantes e antioxidantes. O requerimento de equipamentos especializados e uma experiência considerável se fazem necessários (MILLER et al., 1993; LYKKESFELDT & SVENDSEN, 2007; CELI, 2010;).

O monitoramento pode ser realizado por meio de biomarcadores antioxidantes e pró-oxidantes que podem ser avaliados no plasma e nos eritrócitos (PASSI et al., 2001). A capacidade antioxidante primária do soro é derivada de antioxidantes não enzimáticos, como glutathiona, α -tocoferol, β -caroteno e ácido úrico (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Pode-se mensurar a capacidade antioxidante através da reação ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que representa uma estimativa da quantidade final de produtos obtidos pela oxidação de gorduras, incluindo o

malondialdeído (MDA). O malondialdeído (MDA) é um dos vários produtos finais de baixo peso molecular formado durante a decomposição induzida por radical de ácido graxo poli-insaturado, reage com o ácido tiobarbitúrico produz um pigmento vermelho que pode ser facilmente medido por espectrofotometria na forma de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (CELI, 2010).

O TBARS pode ser considerado um bom indicador geral de estresse oxidativo quando mensurado no plasma (ARMSTRONG & BROWNE, 1994), quando aumentados indicam existência de estresse oxidativo celular importante (HALLIWELL & CHIRICO, 1993). Ainda que a determinação de MDA ou TBARS seja criticada em função de sua baixa especificidade e frequente formação de artefatos, o método é simples e comumente utilizados para mensurar dano oxidativo, principalmente. Tem se buscado minimizar os problemas com adaptação da técnica, ou mesmo determinando este metabólito por meio da utilização de cromatografia líquida de alta precisão (HPLC) ou por meio da utilização de kits comerciais, pois o MDA ainda é um dos melhores preditores do dano oxidativo (LYKKESFELDT & SVENDSEN, 2007; SUCUPIRA, 2015). Al –Qudah et al. (2011), em estudo com ovelhas gestantes, não gestantes e com TP, ao encontrar aumento da concentração plasmática de TBARS sugeriram que há aumento significativo na peroxidação lipídica em ovelhas com TP em comparação com animais saudáveis e não gestantes. O aumento da peroxidação lipídica pode ser causado pelo desequilíbrio redox, o que ficou demonstrado a partir da redução significativa nos teores e atividades, respectivamente, de antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos no grupo de ovelhas afetadas com maiores concentrações de corpos cetônicos no sangue (AL –QUDAH et al., 2011) e redução drástica de antioxidantes nas ovelhas afetadas pela TP (MUTINATI et al., 2013; HAFEZ EL-FAR et al., 2010). Ovelhas em gestação gemelar apresentaram valores maiores de TBARS do que ovelhas em gestação única (LOTFOLLAHZADEH et al., 2016).

A principal função do sistema de defesa antioxidante no organismo é inibir ou reduzir os danos causados às células pelas EROs. Os antioxidantes podem ser classificados como enzimáticos ou não-enzimáticos (SIES, 1993) e podem ser endógenos ou exógenos (MILLER et al., 1993). O sistema de defesa enzimático, inclui a SOD (superóxido dismutase), CAT (catalase) e a GSH-PX (glutathione-peroxidase). Atuam prevenindo, impedindo e controlando a formação de ERO, a partir de reação em cadeia, que propagam o processo em caso de dano oxidativo. A catalase e a

GSP-PX, atuam impedindo a formação de peróxido de hidrogênio, proveniente do radical OH^* da reação de Fenton e Haber-Weiss com a participação dos íons ferro e cobre. O radical OH^* é o principal indicador de peroxidação lipídica, extremamente instável e muito reativo, contra o qual não há sistema de defesa (BARBOSA et al., 2010). São conhecidos três sistemas enzimáticos antioxidantes (BERNABUCCI et al., 2005; CELI et al., 2010):

- 1) Catalisam a desmutação do radical ânion e peróxido de hidrogênio (BABIOR, 1984). A SOD, uma metaloenzima essencial para a sobrevivência dos eritrócitos (HATHERILL et al., 1991; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2001;), devido a remoção do O^- , durante a auto-oxidação da hemoglobina (THOMAS, 2000), considerada a principal pró-oxidante (HALLIWELL & CHIRICO, 1993), sendo que nos mamíferos existem três formas de SOD – ligada no citoplasma ao zinco e ao cobre (CuZnSOD); ligada na mitocôndria ao manganês (MnSOD), ou no meio extracelular (EC-SOD) contendo proteína. E a glutathione peroxidase (GSH-Px), detoxificador celular, que atua em teores baixos de peróxido, devido à maior afinidade desta pelo H_2O_2 . SOD e GSH-PX atuam em reações de redução celular protegendo a membrana e representa a principal forma de defesa antioxidante intracelular, que catalisam a redução de hidrogênio e peróxidos lipídicos (HALLIWELL & CHIRICO, 1993) sendo consideradas indicadoras de estresse oxidativo (TÜZÜN et al., 2002).
- 2) O segundo sistema antioxidante é mais simples, sendo formado pela enzima catalase, uma hemoproteína que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio a H_2O e O_2 . Sua atividade enzimática é dependente do ferro presente na porção heme de sua estrutura (HARVEY, 1997), atua na dismutação de concentrações elevadas de peróxido de hidrogênio em oxigênio e água (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007), diminui a degradação oxidativa em outros tecidos, devido a remoção do peróxido de hidrogênio difundido do meio extracelular para os eritrócitos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2001)
- 3) O terceiro sistema, representado pelos antioxidantes não-enzimáticos de baixo peso molecular, encontrados principalmente no plasma, atuam também em fluidos extracelulares e intracelulares, composto pela glutathione (GSH) e duas enzimas, a glutathione peroxidase (GPx ou GSH-Px) e a glutathione redutase (GR ou GSH-Rd), na presença de selênio (seleno-cisteína) catalisa a

dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. A glutathiona, hidrossolúvel, reconhecida como tiol não proteico mais importante nos sistemas vivos, atua entre as formas oxidada e reduzida (BARREIROS et al., 2006), como substrato ou co-substrato em reações enzimáticas e também reage diretamente com radicais livres e peróxidos lipídicos (BRIVIBA & SIES, 1994).

Devido à dificuldade em mensurar cada componente antioxidante separadamente e sua interação no plasma, vários métodos foram desenvolvidos para avaliar a capacidade antioxidante: capacidade total antioxidante (TAC) ou status antioxidante total (TAS), permite a mensuração do equilíbrio entre agentes pró-oxidantes e antioxidantes no plasma (GHISELLI et al., 2000; CASTILLO et al., 2006), assim como Trolox (um análogo solúvel em água de vitamina E), capacidade antioxidante equivalente (TEAC) (MILLER et al., 1993; NASCIMENTO, 2012), parâmetro antioxidante total radical-(TRAP) (GHISELLI et al., 1995), absorbância do radical oxigênio capacidade (ORAC) (CAO et al., 1993), ou a capacidade de redução do ferro plasmático (HRFP) (CELI, 2010; NASCIMENTO, 2012).

A capacidade antioxidante considerada ação cumulativa, foi estudada por Benzie e Strain (1996), que realizaram ensaio da capacidade antioxidantes, e demonstraram possível interação entre antioxidantes e plasma, a partir da habilidade de redução do ferro plasmático (HRFP), e seus resultados mostram reação cinética e relações dose-resposta com ácido ascórbico, ácido úrico, bilirrubina, Trolox, a-tocoferol, e albumina.

Como sua reação com a albumina é muito lenta e a variável possui papel antioxidante muito claro, pode atuar como marcador específico. Desta forma, deve-se considerar que alterações nas concentrações de proteínas podem indicar o efeito de outro antioxidante na amostra, e a determinação de HRFP pode oferecer índices dúbios de antioxidantes.

Em geral, há maior susceptibilidade ao estresse oxidativo e à redução do TAS ocorre na gestação e próximo ao parto (BERNABUCCI et al., 2005). Provavelmente, devido ao aumento da exigência de oxigênio e à resposta compensatória, e ao aumento da carga de peróxido lipídico, como em casos de TP. Em ovelhas gestantes ou não, o TBARS aumentado significativo e o TAS diminuído foram observados (LOTFOLLAHZADEH et al., 2016), assim como em estudos anteriores em ovinos (BERNABUCCI et al., 2005; ZAKIAN et al., 2015).

Ao avaliar a atividade antioxidante enzimática de ovelhas Chios gestantes no final da gestação e não gestantes submetidas à dieta de baixa energia, a atividade de GSH-PX e CAT foram maiores em ovelhas gestantes, e concluiu-se seu papel de proteção ao feto em relação aos efeitos deletérios do peróxido de hidrogênio (ÖZTABAK et al., 2005).

Tanto para vacas leiteiras como para ovelhas, o pasto pode oferecer benefícios para a saúde, por conter vitaminas como A e E, e selênio, que são antioxidantes com importantes papéis na saúde e produção animal (CELI, 2010). Se os animais não receberem suplementação adequada destes nutrientes há maior risco de estresse oxidativo, que dependendo da intensidade pode comprometer a adequada homeorrese e então interferir no funcionamento normal do organismo, podendo contribuir inclusive na ocorrência de enfermidades metabólicas (CELI, 2010). Neste sentido, alguns autores sugerem a suplementação com antioxidantes durante a gestação para prevenir e/ou até mesmo para auxiliar no tratamento da TP, promover desenvolvimento e função da placenta adequados, reduzir mortalidade embrionária, aumentar nascimentos e a vitalidade dos neonatos (AL-QUDAH, 2011; MUTINATI, et al., 2013).

O sistema antioxidante não enzimático inclui especialmente compostos provenientes da dieta, em destaque as vitaminas, minerais e compostos fenólicos (BARBOSA et al., 2010). Dentre as possibilidades de vitaminas antioxidantes, as vitaminas D (WISEMAN, 1993) e a já consagrada E (HIDIROGLOU et al., 1987) são exemplos de compostos exógenos que podem ser utilizados com esta finalidade. Sua ação in vivo, depende da absorção, biodisponibilidade em condições fisiológicas, concentração plasmática ideal para sua atividade antioxidante, radicais livres gerados e tecido de atuação (BARBOSA et al., 2010).

As EROs têm importância fisiológica diretamente relacionada à proteção antimicrobiana intermediada pelos leucócitos polimorfonucleares (PMNs) (Mehrzaad et al., 2004; 2005), estes normalmente encontrados no sangue, circulam em estado inativo, desta forma podem cercar e até fagocitar bactérias, mas são incapazes de lesá-las (WINTERBOURN; ASSMAN, 1990; LIMA, 2013). Os neutrófilos PMN constituem a primeira linha de defesa celular contra patógenos invasores (PAAPE et al., 2002). Tem importante papel resposta imune inata, através do reconhecimento, fagocitose e destruição de patógenos. As ERO interferem na função de neutrófilos, respostas de anticorpos e produção de citocinas por células imunes (SPEARS &

WEISS, 2008). As células imunológicas são particularmente sensíveis ao estresse oxidativo porque suas membranas contêm altas concentrações de ácidos graxos poliinsaturados que são muito suscetíveis à peroxidação e produzem grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio quando estimuladas (SPEARS & WEISS, 2008).

Os neutrófilos e monócitos polimorfonucleares são responsáveis pela secreção de citocinas, ampliando assim a resposta inflamatória (BAUMANN & GAULDIE, 1994). Durante a resposta de fase aguda, os neutrófilos são atraídos para a área lesada libertando enzimas lisossomais e as EROs (FERREIRA, 2007). A destruição de microrganismos pelos neutrófilos ocorre por meio de explosão respiratória e liberação de enzimas líticas e de peptídeos antimicrobianos presentes nos grânulos intracelulares (TIZARD, 2002).

2.5 IMUNIDADE

O sistema imunológico é constituído por uma complexa rede de órgãos, células e moléculas e tem por finalidade manter a homeostase combatendo agressões (CRUVINEL, et al., 2010). A imunidade refere-se a reações corpóreas de um animal a substâncias estranhas ao organismo, independentemente do resultado fisiológico ou patológico da reação (ABBAS et al., 1991). A resposta imune pode ser dividida em imunidade inata e adaptativa. Em resposta à invasão de agentes patogênicos, o sistema imunológico primeiro atua inato e, em seguida, adquire sistemas de defesa (PAUL and DEY, 2015). A imunidade inata está presente no nascimento e fornece a primeira barreira contra "invasores" (MAGGINI et al., 2007), representa uma resposta rápida à um grande número de estímulos, porém limitada (CRUVINEL et al., 2010). Em contraposição à resposta inata, a resposta imune adaptativa depende da ativação de células especializadas, os linfócitos, e das moléculas solúveis por eles produzidas (CRUVINEL et al., 2010).

Os linfócitos constituem uma mistura de diversas populações celulares, cada qual com propriedades e funções características. Sua identificação se dá a partir de suas proteínas de superfície celular, e através da análise de expressão e função

dessas proteínas, pode-se mostrar diferenças entre populações, onde elas se desenvolvem e qual seu papel na resposta imune (TIZARD, 2014). Atualmente, essas proteínas são identificadas com “CD”, que apesar de nomenclaturas arbitrárias, estão associadas às suas funções (TIZARD, 2014). Uma superfamília de proteínas que exerce um importante papel no sistema imune é a das imunoglobulinas, fazem parte desta família CD4 e CD8 (TIZARD, 2014).

Em ruminantes, as imunoglobulinas não atravessam a placenta, portanto os cordeiros dependem da transferência passiva de imunoglobulinas, predominantemente imunoglobulina-G (IgG), do colostro para fornecer-lhes imunidade passiva e, portanto, proteção contra doenças no início da vida (GOKCE et al., 2014; STERNDAL et al., 2017). As alterações nas respostas imune celular e humoral são mediadas pela conexão do sistema nervoso central e imunológico através da ativação do sistema nervoso autônomo e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) pela secreção de numerosas moléculas, como neuropeptídeos e neurohormônios, (BORGHETTI et al., 2009).

Das situações imunes complexas de grande relevância encontram-se a gestação e o parto, que envolvem numerosos processos, a imunidade materna é reduzida, neutrófilos e monócitos tem sua função e reatividade diminuídas em relação à não gestantes, como observado em humanos (BARDOU et al., 2014). Esta diminuição da resposta imune materna é necessária para evitar que o feto seja rejeitado e para permitir seu estabelecimento na placenta (BARDOU et al., 2014). Em bovinos leiteiros, a gestação e lactação estão associadas ao comprometimento da PMN e da função linfocitária (KEHRLI et al., 1989a, b; SAAD et al., 1989). A função PMN periparturiente é afetada de acordo com o número de crias em vacas (GILBERT et al., 1993; MEHRZAD et al., 2002; LIMA, 2013). O papel dos monócitos endometriais, macrófagos e células dendríticas tem sido recentemente sugerido como crucial para que a gestação de bovinos seja bem-sucedida (WINGER et al., 2011) no controle da resposta imune inicial em infecções bacterianas (POMEROY et al., 2017).

A inflamação pós-parto, associada ao aumento do metabolismo celular, aumentam ainda mais os requisitos de energia (DRACKLEY, 1999; PUIGSERVER et al., 2001; INGVARSEN, 2006; ESPOSITO et al., 2014;). Assim, a inflamação pós-parto exacerba o estado energético negativo (TREVISI et al., 2010), enquanto a insuficiência de carboidratos aumenta a produção de AGNE e corpos de cetônicos no fígado (DUFFIELD et al., 2000; HERDT, 2000A; DRACKLEY et al., 2001; ESPOSITO

et al., 2014). Os distúrbios metabólicos ligados ao balanço energético negativo, como ocorre no periparto, devido à mobilização de gordura e deposição de triglicerídeos em células hepáticas, que causam dano e disfunção hepática (TURK et al., 2004; ESPOSITO et al., 2014), redução no colesterol total e lipoproteínas de alta densidade (HDL) (TURK et al., 2005; ESPOSITO et al., 2014) e em função da intensificação do manejo, são geralmente associados à imunossupressão (VAN KAMPEN & MALLARD, 1997; WENSING et al., 1997; MALLARD et al., 1998; BOBE et al., 2004; HAMMON et al. 2006; LIMA, 2013) e ao estresse, comum em vacas leiteiras (GOFF, et al., 1997; INGVARTSEN et al., 2003) e ovelhas.

A disfunção da resposta imunológica que caracteriza a imunossupressão, é primariamente causada pelo aumento na produção e secreção fetal de corticosteróides durante o último mês de gestação (KNICKERBOCKER et al., 1986; GRIFFIN, 1989). A diminuição da resposta celular e humoral, reflexos da diminuição da capacidade de fagocitose e de destruição de antígenos pela queima oxidativa (“oxidative burst”) dos leucócitos polimorfonucleares, diminuição da proliferação (mitogênese) de linfócitos circulantes e diminuição da resposta de anticorpos frente a imunizações são sinais de imunossupressão (MALLARD et al., 1998; LIMA, 2013). A atividade fagocítica e de explosão respiratória pode fornecer informações valiosas sobre a atividade funcional dessas células imunes (MENGE et al., 1998; KAMPEN et al., 2004; LIMA, 2013). A competência do sistema imune é deprimida durante o período periparto (KEHRLI et al., 1989a). As causas para a redução da função imune não são bem conhecidas. Pode haver envolvimento do balanço energético negativo e ou balanço proteico (KREMER et al., 1993; GOFF, 2013). No período periparto, todas as ovelhas estão expostas a demonstrarem redução da resposta imune e maior susceptibilidade à doença no periparto (FTHENAKIS et al., 2012; ANUGU et al. 2013;), essa susceptibilidade é aumentada em gestação gemelar (CAROPRESE et al., 2006; LIU, et al., 2016).

A imunocompetência pode sofrer influência pelas variações no número e porcentagem de linfócitos e subconjuntos de linfócitos T. As células T-helper (CD4 +) podem ativar a imunidade humoral e mediada por células (DAY, 2000), enquanto as células T-citotóxicas (CD8 +) estão envolvidas na vigilância imune de tecidos periféricos e na eliminação de patógenos (Park et al., 1992; Mehrzad et al., 2008; CAROPRESE et al., 2010). Deslocamentos nos subconjuntos de células T podem afetar a atividade de outras células imunes e suas secreções, afetando assim a

susceptibilidade a doenças clínicas ou inaparentes (MEHRZAD et al., 2008). Consequentemente, a resposta de um animal ao estresse, em termos de secreção de citocinas e distribuição de linfócitos, pode afetar sua predisposição a doenças ou a doenças relacionadas ao estresse (CAROPRESE et al., 2010).

Estudos evidenciaram a heterogeneidade de monócitos no sangue periférico humano, e que subconjuntos de monócitos podem ser discriminados pela sua expressão diferencial de CD14 e CD16 (AUFRAY et al., 2009; ZIEGLER-HEITBROCK et al., 2010). Os monócitos bovinos são subdivididos em monócitos clássicos (CD14 + / CD16-), intermediários (CD14 + / CD16 +) e não clássicos (CD14- / CD16 +) com diferenças fenotípicas e funcionais distintas (POLMEROY et al., 2018), assim como em humanos (MANDL et al., 2014). Embora a proporção de cada subconjunto de monócitos pareça ser escassa, na gestação ela pode variar devido a ocorrência de eventos inflamatórios (MELGERT et al., 2012). Entretanto, ainda há controvérsias sobre o papel preciso de cada um desses subconjuntos em condições inflamatórias (GEISSMANN et al., 2003; ZIEGLER-HEITBROCK et al., 2007; MANDL et al., 2014; CORRIPIO-MIYAR et al., 2015).

Para estudar aspectos do sistema imunológico, a imunofenotipagem por citometria de fluxo é uma ferramenta indispensável para o diagnóstico, classificação, monitoria celular (CRAIG et al., 2008). A imunofenotipagem é um método preciso para a avaliação quantitativa e qualitativa de células hematopoiéticas (LEE et al., 2000). Muitos anticorpos e fluorocromos melhoraram a capacidade de identificar diferentes populações de células normais e reconhecer suas propriedades fenotípicas, mesmo quando presentes em pequena proporção das células analisadas (CRAIG et al., 2008).

A citometria de fluxo também tem sido utilizada para mensurar a resistência ao oxidativo nos vários tipos de células. Nesse método, avalia-se a intensidade de fluorescência sendo um teste celular preciso e rápido. Vários compostos podem ser utilizados para mensurar a geração de EROs pela fluorescência de seus derivados oxidados (AMER et al., 2003). Tanto a imunofenotipagem por citometria de fluxo como a mensuração da geração de EROs são importantes análises neste contexto, pois o sistema imunológico materno durante a gestação e lactação está sob estresse fisiológico aumentado (ANUGU et al., 2013), e os animais são mais suscetíveis à doenças (MALLARD et al., 1998), pois o aumento de demanda resulta no aumento de EROs reduz a função de neutrófilos, as respostas de anticorpos e produção de

citocinas por células imunes (SPEARS & WEISS, 2008), e há falha de transferência materna de imunoglobulinas no colostro (ANUGU et al., 2013). Diante disso, os esforços para melhorar a imunidade e minimizar os efeitos de EROs não cessam.

2.6 VITAMINAS D e E

Animais alimentados com forragem conservada e criados em instalações sem acesso ao sol, podem apresentar teores baixos destas vitaminas (Weiss, 1998). Pesquisadores têm apontado para ação das vitaminas D e E, em melhorar a sensibilidade à insulina em humanos (CERIELLO, 2000; BORISSOVA et al., 2003; MANNING et al., 2004; EVANS et al., 2005; TAI et al., 2008; ALVAREZ & ASHRAF, 2010; BELENCHIA et al., 2013; LEY et al., 2013; TALAEI et al., 2013; YAP et al., 2014) ou até mesmo em ratos (CADE & NORMAN, 1986; FAURE et al., 1997), mas não há estudos considerando animais de produção, especificamente ruminantes ou ainda ovelhas.

A vitamina E é constituída por duas classes de compostos: tocoferóis e tocotrienóis. O óleo de palma enriquecido com tocotrienol tem demonstrado ajudar na redução das concentrações de glicose no sangue em pacientes e em estudos pré-clínicos com animais. No entanto, a base mecanicista para a ação do tocotrienol não está bem estabelecida. Os receptores ativados por proliferadores de peroxissomas alfa, gama e delta (PPARalpha, PPARgama e PPARdelta) que são fatores de transcrição, desempenham papéis essenciais no metabolismo energético e são utilizados no tratamento de diabetes e hiperlipidemia em humanos (FANG et al., 2010).

Outra atuação importante da vitamina E relaciona-se com o sistema imunológico, pois deficiência na vitamina E e selênio podem comprometer as respostas imunes (MEYDANI e BEHARKA, 1998; ROOKE et al., 2004) e a função imunológica prejudicada pode aumentar o risco de infecções e morte no recém-nascido (STERNDAL, et al., 2017). Além disso, o acúmulo excessivo de EROs afeta o desenvolvimento da placenta no início da gestação quanto o parto (KASIMANICKAM et al., 2010).

A vitamina E e selênio agem sinergicamente para prevenir o dano oxidativo das células (HOEKSTRA, 1975). Segundo Weiss (1998), as concentrações

plasmáticas de vitamina E diminuem gradualmente no pré-parto, período em que normalmente ocorrem infecções intramamárias (WALLER, 2000; CHAUHAN et al., 2016). A suplementação de vitamina E pode prevenir o declínio de suas concentrações próximo ao parto. Foi sugerido em 1996 requisitos de vitamina E para ovelhas entre 15 a 40 mg/kg e que megadoses possam melhorar o desempenho e a qualidade de carcaça (MCDOWELL et al., 1996; CHAUHAN et al., 2016). Segundo Liu et al., (1995), concentrações mais elevadas de vitamina E são necessárias para prevenir a peroxidação lipídica e a estabilidade oxidativo de ferro heme na mioglobina.

Durante o outono, na Austrália Ocidental, estudos mostraram que ovelhas estão sujeitas à deficiência de vitamina E e selênio devido ao aumento dos requisitos desses nutrientes durante a gestação e suas baixas concentrações em pastagens secas e suplementos de grãos (KUMAGAI & WHITE, 1995; WHITE & REWELL, 2007). Desta forma, cordeiros nascidos no outono, na Austrália, podem estar em risco de deficiências de vitamina E e selênio. Entretanto, a suplementação demonstrou melhorar a sobrevivência do cordeiro em um número limitado de estudos. No entanto, os mecanismos pelos quais isto é conseguido não foram determinados (KOTT et al., 1983; THOMAS et al., 1995). As deficiências de vitamina E foram associadas a respostas imunes inadequadas em animais e, em alguns casos, a suplementação acima do requerimento melhorou a resposta imune em seres humanos (FINCH E TURNER, 1996; MEYDANI; BEHARKA, 1998; ANUGU et al., 2013; STERNDAL et al., 2017).

A vitamina E é um poderoso antioxidante, e também mostrou eficiência na melhora da imunidade periparturiente. Uma vez que a proporção sérica de - tocoferol para o colesterol pode refletir mais precisamente o estado da vitamina E do que o tocoferol (WEISS et al., 1992; HERDT & SMITH, 1996; DØNNEM et al., 2015). As concentrações de α -tocoferol e selênio diminuíram entre 40% e 50% nas ovelhas durante o final da gravidez quando não foram fornecidos suplementos de vitamina E e selênio (HATFIELD et al., 2000; ROCK et al., 2001; HALL et al., 2013). A suplementação oral de ovelhas com vitamina E (4g/animal) e selênio (1mg/kg/pv) durante o final da gestação, aumentou cerca de 70% suas concentrações no parto em comparação com ovelhas não suplementadas. No entanto, 9% das ovelhas suplementadas ainda se apresentaram deficientes em vitamina E e 18% ainda marginais quanto as concentrações de selênio no parto (STERNDAL et al., 2017).

A ingestão total de vitamina E recomendada para uma ovelha de 90 kg no final da gestação é de 504 UI / dia, independentemente do número de fetos. Dønnem et al. (2015) estudaram ovelhas na Noruega, onde a maioria das ovelhas são alimentadas em ambientes fechados, com dieta baseada em silagem de capim, feno e concentrados, durante 5-8 meses de inverno. O teor de vitamina E é alto em forragens frescas, mas diminui com armazenamento e conservação de acordo com as espécies de forragem e colheita (MCDOWELL et al., 1996). Assim, foi testada a hipótese de que a suplementação de vitamina E em ovelhas no final da gestação, altamente produtivas, e suplementadas de acordo com o teor dietético total recomendado pelo NRC (2007), reduziria a taxa de cordeiros mortos. E ainda, foram incluídos no estudo 5 regiões diferentes porque as grandes variações climáticas entre as regiões podem influenciar a qualidade da forragem, bem como as concentrações de alfa-tocoferol. Os resultados deste estudo indicam que a suplementação diária de vitamina E durante as últimas 6-7 semanas antes do parto diminui a taxa de morte de ovelhas com ≥ 3 cordeiros.

Alguns trabalhos foram realizados com associações vitamínicas, como as vitaminas ADE (SCHELLING et al., 1995; WEIGEL et al., 2013; LIMA, 2013). Porém, nas últimas décadas, dentre elas, a vitamina D teve sua importância reconhecida devido seu papel na homeostase sistêmica, o que pode ser observado diante do expressivo número de estudos sobre aspectos morfológicos e sobre a fisiologia da vitamina D, bem como seu impacto sobre sistema hormonal e a saúde dos indivíduos (CASTRO, 2011).

O status de vitamina D pode melhorar aspectos reprodutivos para mulheres, como mostra o trabalho realizado por Handel et al. (2016), que sugerem a que o status dessa vitamina pode atuar em aspectos da fecundidade e no pós-parto. Os efeitos da suplementação com vitamina D sobre o metabolismo da glicose, concentrações de lipídios, inflamação e estresse oxidativo foram estudados em mulheres com diabetes mellitus gestacional (DMG) e foram observados efeitos benéficos sobre as concentrações de glicose, diminuição da insulina e com a redução das concentrações totais de LDL e colesterol, mas não foram identificados efeitos sobre a inflamação e o estresse oxidativo (ASEMI et al., 2013).

A vitamina D, ou colecalciferol, é um hormônio esteroide, em razão de sua síntese pela pele dispensar necessidade dietética e a presença de receptores nucleares específicos de alta afinidade para seu metabólito ativo nas células alvo.

Tem como principal função a regulação da homeostase do cálcio, formação e reabsorção óssea, através da sua interação com as paratireóides, os rins e os intestinos (ARNSON et al., 2007). A utilização de vitamina D foi proposta por seus vários efeitos imunomoduladores e a possibilidade do uso de seus análogos com pouco efeito hipercalcêmico poderão tornar esse hormônio um possível candidato a agir sinergicamente com outros imunossupressores ou até como droga única em doenças autoimunes, transplantes e neoplasias (BERTOLINI et al., 2000).

A forma comum em humanos e animais é o colecalciferol, assemelha-se ao colesterol estruturalmente, através de uma cadeia lateral idêntica. A vitamina D2 (ergocalciferol) é derivada do esteroide vegetal e provém da dieta, enquanto a vitamina D3 (colecalciferol) é produzida a partir de 7-desidrocolesterol (7-DHC), precursor do colesterol. D2 e D3 são denominados calciferóis (CURI et al., 2009), sua principal fonte da vitamina D é a partir da formação endógena nos tecidos cutâneos após a exposição à radiação ultravioleta B (BRINGHURST et al., 2008).

Independentemente de ser sintetizada ou administrada de forma endógena, através de dieta ou suplementos, a vitamina D na circulação é ligada à proteína de ligação (DBP), que a transporta para o fígado, onde é convertida pela vitamina 25-hidroxilase em 25-hidroxivitamina D [25OHD]. Esta forma, biologicamente inativa é convertida nos rins, pela 25-hidroxivitamina D-1alfa-hidroxilase, na forma biologicamente ativa, 1,25-dihidroxivitamina D [1,25 (OH) 2D]. A presença de 1-alfa-hidroxilase em tecidos extra-renais sugere que a vitamina D pode ter um papel importante para além do sistema músculo-esquelético (CURI et al., 2009), no metabolismo do cálcio e dos ossos. A vitamina D em especial, o seu metabolito biologicamente ativo, atuam como poderosos imunoreguladores (MAGGINI et al., 2007). Quantidades significativas de vitamina D em receptores de monócitos, macrófagos e timo sugerem um papel específico da vitamina D e seus metabolitos no sistema imunológico. A forma 25 (OH) 2D3 atua como um modulador do sistema imunológico, evitando a expressão excessiva de citocinas inflamatórias e aumentando o potencial de "explosão oxidativa" dos macrófagos (MAGGINI et al., 2007). E ainda, estimula a expressão de péptidos anti-microbianos, presentes em neutrófilos, monócitos, células NK e em células epiteliais que revestem o trato respiratório, por exemplo. A maioria das células do sistema imunológico, exceto as células B, expressam receptores de vitamina (MAGGINI et al., 2007).

A dosagem da 25(OH)D representa um desafio técnico a ser superado, uma vez que a molécula 25(OH)D, é hidrofóbica, deve estar ligada à sua proteína transportadora (DBP) (CASTRO, 2011). Estudos mostraram maior acurácia na cromatografia líquida associada à espectrofotometria de massa (LC-MS/MS, *liquid chromatography-tandem mass spectrophotometry*), a qual permite mensurar separadamente 25(OH)D2 e 25(OH)D3, porém seu custo elevado e tempo de análise, apesar de ser um método altamente específico para determinação também para determinação de α - tocoferol (vitamina E) (MIDTTUN et al., 2011), fez da cromatografia líquida de alta pressão (HPLC, *high-pressure liquid chromatography*) um teste substituto.

No presente estudo, foi utilizado método bioanalítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS/MS) para quantificação de 25- hidroxivitamina-D3 e α -tocoferol (Vitamina E) em plasma de ovelhas, método considerado mais eficiente. Técnicas cromatográficas estão entre as principais técnicas de separação, principalmente na análise de matrizes complexas, devido sua eficiência e poder de resolução de colunas modernas. A cromatografia líquida foi definida na primeira década do século passado, pelos trabalhos do botânico russo, Mikhail S. Tswett. Seus estudos eram direcionados na separação de pigmentos extraídos de plantas com o uso de solventes em uma coluna envolvida com partículas (LANÇAS, 2009).

De acordo com o Prof. J. B. Fenn, ganhador do Premio Nobel em Química em 2002 pelo pioneirismo: “a Espectrometria de Massas é a arte de medir átomos e moléculas para determinar suas massas moleculares. Tal informação sobre a massa ou peso é muitas vezes suficiente, frequentemente necessária, e sempre útil na determinação da identidade de uma espécie. Para praticar esta arte, colocamos carga nas moléculas de interesse, isto é, os analitos, e então medimos como as trajetórias dos íons resultantes respondem, sob vácuo, a várias combinações de campos elétricos e magnéticos. Claramente, a condição “sine qua non” deste método é a conversão de moléculas neutras de um analito em íons” (LANÇAS, 2009).

O acoplamento da Cromatografia Líquida (LC) – Espectrometria de massas (MS) aumentou de forma significativa a capacidade analítica dos laboratórios, em função do desenvolvimento de fontes de ionização e da pressão atmosférica. Assim, permite maior número de amostras analisadas em curto período de tempo (CHIARADIA et al., 2008). Uma vez desenvolvido o método de LC-MSMS, o desafio

consiste na avaliação do Efeito de Matriz (ME), o que aumenta o tempo de preparo de amostras, desenvolvimento de método e geração dos resultados. A MS vem sendo utilizada na análise de lipídeos em sistemas biológicos e apresenta-se uma ferramenta importante para aprofundamento dos estudos de sua função nos sistemas de interesse (IVANOVA et al., 2009).

Para ruminantes as duas formas disponíveis de vitamina D são as plantas e a exposição solar (HIDIROGLOU et al., 1984). Há uma grande taxa de degradação ruminal quando administrada oral, cerca de 50% dos teores ingeridos não são absorvidos, o que inviabiliza esta via para a espécie (SOMMERFELDT et al., 1980). Hidiroglou et al., (1984) realizaram estudo com ovinos suplementados com vitamina D3, notando teores circulantes elevados de 24h a 20 dias após a administração. Já para bovinos, os teores se elevam sete dias após a administração parenteral de vitamina D3. Entretanto, em ruminantes, a administração parenteral se mostra mais eficiente (HIDIROGLOU et al., 1986).

A proposta de estudar a vitamina D como antioxidante partiu de que sua base estrutural, comparada em termos moleculares com o colesterol e ergosterol e sua capacidade antioxidante tem sido discutida, comparada às drogas anticancerígenas como tamoxifeno e seu metabólito 4-hidroxi. A vitamina D é um antioxidante de membrana, seu metabólito ativo 1,25-di-hidroxicolecalciferol, a vitamina D2 e 7-desidrocolesterol (pró-vitamina D3), todos dependentes de ferro, inibiram a peroxidação lipídica e lipossomas (WISEMAN, 1993).

Seu papel como antioxidante vem ganhando espaço na comunidade científica, como mostrado por Ke et al. (2016), em estudo com praticantes de exercícios físicos, a vitamina D diminuiu o dano celular e a deficiência de cálcio mediante importante desafio oxidativo. Estudos com idosos e diabéticos apresentaram efeito inversamente proporcional à marcadores oxidativos (GRADINARU et al., 2012). Pacientes que realizam hemodiálise e receberam vitamina D, tiveram melhora das defesas antioxidantes (TANAKA et al., 2011; FARIA, 2017). Zhang et al. (2015), ao realizar pesquisa com mulheres com diabetes mellitus gestacional, que receberam altas doses de vitamina D (50.000UI por 2 semanas) tiveram melhora do quadro de resistência insulínica e a capacidade antioxidante total aumentada. Paulson et al., 1990, ao estudar ovelhas gestantes e não gestantes, observaram de forma diferente de outras espécies, incluindo humanos, que as concentrações de 1,25(OH)₂D durante a gestação não se mostraram elevadas.

Portanto, a maior demanda por substâncias antioxidantes no período periparto (MUTINATI et al., 2013), de intensa mobilização de reservas energéticas, está associada ao estresse oxidativo (HAFEZ EL- FAR et al., 2010), à resistência insulínica (EVANS et al., 2005; DUEHLMEIER et al., 2013), assim a suplementação com as vitaminas D, por sua ação antioxidante (WISEMAN, 1993; EVANS et al, 2005; MUKHOPADHYAY et al., 2000; SUNG et al., 2012) e E, e sua possível capacidade de aumentar a sensibilidade à insulina, possam ser utilizadas. Assim, a preconização de substâncias antioxidantes e que melhorem a sensibilidade insulínica podem ser uma prática de manejo para minimizar o estresse metabólico nessa importante fase da vida produtiva da ovelha.

Considerando que animais mantidos em sistemas intensivos de produção apresentam maior demanda por agentes antioxidantes, espera-se que a administração das vitaminas D e E, traga benefícios produtivos e de bem-estar aos animais, minimizando o estresse oxidativo e consequentemente melhorando a sensibilidade à insulina.

3. OBJETIVOS

Avaliar a eficiência do uso parenteral das vitaminas D e E na sensibilidade à insulina, no metabolismo oxidativo, perfil metabólico e na imunidade de ovelhas no período periparto.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS E INSTALAÇÕES

Foram utilizadas 36 ovelhas mestiças (Santa Inês X Dorper), adultas, híginas, com escore de condição corporal (ECC) médio de 3,5, em uma escala de 0 a 5 segundo Russel (1984), provenientes do rebanho da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ). As ovelhas permaneceram estabuladas nas dependências do Centro de Pesquisas em Doenças Nutricionais e Metabólicas (CPDNM) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP).

Inicialmente, além do exame físico, foram realizados hemograma e contagem de ovos por grama de fezes (OPG), para confirmação da higidez destas ovelhas. As ovelhas receberam água *ad libitum* (proveniente de estação de tratamento/SABESP). A quantidade de alimento oferecida foi calculada em 3% do peso vivo em matéria seca, na proporção 70:30 na proporção de volumoso (feno de capim *coast cross*, com média de 88% de matéria seca (MS) e 13% de proteína bruta (PB)) e concentrado comercial (Socil Qualicort 18 da marca Socil®). O suplemento mineral (Ovfos) foi disponibilizado para consumo 10g por animal por dia. Os animais foram acompanhados diariamente e o padrão nutricional foi mantido durante todo o período experimental.

Após a chegada e passado período de adaptação de 60 dias, as ovelhas foram submetidas a protocolo de sincronização de estro e de ovulação por meio da colocação de esponja intravaginal com progesterona (dia 0); e após duas semanas procedeu-se a retirada da esponja e foram aplicados 300 UI de eCG, pela via IM (dia 14); de 48 a 50 hs após a retirada da esponja foi realizada a monta natural assistida (dia 16). Para conseguirmos 30 ovelhas prenhes, utilizou-se inicialmente um lote de 36 ovelhas pluríparas de mesma idade e um grupo de 6 carneiros, formando lotes de seis ovelhas para cada carneiro. O diagnóstico de gestação e a detecção do número de fetos foram realizados após 60 dias da cobertura por meio de exame ultrassonográfico. As 30 ovelhas gestantes foram então distribuídas em blocos de acordo com número fetos e escore de condição corporal e foram sorteadas para um dos três grupos experimentais. Cada grupo experimental continha 10 (dez) ovelhas.

4.2 PROCEDIMENTOS

Embora ainda não haja consenso na literatura quanto a dose, neste projeto nos baseamos na dose de vitamina D trabalhada por Hidiroglou et al., (1984) e Quarterman et al. (1964), que conseguiram manter concentrações adequadas de vitamina D em ovelhas vazias e híidas, durante quatro semanas após única aplicação. Para a vitamina E, a dose estipulada foi baseada nos estudos de Hidiroglou e Karpinski (1991) e de ANUGU et al. (2013). No trabalho de Hidiroglou e Karpinski (1991) a dose de 60 UI/kg PV embora não suficiente para aumentar as concentrações plasmáticas por mais de uma semana, permitiu que essas concentrações ficassem superiores ao valor basal por mais de quatro semanas, tendo os autores constatado que a vitamina E fica armazenada em outros tecidos e não circulante no plasma, ficando assim disponível para o animal de forma diferente que a vitamina D.

Devido ao fato dessas doses estimadas representarem grandes volumes quando se considera os produtos existentes no mercado, as soluções vitamínicas utilizadas no presente estudo foram gentilmente disponibilizadas por laboratório farmacêutico, sem finalidade comercial e/ou de desenvolvimento de produto, viabilizando produto mais concentrado, estável e inócuo.

O dia da monta natural assistida das ovelhas foi considerado como dia 0 e, a partir daí foi contabilizado o tempo gestacional e o momento para a administração das vitaminas e das coletas de sangue. Os momentos de coleta foram:

- - 45 dias: 108º dia de gestação e dia da única aplicação das vitaminas e do veículo oleoso;
- - 30 dias: 122º dia de gestação (quatro semanas antes da data provável do parto);
- - 15 dias: 136º dia de gestação (duas semana antes da data provável do parto);
- 0: dia do parto (até 2 horas deste);
- 7 dias: uma semana após o parto;
- 15 dias: duas semanas após o parto;
- 30 dias: quatro semanas após o parto;

Aos 108 dias de gestação, isto é aos -45, após a coleta de sangue, os animais pertencentes ao grupo controle (CONTROLE) receberam única aplicação, pela via intramuscular profunda, injeção de veículo oleoso; as ovelhas pertencentes ao grupo tratado com vitamina D (VITAMINA D) receberam, pela mesma via, injeção de 70.000 UI/kg de P.V, de produto contendo 3.000.000 UI/mL de vitamina D3 (colecalciferol); e as ovelhas do grupo tratado com vitamina E (VITAMINA E), receberam 60UI/kg de P.V. (ANUGU et al., 2013) de produto contendo 450 UI/mL de vitamina E (α -tocoferol) em veículo oleoso.

Para a avaliação do impacto da aplicação destas vitaminas, foram coletados, por meio de punção da veia jugular, com agulhas e tubos com e sem anticoagulante, por meio de sistema à vácuo, 60 mL de sangue em cada momento experimental.

4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

Foi realizada análise das variáveis do metabolismo energético em plasma fluoretado, armazenado à -20°C glicose, betahidroxibutirato (BHB), ácidos graxos não esterificados (AGNE), e a concentração sérica de colesterol, triglicérides. A avaliação do perfil bioquímico, a partir de soro armazenado à -20°C, foi realizada por meio da determinação das concentrações séricas de ureia, creatinina, ácido úrico, albumina, proteína total, cálcio total e atividade sérica das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e gamaglutamil transferase (GGT), creatina quinase (CK) determinadas, com kits comerciais da Randox Laboratories Ltd. (Crumlin, Antrim, Reino Unido).

A determinação do cálcio iônico foi realizada no soro, coletado em frascos com sistema à vacuo (Vacuntainer®) e isento de íons. A análise do cátion foi realizada após a coleta, utilizando-se o método de eletrodo seletivo em analisador de eletrólitos automático Radiometer®, Roche.

Os hormônios cortisol e insulina foram analisados a partir de amostras de soro conservado à -20°C.

Para avaliar o metabolismo oxidativo, foram determinadas as atividades de superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GSH-Px) através dos kits Ransod código SD 125 e GR 2306 da Randox® Laboratories Ltd. (Crumlin, Antrim,

Reino Unido) respectivamente, a partir da papa de hemácias, conservada à -80°C, na diluição de 200µL no analisador automático Randox, modelo RX Daytona®; a mensuração da lipoperoxidação, na papa de hemácias, mantida à -80°C, por no máximo 30 dias. No plasma de EDTA, armazenado à -80°C, foi analisada a habilidade de redução férrica plasmática (HRFP), conforme metodologia descrita por Benzie e Strain, 1996, análise das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, do inglês – “thiobarbituric acid reactive substances” -TBARS). O Status Antioxidante Total (TAS), foi determinado por meio de kit comercial, a partir de amostras de soro conservadas à -80°C. A HRFP, a SOD, a GSH-Px e o TAS refletiram o status antioxidante, enquanto que o TBARS tem papel de marcador do estresse oxidativo.

A determinação das vitaminas D e E, realizada no CEMSA – Centro de Espectrometria de Massas Aplicada Ltda, com o desenvolvimento e aplicação do método bioanalítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS/MS) para quantificação de 25- hidroxivitamina-D3 e α-tocoferol (Vitamina E) foi realizada a partir da otimização das transições do espectrômetro de massas e desenvolvimento de método cromatográfico para quantificação dos compostos 25-hidroxivitamina-D3 (vitamina D3) e α- tocoferol (vitamina E) em plasma de EDTA de ovelhas. E ainda, realizou-se avaliação de figuras de mérito da validação bioanalítica (seletividade, linearidade, precisão, exatidão, efeito residual e efeito matriz) e quantificação de 25-hidroxivitamina-D3 e α-tocoferol no plasma de ovelhas. Foram utilizadas amostras obtidas nos momentos experimentais de plasma EDTA armazenado à -80°C, e determinadas pelo método de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas tipo triploquadropolo (CL-MS/MS). Essas análises foram realizadas respeitando as recomendações de Midttum & Ueland (2011). Em uma microplaca de 96 poços (600 µL) foram adicionados 150 µL de amostra (BSA ou plasma) e 300 µL de solução para precipitação de proteínas. A microplaca foi levada ao banho ultrassônico, permanecendo por 12 minutos sob temperatura ambiente (22 °C ± 1). Após esta etapa, a microplaca foi colocada no agitador de amostras (tipo vortex), permanecendo por 2 minutos sob agitação vigorosa. Então, centrifugou-a a 4.500 RPM por 20 minutos a temperatura ambiente. Após a centrifugação, foram retirados 150 µL da parte superior de cada poço da microplaca (sem remover o precipitado proteico depositado ao fundo) e aplicados em microplaca de 96 poços (Agilent, 0,5 mL) para injeção no sistema de LC- MS/MS. A microplaca foi mantida a 8°C em amostrador automático (autosampler) durante as

injeções das amostras.

Para detectar a sensibilidade insulínica, realizou-se o teste de tolerância a glicose (TTG) e o RQUICKI. O TTG foi realizado logo após o -45, aos 122 dias de gestação, em oito animais de cada um dos três grupos experimentais (CONTROLE, VITAMINA D, VITAMINA E). Foi administrada infusão de 0,18g de glicose a 50% por kg de P.V., e o sangue foi coletado aos -15, 0, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, minutos da infusão, conforme descrito por Long et al. (2015). Para analisar os resultados obtidos no TTG, foi utilizado método de cálculo denominado área abaixo da curva (AUC), obtido através do método trapezoidal para as variáveis analisadas (insulina, glicose, BHB, AGNE) (TAI, 1994). Já o RQUICKI (Revised Quantitative Insulin Sensitivity Check Index) foi obtido de maneira mais simples, a partir da fórmula adaptada e descrita por Koster e Opsomer (2013), utilizando as concentrações de AGNEs, insulina e glicemia, e o RQUICKI BHB foi acrescido BHB na fórmula, ambas mensuradas nos momentos experimentais (-45, -30, -15, 0, 7, 15, 30) e TTG:

$$\text{RQUICKI} = \frac{1}{[\log(\text{glicose}) + \log(\text{insulina}) + \log(\text{AGNE})]}$$

$$\text{RQUICKI}_{\text{BHB}} = \frac{1}{[\log(\text{glicose}) + \log(\text{insulina}) + \log(\text{AGNE}) + \log(\text{BHB})]}$$

4.3.1 VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS

As variáveis bioquímicas foram determinadas no analisador bioquímico Randox®, modelo Daytona RX, com exceção do ácido úrico que foi analisado no analisador bioquímico LABMAX 240, da marca LABTEST®.

4.3.1.1 Glicose

A concentração plasmática de glicose foi determinada pelo método colorimétrico livre de desproteinização, através do kit comercial (GL 3815) da marca Randox®, de acordo com a técnica descrita por Barham e Trinder (1972).

4.3.1.2 Betahidroxibutirato

A concentração plasmática de betahidroxibutirato (BHB) foi determinada por método cinético enzimático através do kit comercial RB 1007 da marca Randox®, de acordo com a técnica descrita por McMurray et al (1984).

4.3.1.3 Ácidos graxos não esterificados

A concentração plasmática de ácidos graxos não esterificados (AGNEs) foi determinada por meio de método colorimétrico através do kit comercial FA 115 da marca Randox®, de acordo com a metodologia descrita por Matsubara et al (1983).

4.3.1.4 Colesterol

A concentração sérica de colesterol foi determinada pelo método de hidrólise enzimática e oxidação, descrito por ABELL et al. (1952), utilizando kit comercial CH 3810 da marca Randox®.

4.3.1.5 Triglicérides

A concentração sérica de triglicerídeos totais foi determinada pelo método colorimétrico após sua hidrólise com lipases, conforme descrito por Bucola e David (1973), através do kit comercial TR 3823 da marca Randox®.

4.3.1.6 Ureia

A concentração sérica de ureia foi analisada á partir da técnica descrita por Talke e Schubert (1965), utilizando-se kit comercial UR 3825 da marca Randox®.

4.3.1.7 Creatinina

A concentração sérica de creatinina foi determinada por método colorimétrico de acordo com descrição de Bartels e Bohmer (1972) e analisada por meio de kit comercial CR 3814 da marca Randox®.

4.3.1.8 Ácido úrico

A concentração sérica de ácido úrico foi determinada por meio de kit comercial (TBHBA) FS da marca Diasys®, através da técnica do teste fotométrico enzimático usando TBHBA (ácido 2,4,6-tribromo-3-hidroxibenzóico), no analisador bioquímico LABMAX 240, da marca LABTEST®, de acordo com a técnica descrita por Fossati (1980).

4.3.1.9 Aspartato aminotransferase

A atividade enzimática da aspartato aminotransferase (AST) foi determinada de acordo com metodologia descrita por Wroblewski e Ladue (1956) por meio de kit comercial AS 3804 da marca Randox®.

4.3.1.10 Gamaglutamil transferase

A atividade enzimática da gamaglutamil transferase (GGT) foi determinada de acordo método colorimétrico descrito por Szasz (1974), utilizando-se kit comercial GT 3817 da marca Randox®.

4.3.1.11 Creatino quinase

A atividade enzimática da creatina quinase (CK) analisada de acordo com metodologia descrita por Stein (1985), através de kit comercial CK 110 da marca Randox®.

4.3.1.12 Albumina

A concentração sérica de albumina realizada pelo método do verde bromocresol, descrita por Doumas et al. (1971) e foi determinada por meio do kit comercial AB 3800 da marca Randox®.

4.3.1.13 Proteína total

A concentração sérica de proteína total foi determinada pelo método do biureto, descrito por Weichselbaum (1946) por meio do kit comercial TP 4001 da marca Randox®.

4.3.1.14 Cálcio total

A concentração sérica de cálcio total foi determinada de acordo com a técnica descrita por Michaylova e Ilkova (1971), por meio de kit comercial CA 3871 da marca Randox®.

4.3.1.15 Cálcio iônico

A determinação do cálcio iônico foi realizada no soro, coletado em frascos com sistema à vacuo (Vacuntainer®) sem anticoagulante, apenas com indutor de coágulo. A análise do cátion foi realizada após a centrifugação da amostra, imediatamente após a abertura do frasco, utilizando-se o método de eletrodo seletivo em analisador de eletrólitos automático Cobas b 121, Roche®.

4.3.2 HORMÔNIOS

4.3.2.1 Cortisol

A concentração sérica de cortisol foi determinada por meio de ensaio imunométrico por quimioluminescência com enzima marcada em fase sólida, através de kit comercial (IMMULITE/IMMULITE 1000 Cortisol), no aparelho Immunoassay analyzer, enzime, Immulite 1000- Siemens®, de acordo com Coetzee et al. (2007).

4.3.2.2 Insulina

A concentração sérica de insulina foi determinada por meio de ensaio imunométrico por quimioluminescência com enzima marcada em fase sólida, através

de kit comercial (IMMULITE/IMMULITE 1000 Insulin), no aparelho Immunoassay analyzer, enzyme, Immulite 1000- Siemens®.

4.3.3 DETERMINAÇÃO DAS VITAMINAS

4.3.3.1 Determinação de colecalciferol (vitamina D) e acetato de α - tocoferol (vitamina E)

As concentrações plasmáticas das vitaminas D e E foram determinadas pelo método de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas tipo triploquadrupolo (CL-MS/MS). Essas análises foram realizadas respeitando as recomendações de Midttum & Ueland (2011).

4.3.4 METABOLISMO OXIDATIVO

4.3.4.1 Superóxido dismutase (SOD) e Glutathione Peroxidase (GSH-Px)

As atividades da superóxido dismutase (SOD) e da glutathione peroxidase (GSH-Px) foram determinadas através de kit comercial SD 125 e RS 504/505 da marca Randox®, respectivamente, a partir da papa de hemácias na diluição de 200 μ L, de acordo com as técnicas descritas por Wooliams et al (1983) e Paglia e Valentine (1967) respectivamente.

4.3.4.2 Status antioxidante total (TAS)

O status oxidante total (TAS) foi analisado por meio de kit comercial NX 2332 da marca Randox®, de acordo com a técnica descrita por Miller et al (1993).

4.3.4.3 Concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi analisada por meio de kit comercial (TBARS Assay kit) da marca Cayman®, de acordo com metodologia descrita por Yagi (1998) e a leitura da placa de ELISA com as amostras, no aparelho Elx 808 da marca Biotek®.

4.3.4.4 Habilidade de redução férrica plasmática (HRFP)

A habilidade de redução férrica plasmática (HRFP) foi avaliada conforme metodologia descrita por Benzie e Strain (1996) e a leitura das amostras foi realizada em cubetas de plástico no espectrofotômetro E-225-D da marca CELM®.

4.3.5 AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE: ENSAIOS FUNCIONAIS DE METABOLISMO OXIDATIVO E FAGOCITOSE E IMUNOFENOTIPAGEM

Para a realização dos ensaios funcionais de metabolismo oxidativo e fagocitose, bem como para a realização da imunofenotipagem, foram utilizadas seis ovelhas de cada tratamento. Foram utilizadas as amostras de sangue coletadas em tubos de sistema a vácuo contendo EDTA, obtidas aos 30 dias antes do parto (- 30), 15 dias antes do parto (-15), no parto (0), 7 dias após o parto (7) e 30 dias após o parto (30), para imunofenotipagem e, para ensaios de metabolismo oxidativo e fagocitose, foram utilizadas amostras de sangue com EDTA coletadas nos momentos -30, 0 e 30. Tanto a imunofenotipagem quanto os ensaios funcionais de metabolismo oxidativo e fagocitose foram analisados por citometria de fluxo.

4.3.5.1 Ensaio de fagocitose e metabolismo oxidativo

Para o ensaio de fagocitose e metabolismo oxidativo (BURST), provas

imediatas, isso é, realizadas logo após a coleta do sangue, foram utilizados os reagentes DCFH-DA (Diacetato de 2,7 –Diclorodihidrofluoresceína), PMA (forbol 12 – miristato 13- acetato), SAPI (lipopolissacarídeos de *Staphylococcus aureus* conjugados ao iodeto de propídio). O quadro 1 ilustra a proporção dos reagentes utilizados. Após a pipetagem dos reagentes nas amostras conforme ilustrado no quadro 1, o material foi incubado à 37°C, sob agitação por 30 minutos, protegidos da luz direta.

Quadro 1 – Estímulos utilizados na citometria de fluxo de ovelhas do grupo controle ou suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação.

	Sangue total ou 2x10 ⁵ cél/s/100ul	DCFH-DA	SAPI	PMA	PBS
A	100uL				1000uL
B	100uL	200uL			800uL
C	100uL		50uL		900uL
D	100uL	200uL	50uL		700uL
E	100uL	200uL		100uL-PMA	700uL

Foi acrescentado 2mL de EDTA 3 mM gelado aos tubos C e D (estímulo com fagocitose), para interromper a reação, e centrifugado por 2 vezes à 400 g por 10 minutos. Foi realizada lise de hemácias, com adição de 2mL de tampão ACK centrifugadas à 400g por 5 minutos, acrescentado 300uL de PBS e imediatamente após foi realizada leitura em citometro de fluxo FACSCalibur, da BD®.

4.3.5.2 Lise de hemácias e congelamento

As amostras de sangue total para a imunofenotipagem foram prontamente submetidas ao protocolo de lise com adição de 5 mL de tampão hipotônico ACK (cloreto de amônio) em 1mL de sangue total, em seguida o material foi centrifugado sob refrigeração à 400G por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao botão celular resultante foi adicionado PBS seguido de nova centrifugação. O botão celular

foi então ressuspendido em solução tampão de congelamento: 90% SFB (soro fetal bovino) e 10% DMSO (dimetilsulfóxido). Em seguida, o material foi acondicionado em criotubos de 2 mL e congelado à -80°C por 24 horas. Após este período, as amostras foram transferidas para botijão de congelamento contendo nitrogênio líquido.

4.3.5.3 Descongelamento para imunofenotipagem

As amostras de sangue total processadas para congelamento, mantidas em nitrogênio líquido, foram descongeladas em banho-maria à 37°C por 1 minuto para análise. Foi adicionado 1mL de PBS e soro normal de galinha 5% em tubos Falcon®. Em seguida o material foi centrifugado por 5 minutos à 400g, novamente o botão celular foi ressuspendido em PBS e soro 5% e após 30 minutos de bloqueio foi centrifugado e dividido em 3 tubos de citometria. O anticorpo conjugado do painel correspondente foi acrescido à amostra como ilustrado no quadro 2.

Quadro 2 – Anticorpos utilizados na imunofenotipagem de ovelhas do grupo controle ou suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação.

Anticorpo CD4	Fluorocromo FITC	Clone 44.38	Marca BIO-RAD	Isotipo IgG2a	Proporções 1:50	Concentração 20µg/mL	Painel A
CD8	RPE	38.65	BIO-RAD	IgG2a	1:50	20µg/mL	A
CD14	647	TUK4	BIO-RAD	IgG2a	1:50	200µg/mL	B
CD16	FITC	KD1	BIO-RAD	IgG2a	1:10	100µg/mL	B
CD45R	RPE	20.96	BIO-RAD	IgG1	1:20	20µg/mL	B
WC1	FITC	19.19	BIO-RAD	IgG1	1:50	20µg/mL	C
CD206	RPE		BIO-RAD	IgG1	1:10	50µg/mL	C

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados de acordo com o Proc Mixed para modelos mistos (SAS Inst. Inc., Cary, NC), tendo os momentos de coleta (-45, -30, -15, 0, 7, 15 e 30) como medidas repetidas. Antes das análises propriamente ditas, os dados foram analisados em relação à presença de informações discrepantes (“outliers”) e normalidade dos resíduos (Shapiro-Wilk). A transformação logarítmica foi necessária, quando a premissa de normalidade não foi atendida.

Para as 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) (Wang; Goonewardene, 2004). O modelo incluiu efeito fixo de ‘Tratamento’, ‘Tempo’ (dias), interação entre ‘Tempo e Tratamento’ e a covariável ‘Número de Cordeiros Nascidos’. Adicionalmente, as comparações de médias entre tratamentos e também entre os tempos foram realizadas através do teste de Tukey.

Para estudo da associação linear entre duas variáveis foi realizada a análise de correlação através do coeficiente de Pearson. A correlação foi considerada alta quando $r > 0,6$; média quando $0,6 > r > 0,3$ e baixa quando $r < 0,3$ (Little e Hills, 1978; Sampaio, 1998).

Para todos os testes realizados foi adotado o nível de significância de 5%.

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 1 - Valores médios e respectivos erros padrão da média do peso (kg) no período periparto de ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

5.1.2 Escore de condição corporal (ECC)

A tabela 2 mostra valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) do ECC. Não foram observados efeitos de interação tempo*tratamento ($P=0,3630$) e de tratamento ($P=0,2622$). Houve efeito de tempo ($P< 0,0001$), ilustrado no gráfico 2.

Tabela 2 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) do ECC de ovelhas no periparto suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos				Probabilidades	
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Tratamento
-45	3,01	3,00	2,85	2,95 ^A	0,0696	
-30	2,96	2,90	2,70	2,85 ^A	0,0696	
-15	2,56	2,70	2,55	2,60 ^B	0,0696	
0	2,35	2,17	2,14	2,22 ^C	0,0717	
7	1,91	2,00	1,90	1,93 ^D	0,0696	
15	2,01	2,00	1,60	1,87 ^D	0,0696	
30	1,71	1,60	1,45	1,58 ^E	0,0696	
Geral	2,36	2,34	2,17	2,29		0,2622

Tempo: < 0,0001

Tempo*trat: 0,3630

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 2 - Valores médios e respectivos erros padrão da média do ECC no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

5.1.3 Temperatura retal

A tabela 3 mostra os valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) da temperatura retal de ovelhas no periparto suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto. Não foram observados efeitos de interação tempo*tratamento ($P=0,3166$) e de tratamento ($P=0,4533$). O efeito de tempo foi observado ($P< 0,0001$), conforme ilustrado no gráfico 3.

Tabela 3 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) da temperatura (°C) de ovelhas no periparto suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos			Probabilidades	
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM
-45	38,62	38,68	38,60	38,63 ^C	0,0772
-30	38,50	38,47	38,60	38,52 ^C	0,0640
-15	38,73	38,64	38,75	38,71 ^C	0,0820
0	38,20	39,32	39,29	39,27 ^A	0,0454
7	38,99	38,85	39,10	38,98 ^B	0,0968
15	38,97	38,85	39,19	39,00 ^B	0,0865
30	38,49	38,28	38,77	38,51 ^C	0,0787
Geral	38,78	38,73	38,90	38,80	0,4533

Tempo: $< 0,0001$

Tempo*trat: 0,3166

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 3 – Valores médios e respectivos erros padrão da média da temperatura (°C) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

5.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

5.2.1 Glicose

Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações plasmáticas de glicose estão apresentados na tabela 4. Não foram observados efeitos de interação entre tratamento e tempo ($P=0,828$) e efeito principal de tratamento ($P=0,4855$). Porém houve efeito principal de tempo ($P<0,0001$). O gráfico 4 ilustra o efeito principal de tempo, por meio das médias dos nos momentos experimentais. No momento do parto (dia 0) há aumento na glicemia das ovelhas, independente do tratamento recebido, que vai diminuindo no pós-parto.

Tabela 4 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações plasmáticas de glicose (mmol/L) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos			Probabilidades		
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Tratamento
-45	2,91	2,95	2,91	2,92 ^C	0,0500	
-30	2,84	2,93	2,82	2,86 ^C	0,0620	
-15	2,80	2,86	2,68	2,78 ^C	0,0347	
0	9,59	8,19	8,26	8,68 ^A	0,5813	
7	3,88	3,79	3,78	3,82 ^B	0,0687	
15	3,79	3,72	3,68	3,73 ^B	0,0392	
30	3,87	3,80	3,84	3,83 ^B	0,0503	
Geral	4,24	4,03	3,99	4,08		0,4855
Tempo	< 0,0001					
Tempo*trat	0,828					

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 4 - Valores médios e respectivos erros padrão da média das concentrações plasmáticas de glicose (mmol/L) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E aos 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

5.2.2 Betahidroxibutirato (BHB)

A tabela 5, mostra valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações plasmáticas de BHB. Não foi observada interação tratamento*tempo ($P=0,7678$) nem efeito principal de tratamento ($P=0,3995$). Foi observado, porém, efeito principal de tempo ($P<0,0001$) que está ilustrado no gráfico 5.

Tabela 5 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações plasmáticas de betahidroxibutirato (BHB) (mmol/L) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos			Probabilidades		
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Tratamento
-45	0,42	0,42	0,42	0,42 ^C	0,002	
-30	0,42	0,52	0,42	0,42 ^{BC}	0,002	
-15	0,52	0,63	0,52	0,52 ^{BA}	0,002	
0	0,52	0,31	0,42	0,42 ^{BC}	0,003	
7	0,52	0,52	0,52	0,52 ^{BC}	0,003	
15	0,63	0,73	0,63	0,63 ^A	0,004	
30	0,52	0,52	0,52	0,52 ^B	0,002	
-45	0,42	0,42	0,42	0,52	0,002	0,3995
Tempo	<0,0001					
Tempo*trata	0,7678					

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 5 - Valores médios e respectivos erros padrão da média das concentrações plasmáticas de BHB (mmol/L) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

5.2.3 Ácidos graxos não esterificados (AGNE)

A tabela 6 mostra os valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações plasmáticas de AGNE. Não foi observada interação entre tratamento e tempo ($P=0,0854$) nem efeito principal de tratamento ($P=0,2899$). Foi observado efeito principal de tempo ($P<0,0001$). O gráfico 6 ilustra o efeito principal de tempo, por meio das médias das concentrações de AGNEs das 30 ovelhas nos momentos experimentais.

Tabela 6 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações plasmáticas de ácidos graxos não esterificados (AGNE) ($\mu\text{mol/L}$) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos				Probabilidades	
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Controle
-45	158,05	202,02	187,71	182,59 ^C	9,655	
-30	312,74	479,32	490,46	427,51 ^{BA}	26,931	
-15	318,14	314,52	333,72	322,13 ^B	24,912	
0	1009,64	276,70	760,64	680,62 ^A	104,970	
7	316,64	343,92	335,51	332,03 ^{BA}	37,623	
15	354,44	432,52	372,02	386,33 ^{BA}	38,224	
30	350,63	285,73	322,32	319,56 ^B	29,678	
Geral	402,90	333,53	400,38	382,25		0,2577
Tempo	<0,0001					
Tempo*trat	0,0799					

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 6 – Valores médios e respectivos erros padrão da média das concentrações plasmáticas de (AGNE) ($\mu\text{mol/L}$) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

5.2.4 Colesterol

Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações séricas de colesterol são apresentados na tabela 7. Não foi observada interação tempo*tratamento ($P=0,9053$), porém foi observado efeito principal de tratamento ($P=0,0088$) e de tempo ($P<0,0001$). As ovelhas que receberam vitamina E apresentaram, em média, menores concentrações de colesterol que as ovelhas que receberam vitamina D ($P=0,0078$). O gráfico 7 ilustra os valores médios, por tratamento.

Tabela 7 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações séricas de colesterol (mmol/L) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos			Probabilidades		
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Tratamento
-45	1,77	1,77	1,61	1,72 ^B	0,0373	
-30	1,75	1,88	1,61	1,74 ^B	0,0435	
-15	1,68	1,75	1,57	1,66 ^B	0,0309	
0	1,70	1,72	1,52	1,64 ^{CB}	0,0352	
7	1,46	1,45	1,36	1,42 ^D	0,0398	
15	1,50	1,59	1,40	1,50 ^{CD}	0,0403	
30	2,02	2,07	1,96	2,02 ^A	0,0642	
Geral	1,70 ^{ab}	1,75 ^a	1,58 ^b	1,67		0,0088

Tempo: $< 0,0001$

Tempo*trat: 0,9053

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: Letras minúsculas na linha indicam diferenças entre tratamentos.

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 7 - Valores médios e respectivo erros padrão da média das concentrações plasmáticas de colesterol (mmol/L) no período periparto das ovelhas do grupo controle, das ovelhas suplementadas com a vitamina D e das ovelhas suplementadas com a vitamina E no 108º dia de gestação durante o período experimental – São Paulo 2018

* -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

5.2.5 Triglicérides

Os valores médios e seus respectivos erros padrão da média (EPM) para triglicérides são apresentados na tabela 8. Não houve interação tempo*tratamento ($P=0,5381$), nem houve efeito de tratamento ($P=0,1341$), porém foi observado efeito de tempo ($P<0,0001$), ilustrado no gráfico 8.

Tabela 8 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações séricas de triglicérides (mmol/L) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos			Probabilidades	
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM
-45	0,57	0,60	0,50	0,56 ^A	0,0312
-30	0,53	0,56	0,46	0,52 ^A	0,0234
-15	0,43	0,50	0,43	0,45 ^A	0,0258
0	0,28	0,24	0,20	0,24 ^B	0,0146
7	0,22	0,20	0,20	0,20 ^B	0,0100
15	0,25	0,23	0,21	0,23 ^B	0,0126
30	0,22	0,24	0,22	0,23 ^B	0,0095
Geral	0,36	0,37	0,32	0,35 ^B	0,1341

Tempo: < 0,0001

Tempo*trat: 0,5381

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 8 – Valores médios e respectivos erros padrão da média das concentrações séricas de triglicérides (mmol/L) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

5.2.6 Ureia

Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações séricas de ureia estão demonstrados na tabela 9 e demonstradas no gráfico 9. Não foi observada interação tempo*tratamento (0,6387) nem efeito principal de tratamento ($P=0,2273$), porém foi evidenciado efeito principal de tempo ($P<0,0001$).

Tabela 9 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações séricas de ureia (mmol/L) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos			Probabilidades		
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Tratamento
-45	8,08	7,17	7,81	7,69 ^A	0,193	
-30	6,00	5,21	5,98	5,73 ^B	0,190	
-15	4,73	4,45	4,39	4,52 ^C	0,190	
0	6,52	5,90	6,06	6,16 ^B	0,190	
7	7,66	6,72	6,97	7,12 ^A	0,193	
15	7,42	7,32	7,00	7,24 ^A	0,190	
30	6,06	5,96	6,26	6,09 ^B	0,190	
Geral	6,64	6,11	6,35	6,350		0,2273

Tempo: $< 0,0001$

Tempo*trat: 0,6387

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 9 – Valores médios e respectivos erros padrão da média das concentrações séricas de ureia (mmol/L) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

5.2.7 Creatinina

A tabela 10 e o gráfico 10 mostram valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações de creatinina. Não houve interação tempo*tratamento ($P=0,4492$) e não foi observado efeito principal de tratamento ($P=0,5100$). Foi observado, porém, efeito de tempo ($P<0,0001$).

Tabela 10 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações séricas de creatinina ($\mu\text{mol/L}$) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos			Probabilidades		
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Tratamento
-45	81,06	80,80	89,64	83,83 ^A	1,9392	
-30	83,14	88,40	90,26	87,27 ^A	2,2131	
-15	83,67	84,97	85,93	84,86 ^A	2,0369	
0	87,92	85,22	86,10	86,41 ^A	2,6899	
7	69,23	67,36	70,19	68,93 ^B	1,7310	
15	66,08	69,75	70,37	68,73 ^B	1,2688	
30	68,20	63,12	71,17	67,50 ^B	1,6633	
Geral	77,04	77,09	80,52	78,13		0,5100

Tempo: $<0,0001$

Tempo*trat: 0,4492

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 10 – Valores médios e respectivos erros padrão da média das concentrações séricas de creatinina ($\mu\text{mol/L}$) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

5.2.8 Ácido úrico

Valores médios e os respectivos erros padrão da média (EPM) para ácido úrico são mostrados na tabela 11 e ilustrados no gráfico 11. Não foi observada nem interação tempo*tratamento ($P=0,8261$) nem efeito principal de tratamento ($P=0,7344$), porém, foi observado efeito de tempo ($P<0,0001$).

Tabela 11 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações séricas de ácido úrico ($\mu\text{mol/L}$) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos				Probabilidades	
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Tratamento
-45	1,53	2,36	3,15	2,35 ^D	0,1972	
-30	4,52	3,85	4,37	4,25 ^C	0,4914	
-15	5,38	6,28	5,81	5,82 ^{BC}	0,4240	
0	6,63	7,11	7,96	7,23 ^{BA}	0,5129	
7	7,20	8,50	8,33	8,01 ^A	0,4915	
15	9,55	8,60	8,99	9,05 ^A	0,7744	
30	7,74	8,77	7,46	7,99 ^A	0,5332	
Geral	6,08	6,50	6,58	6,43		0,7344

Tempo: <0,0001

Tempo*trat: 0,8261

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 11 – Valores médios e os respectivos erros padrão da média das concentrações séricas de ácido úrico ($\mu\text{mol/L}$) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

5.2.9 Aspartato amino transferase (AST)

A atividade da enzima AST está apresentada na tabela 12 por meio de seus valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM). Não houve interação tempo*tratamento ($P=0,6184$) e não foi observado efeito de tratamento ($P=0,2876$), porém foi observado efeito de tempo ($P<0,0001$), ilustrado no gráfico 12 por meio das médias gerais dos grupos experimentais.

Tabela 12 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) da atividade de AST (UI/L 30° C) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos			Probabilidades		
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Tratamento
-45	68,82	64,55	60,35	64,58 ^B	1,8421	
-30	69,98	64,78	64,84	66,54 ^B	1,4595	
-15	66,05	64,03	62,02	64,03 ^B	1,2575	
0	62,88	67,38	60,22	63,49 ^B	1,6499	
7	82,53	74,05	76,44	77,68 ^A	2,9541	
15	85,87	68,22	77,40	77,16 ^{BA}	5,5786	
30	89,20	88,97	85,97	88,05 ^A	2,7391	
Geral	75,05	70,28	69,61	71,60		0,2876

Tempo: $< 0,0001$

Tempo*trat: 0,6184

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 12 – Valores médios e respectivos erros padrão da média da atividade de AST (UI/L 30° C) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

5.2.10 Gamaglutamil transferase (GGT)

Os valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) para a atividade da GGT são apresentados na tabela 13. Não foram observados interação tempo*tratamento ($P=0,8416$) e efeito de tratamento ($P=0,5505$), porém houve efeito de tempo ($P<0,0001$), o que está ilustrado no gráfico 13.

Tabela 13 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) da atividade sérica da GGT (UI/L 30° C) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos			Probabilidades		
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Tratamento
-45	26,50	26,54	31,37	28,13 ^B	2,0700	
-30	33,73	34,38	37,04	35,05 ^B	1,1421	
-15	31,62	32,24	34,23	32,70 ^B	1,2823	
0	35,68	33,62	37,43	35,58 ^B	1,7989	
7	46,00	43,94	45,77	45,24 ^A	2,1897	
15	59,36	48,85	50,05	52,75 ^A	4,1603	
30	62,27	49,38	45,89	52,51 ^A	3,0377	
Geral	42,16	38,42	40,25	40,25		0,5505

Tempo: < 0,0001

Tempo*trat: 0,8416

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 13 – Valores médios e respectivos erros padrão da média da atividade sérica da GGT (UI/L 30° C) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

5.2.11 Creatina quinase (CK)

Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) da atividade sérica de CK estão apresentados na tabela 14. Não foram observados interação tempo*tratamento ($P=0,2340$) e efeito de tratamento ($P=0,1995$), porém houve efeito de tempo ($P<0,0001$), que está ilustrado, por meio das médias gerais dos grupos experimentais, no gráfico 14.

Tabela 14 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) da atividade sérica de CK (UI/L 30°) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos				Probabilidades	
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Tratamento
-45	31,40	38,02	31,52	33,64 ^{BA}	1,8035	
-30	29,77	28,01	27,77	28,52 ^C	1,0724	
-15	44,10	28,29	26,79	33,06 ^{BA}	3,9511	
0	46,93	47,42	39,21	44,52 ^A	3,1411	
7	31,32	21,72	30,32	27,79 ^C	2,7221	
15	35,61	37,75	31,73	35,03 ^{BA}	1,4072	
30	22,35	19,03	26,31	22,56 ^C	1,7549	
Geral	34,50	31,46,31	30,52	32,13		0,1995

Tempo: $< 0,0001$

Tempo*trat: 0,2340

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 14 – Valores médios e respectivos erros padrão da média da atividade sérica de CK (UI/L 30º) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

5.2.12 Albumina

Na tabela 15 estão apresentados valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações séricas de albumina. Não foram observados interação tempo*tratamento ($P=0,9687$) e efeito principal de tratamento ($P=0,0763$); porém foi observado efeito de tempo ($P= 0,0028$), o que está ilustrado no gráfico 15.

Tabela 15 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações séricas de albumina (g/L) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos			Probabilidades		
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Tratamento
-45	31,89	31,98	31,78	31,88 ^A	0,2745	
-30	31,44	31,90	31,20	31,51 ^A	0,2835	
-15	30,74	30,48	29,88	30,36 ^B	0,2744	
0	31,84	31,78	30,58	31,40 ^A	0,2744	
7	31,90	31,38	30,78	31,35 ^{BA}	0,2790	
15	31,14	31,68	30,68	31,17 ^{BA}	0,2744	
30	31,64	31,68	31,38	31,57 ^A	0,2744	
Geral	31,51	31,56	30,90	31,32		0,0763

Tempo: 0,0028

Tempo*trat: 0,9687

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 15 – Valores médios e respectivos erros padrão da média das concentrações séricas albumina (g/L) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

5.2.13 Proteína Total

Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações séricas de proteína total estão apresentados na tabela 16. Não foram observados efeitos de interação tempo*tratamento ($P=0,6216$) e de tratamento ($P=0,2888$), porém foi observado efeito de tempo ($P < 0,0001$), ilustrado no gráfico 16 por meio das médias gerais dos grupos durante o período experimental.

Tabela 16 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações séricas de proteína total (g/L) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos				Probabilidades	
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Tratamento
-45	64,98	65,40	65,02	65,14 ^A	0,6603	
-30	63,50	63,22	62,69	63,14 ^{BA}	0,5534	
-15	61,18	61,22	60,44	60,95 ^B	0,5643	
0	66,23	66,07	62,72	65,01 ^A	0,8217	
7	66,79	65,32	65,32	65,89 ^A	0,8430	
15	65,89	62,05	63,10	63,68 ^{BA}	1,0294	
30	67,60	66,75	63,91	66,09 ^A	0,7092	
Geral	65,17	64,29	63,32	64,22		0,2888

Tempo: $< 0,0001$

Tempo*trat: 0,6216

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 16 – Valores de médios e respectivos erros padrão da média das concentrações séricas de proteína total (g/L) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

5.2.14 Cálcio

A tabela 17 mostra valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações séricas de cálcio. Não foram observados efeitos de interação tempo*tratamento ($P=0,1802$) e de tratamento ($P=0,2647$); porém foi observado efeito de tempo ($P=0,0046$), ilustrado, por meio das médias gerais dos grupos, no gráfico 17.

Tabela 17 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações séricas de cálcio (mmol/L) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos			Probabilidades	
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM
-45	2,46	2,46	2,41	2,44 ^B	0,0209
-30	2,41	2,58	2,47	2,48 ^{BA}	0,0209
-15	2,49	2,59	2,50	2,52 ^{BA}	0,0209
0	2,55	2,52	2,48	2,52 ^{BA}	0,0213
7	2,54	2,51	2,51	2,52 ^{BA}	0,0213
15	2,52	2,52	2,50	2,52 ^{BA}	0,0209
30	2,60	2,53	2,57	2,57 ^A	0,0209
Geral	2,51	2,53	2,49	2,51	0,2647

Tempo: 0,0046

Tempo*trat: 0,1802

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 17 – Valores médios e respectivos erros padrão da média das concentrações séricas de cálcio (mmol/L) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

5.2.15 Cálcio ionizável

Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações séricas de cálcio ionizável estão apresentados na tabela 18. Não foram observados efeito interação tempo*tratamento ($P=0,9210$) e efeito de tratamento ($P=0,2911$); porém houve efeito de tempo ($P = 0,0056$), ilustrado no gráfico 18.

Tabela 18 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações séricas de cálcio ionizável (mmol/L) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos			Probabilidades		
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Tratamento
-45	1,28	1,28	1,27	1,278 ^{BA}	0,0135	
-30	1,23	1,29	1,25	1,256 ^B	0,0140	
-15	1,24	1,30	1,24	1,258 ^{BA}	0,0122	
0	1,25	1,28	1,25	1,257 ^{BA}	0,0163	
7	1,25	1,26	1,28	1,264 ^{BA}	0,0124	
15	1,28	1,27	1,29	1,278 ^{BA}	0,0122	
30	1,31	1,32	1,31	1,314 ^A	0,0090	
Geral	1,26	1,29	1,27	1,27		0,2911

Tempo: 0,0056

Tempo*trat: 0,9210

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 18 – Valores médios e respectivos erros padrão da média das concentrações séricas de cálcio ionizável (mmol/L) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

5.3 RQUICKI calculados

5.3.1 RQUICKI (“Revised quantitative insulin sensitivity check indexes”)

Os valores médios e seus respectivos erros padrão da média (EPM) para RQUICKI estão apresentados na tabela 19 e ilustrados no gráfico 19. Não houve interação tempo*tratamento ($P=0,4015$) e também não foi observado efeito de tratamento ($P=0,2020$), porém foi observado efeito principal de tempo ($P= 0,0002$), independente do tratamento.

Tabela 19 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) do RQUICKI no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos			Probabilidades		
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Tratamento
-45	3,84	3,77	3,81	3,81 ^A	0,0966	
-30	3,79	3,87	4,02	3,89 ^A	0,0862	
-15	4,13	3,83	4,02	3,99 ^A	0,0767	
0	3,72	3,27	3,79	3,59 ^A	0,1517	
7	3,98	3,74	3,59	3,77 ^A	0,0730	
15	3,92	3,74	3,76	3,81 ^A	0,0764	
30	3,73	3,52	3,55	3,60 ^A	0,0551	
Geral	3,87	3,68	3,79	3,78		0,2020

Tempo: 0,0002

Tempo*trat: 0,4015

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 19 – Valores médios e respectivo erros padrão da média do RQUICKI (%) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

5.3.1 RQUICKI BHB

Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) do RQUICKI BHB no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto estão apresentados na tabela 20 e ilustrados no gráfico 20. Não foi observada interação tempo*tratamento ($P=0,8764$) nem efeito de tratamento ($P=0,2738$), porém foi observado efeito de tempo ($P=<0,0001$), independente do tratamento.

Tabela 20 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) de RQUICKI BHB no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos			Probabilidades		
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Tratamento
-45	1,34	2,19	2,13	1,89 ^A	0,2708	
-30	1,70	1,39	1,45	1,52 ^A	0,1326	
-15	1,09	1,14	1,37	1,20 ^A	0,0921	
0	0,43	0,67	0,59	0,56 ^C	0,0483	
7	0,64	0,96	0,96	0,85 ^B	0,0826	
15	0,68	0,79	0,91	0,80 ^B	0,0568	
30	0,82	0,93	1,02	0,92 ^B	0,0523	
Geral	0,96	1,15	1,20	1,12		0,2738

Tempo: $<0,0001$

Tempo*trat: 0,8764

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 20 – Valores médios e respectivos erros padrão da média do RQUICKI BHB no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

5.4 HORMÔNIOS

5.4.1 Cortisol

Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações séricas de cortisol estão apresentados na tabela 21. Não foram observados efeitos de interação tempo*tratamento ($P=0,2970$) nem efeito de tratamento ($P<0,0001$), porém houve efeito de tempo ($P<0,0001$), ilustrado no gráfico 21.

Tabela 21 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações séricas de cortisol (ug/dL) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos			Probabilidades		
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Tratamento
-45	1,16	1,51	1,54	1,40 ^{BC}	0,0848	
-30	1,56	1,74	2,33	1,88 ^{BA}	0,1471	
-15	1,29	1,18	1,18	1,22 ^C	0,0494	
0	2,57	2,39	2,12	2,36 ^A	0,2344	
7	1,32	1,16	1,29	1,26 ^C	0,0646	
15	1,19	1,06	1,28	1,17 ^C	0,0734	
30	1,30	1,16	1,09	1,18 ^C	0,0476	
Geral	1,48	1,46	1,55	1,52		0,7140

Tempo: <0,0001

Tempo*trat: 0,2970

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 21 – Valores de média geral e respectivos erros padrão da média das concentrações séricas de cortisol (ug/dL) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

5.4.2 Insulina

As concentrações séricas de insulina têm seus valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) apresentados na tabela 22. Não foram observados efeito de interação tempo*tratamento ($P=0,6297$) e de tratamento ($P=0,8091$); porém foi observado efeito de tempo ($P=0,0009$), ilustrado no gráfico 22.

Tabela 22 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações séricas de insulina (uIU/mL) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos			Probabilidades		
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Tratamento
-45	7,16	5,03	8,45	6,88 ^{BC}	1,0548	
-30	7,47	2,86	3,51	4,61 ^{BC}	1,7422	
-15	3,69	5,54	3,31	4,18 ^C	0,6833	
0	20,69	33,59	36,81	30,36 ^A	7,3410	
7	26,92	11,59	13,58	17,36 ^{BA}	4,0346	
15	12,34	8,56	7,83	9,58 ^{BA}	1,4197	
30	10,05	5,75	7,40	7,73 ^{BAC}	1,2182	
Geral	12,62	10,42	11,56	12,05		0,8091

Tempo:0,0009

Tempo*trat:0,6297

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7,15 e 30 dias pós-parto.

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 22 – Valores médios e respectivos erros padrão da média das concentrações séricas de insulina (uIU/mL) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

5.5 CONCENTRAÇÃO DAS VITAMINAS D e E

5.5.1 Vitamina D (colecalfiferol)

Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações plasmáticas de colecalfiferol estão apresentados na tabela 23 e ilustrados no gráfico 23. Foi observado efeito de interação tempo*tratamento ($P < 0,0001$), ilustrado também no gráfico 23.

Tabela 23 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações plasmáticas de colecalciferol (ng/mL) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos			Probabilidades		
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Tratamento
-45	4,19 ^B	3,68 ^B	4,06 ^B	3,98 ^B	0,2470	0,6767
-30	9,39 ^B	95,56 ^A	9,46 ^B	38,14 ^A	5,7833	<0,0001
-15	9,82 ^B	155,72 ^A	10,11 ^B	58,55 ^A	12,7722	<0,0001
0	12,22 ^B	174,83 ^A	8,36 ^B	65,14 ^A	16,7776	0,0003
7	6,75 ^B	96,77 ^A	7,92 ^B	37,15 ^A	6,3188	<0,0001
15	7,43 ^B	110,60 ^A	7,15 ^B	41,73 ^A	9,0806	0,0002
30	8,54 ^B	105,02 ^A	9,01 ^B	40,86 ^A	7,4927	<0,0001
Geral	8,34	106,03	8,01	41,13		< 0,0001

Tempo: < 0,0001

Tempo*trat: < 0,0001

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto. Letras minúsculas na linha indicam diferenças entre tratamentos.

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 23 – Valores médios e respectivos erros padrão da média das concentrações plasmáticas de colecalciferol (ng/mL) no período periparto das ovelhas do grupo controle, das ovelhas suplementadas com as vitaminas D e das ovelhas suplementadas com E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto

5.5.2 Vitamina E (α -tocoferol)

Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações plasmáticas de Vitamina E (α -tocoferol) estão apresentados na tabela 24. Não foram observados interação tempo*tratamento ($P=0,0811$) e efeito de tratamento ($P=0,2326$), porém houve efeito de tempo ($P<0,0001$), como ilustrado no gráfico 24.

Tabela 24 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações plasmáticas de Vitamina E (α -tocoferol) (ng/mL) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos				Probabilidades	
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Tratamento
-45	232,02	216,39	249,89	232,77 ^E	29,9948	
-30	634,91	703,49	710,89	683,10 ^A	29,9810	
-15	495,01	699,29	596,89	597,06 ^{BA}	29,9810	
0	580,68	469,89	464,69	505,09 ^{BC}	31,5990	
7	269,36	355,77	350,08	325,07 ^{DE}	32,6892	
15	267,64	374,95	346,89	329,83 ^{DE}	33,3822	
30	298,91	477,29	416,59	397,60 ^{DC}	29,9810	
Geral	396,93	471,01	447,99	442,44		0,2326

Tempo: $<0,0001$

Tempo*trat: 0,0811

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 24 – Valores médios e respectivos erros padrão da média das concentrações plasmáticas de Vitamina E (α -tocoferol) (ng/mL) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

5.6 METABOLISMO OXIDATIVO

5.6.1 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) da atividade de SOD estão representados na tabela 25. Não foram observados interação tempo*tratamento ($P=0,0886$) e efeito de tratamento ($P=0,2958$); porém houve efeito de tempo ($P< 0,0001$), que está ilustrado no gráfico 25.

Tabela 25 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) da atividade de SOD (U/g de Hb) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos			Probabilidades		
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Tratamento
-45	1301,28	1359,59	1318,49	1326,45 ^C	108,1600	
-30	892,23	974,28	966,73	944,41 ^D	55,3219	
-15	2081,67	2473,61	2311,26	2288,85 ^B	88,4722	
0	1151,91	1075,31	1246,20	1157,81 ^C	44,4286	
7	2348,65	2898,60	3498,77	2915,34 ^A	167,4100	
15	2854,59	2493,37	1983,84	2443,93 ^{BA}	150,8500	
30	2334,12	3356,76	2726,49	2805,79 ^A	179,6600	
Geral	1852,06	2090,22	2007,40	1938,12		0,2956

Tempo: <0,0001

Tempo*trat: 0,0886

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 25 – Valores médios e respectivos erros padrão da média da atividade de SOD (U/g de Hb) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

5.6.2 Atividade da glutathiona peroxidase (GSH-Px)

Na tabela 26 estão apresentados os valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) da atividade da GSH-Px. Não foram observados interação tempo*tratamento ($P=0,0643$) e efeito de tratamento ($P=0,7520$); porém, foi observado efeito de tempo ($P<0,0001$), que está ilustrado no gráfico 26.

Tabela 26 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) da atividade de GSH-Px (U/g de Hb) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos			Probabilidades		
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Tratamento
-45	465172	503408	594822	523113 ^A	36180	
-30	446777	345190	327282	372923 ^B	21867	
-15	632301	555239	621881	589366 ^A	23315	
0	169322	160141	175913	165578 ^C	10109	
7	582561	599718	692159	654021 ^A	54570	
15	616126	563828	558951	641056 ^A	55728	
30	608421	656243	622425	612571 ^A	33668	
Geral	502961	483395	513348	497708		0,7520

Tempo: $<0,0001$

Tempo*trat:0,0643

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7,15 e 30 dias pós-parto.

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 26 – Valores médios e respectivos erros padrão da média da atividade de GSH-Px (U/g de Hb) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

5.6.3 Status antioxidante total (TAS)

Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações séricas de TAS estão apresentados na tabela 27. Não foram observados interação tempo*tratamento ($P=0,7460$) e efeito de tratamento ($P=0,0830$). O efeito de tempo foi observado e é ilustrado no gráfico 27.

Tabela 27 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações séricas de TAS (mmol/L) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos				Probabilidades	
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Tratamento
-45	1,22	1,26	1,21	1,23 ^B	0,0251	
-30	1,28	1,29	1,26	1,28 ^B	0,0158	
-15	1,26	1,29	1,21	1,25 ^B	0,0114	
0	1,22	1,26	1,19	1,22 ^B	0,0193	
7	1,28	1,27	1,21	1,25 ^B	0,0157	
15	1,25	1,32	1,24	1,27 ^B	0,0198	
30	1,41	1,38	1,29	1,36 ^A	0,0187	
Geral	1,27	1,30	1,23	1,27		0,0830

Tempo: < 0,0001

Tempo*trat: 0,7460

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 27 – Valores médios e respectivos erros padrão da média das concentrações séricas de TAS (mmol/L) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

5.6.4 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações séricas de TBARS estão demonstrados na tabela 28. Foi observada interação tempo*tratamento ($P=0,0217$), que também está ilustrada no gráfico 28.

Tabela 28 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações plasmáticas de TBARS (μM) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos			Probabilidades		
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Tratamento
-45	15,4313	10,5581	13,1125	13,0339	1,8267	0,5326
-30	15,5982 ^b	14,1460 ^b	6,8829 ^a	12,2090	0,8952	0,0012
-15	16,7076	10,5550	16,9940	14,7522	1,9853	0,3406
0	9,0648	11,9610	9,4176	10,1478	0,8275	0,2984
7	12,1646	12,9310	6,2560	10,4505	1,4007	0,1234
15	11,6676	10,7640	14,2820	12,2379	1,1749	0,4506
30	21,9096	21,0580	19,4530	20,8069	1,1082	0,6599
Geral	14,6491	13,1390	12,3426	13,4971		0,2752

Tempo: < 0,0001

Tempo*trat: 0,0217

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras minúsculas distintas na linha indicam diferenças entre tratamentos.

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 28 – Valores médios e respectivos erros padrão da média das concentrações plasmáticas de TBARS (μM) no período periparto das ovelhas do grupo controle, das ovelhas suplementadas com as vitaminas D e das ovelhas suplementadas com a vitamina E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

5.6.5 Habilidade de redução do ferro plasmático (HRFP)

Na tabela 29 estão apresentados valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações plasmáticas de HRFP. Não foram observados interação tempo*tratamento ($P=0,7254$) e efeito de tratamento ($P=0,4212$). O efeito de tempo foi observado ($P<0,0001$) e está ilustrado no gráfico 29, por meio dos valores das médias gerais dos tratamentos durante o período experimental.

Tabela 29 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) das concentrações plasmáticas de HRFP ($\mu\text{mol/L}$) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos			Probabilidades		
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Tratamento
-45	42,16	64,33	51,36	52,60 ^E	3,7522	
-30	414,04	402,66	419,06	411,92 ^A	29,6039	
-15	278,07	278,36	296,06	284,69 ^B	11,2866	
0	257,82	225,74	242,94	242,16 ^B	13,3755	
7	245,23	223,18	281,10	249,83 ^B	16,6665	
15	121,24	131,25	147,92	133,47 ^C	6,6917	
30	82,45	80,19	90,24	84,30 ^D	5,7256	
Geral	205,99	200,81	218,48	212,92		0,4212

Tempo: < 0,0001

Tempo*trat: 0,7254

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 29 – Valores médios e respectivos erros padrão da média das concentrações plasmáticas de HRFP ($\mu\text{mol/L}$) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -45, -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7, 15 e 30 dias pós-parto.

5.7 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (TTG)

5.7.1 Área abaixo da curva (AUC) - glicose

A área abaixo da curva (AUC) para a glicose, obtida a partir dos dados gerados durante o teste de tolerância à glicose (TTG), tem seus valores apresentados na tabela 30 e ilustrados no gráfico 30. Não houve efeito do tratamento nessa variável.

Tabela 30 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) da AUC de glicose (mmol/L/minuto) de ovelhas submetidas ao teste de tolerância à glicose (TTG) aos 122 dias de gestação, suplementadas ou não com vitaminas D ou E no 108º de gestação – São Paulo 2018

	Tratamentos			Probabilidades		Tratamento
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	
Média	1084,95	1199,71	1074,31	1121,63	54,478	0,2176
Produtos:0,7175						

Gráfico 30 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) da AUC de glicose (mmol/L/minuto) de ovelhas submetidas ao teste de tolerância à glicose (TTG) aos 122 dias de gestação, do grupo controle ou suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

Nota: Ovelhas submetidas ao teste de tolerância a glicose (TTG) aos 128 dias de gestação ($\pm 3d$) e que receberam veículo oleoso (controle), vitamina D ou vitamina E no 108º dia de gestação.

5.7.2 Área abaixo da curva (AUC) - BHB

A área abaixo da curva para o betahidroxibutirato, obtida a partir dos dados gerados durante o teste de tolerância à glicose (TTG), tem seus valores apresentados na tabela 31 e ilustrados no gráfico 31. Ovelhas que receberam vitamina E apresentaram menores valores médios. Não houve efeito do tratamento para a AUC do BHB no presente estudo ($P=0,7680$).

Tabela 31 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) da AUC de BHB (mmol/L/minuto) de ovelhas submetidas ao teste de tolerância à glicose (TTG) aos 122 dias de gestação, suplementadas ou não com vitaminas D ou E no 108º de gestação – São Paulo 2018

	Tratamentos			Média	EPM	Probabilidades Tratamento
	Controle	Vitamina D	Vitamina E			
Média	52,72	52,00	48,65	51,23	4	0,7680
Produtos: 0,0006						

Gráfico 31 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) da AUC de BHB (mmol/L/minuto) de ovelhas submetidas ao teste de tolerância à glicose (TTG) aos 122 dias de gestação, do grupo controle ou suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

Nota: Ovelhas submetidas ao teste de tolerância a glicose (TTG) aos 128 dias de gestação ($\pm 3d$) e que receberam veículo oleoso (controle), vitamina D ou vitamina E no 108º dia de gestação.

5.7.3 Área abaixo da curva (AUC) - AGNE

A área abaixo da curva para os ácidos graxos não esterificados (AGNE), obtida a partir dos dados gerados durante o teste de tolerância à glicose (TTG), tem seus valores apresentados na tabela 32 e ilustrados no gráfico 32. Não foi observado efeito de tratamento para esse parâmetro ($P=0,7493$).

Tabela 32 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) do AUC de AGNE ($\mu\text{mol/L/minuto}$) de ovelhas submetidas ao teste de tolerância à glicose (TTG) aos 122 dias de gestação, suplementadas ou não com vitaminas D ou E no 108º de gestação – São Paulo 2018

	Tratamentos				Probabilidades Tratamento
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	
Média	86,29	77,37	77,70	80,57	0,7493
Produtos: 0,0005					

Gráfico 32 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) DO AUC de AGNE ($\mu\text{mol/L/minuto}$) de ovelhas submetidas ao teste de tolerância à glicose (TTG) aos 122 dias de gestação, do grupo controle ou suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

Nota: Ovelhas submetidas ao teste de tolerância a glicose (TTG) aos 128 dias de gestação ($\pm 3d$) e que receberam veículo oleoso (controle), vitamina D ou vitamina E no 108º dia de gestação.

5.7.4 Área abaixo da curva (AUC) - insulina

A área abaixo da curva para a insulina, obtida a partir dos dados gerados durante o teste de tolerância à glicose (TTG), tem seus valores apresentados na tabela 33 e ilustrados no gráfico 33. Não houve influência do tratamento sobre essa variável ($P=0,9363$).

Tabela 33 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) do AUC da insulina (uIU/mL/ minuto) de ovelhas submetidas ao teste de tolerância à glicose (TTG) aos 122 dias de gestação, suplementadas ou não com vitaminas D ou E no 108º de gestação – São Paulo 2018

	Tratamentos				EPM	Probabilidades Tratamento
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média		
Média	1379,32	1635,78	1414,92	1480,91	1.477	0,9363
Produtos: 0,6493						

Gráfico 33 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) do AUC da insulina (uIU/mL/ minuto) de ovelhas submetidas ao teste de tolerância à glicose (TTG) aos 122 dias de gestação, do grupo controle ou suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

Nota: Ovelhas submetidas ao teste de tolerância a glicose (TTG) aos 128 dias de gestação ($\pm 3d$) e que receberam veículo oleoso (controle), vitamina D ou vitamina E no 108º dia de gestação.

5.8 AVALIAÇÃO DE ASPECTOS DA IMUNIDADE

5.8.1 Burst oxidativo de neutrófilos (Burst basal)

Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) burst basal de neutrófilos (Unidades Arbitrárias de fluorescência - UAF) estão apresentados na tabela 34. Não foram observados interação tempo*tratamento ($P=0,4327$) e efeito de tratamento ($P=0,1684$); porém foi observado efeito de tempo ($P=0,0008$), ilustrado no gráfico 34.

Tabela 34 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) burst basal de neutrófilos (UAF) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos			Probabilidades		
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Tratamento
-30	39,03	35,97	38,37	37,79 ^B	3,3365	
0	58,38	49,82	57,57	55,26 ^A	3,3365	
30	47,25	48,38	65,27	53,63 ^A	3,3365	
Geral	48,22	44,72	53,73	48,89		0,1684

Tempo: 0,0008

Tempo*trat:0,4327

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -30 (30 dias antes do parto), 0 (até 2 horas após o parto), 30 (30 dias após o parto).

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 34 – Média e erro padrão da média do burst basal de neutrófilos (UAF) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -30 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto) e 30 dias pós-parto

5.8.2 Burst oxidativo de monócitos (burst basal)

Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) do burst oxidativo de monócitos (UAF) estão apresentado na tabela 35. Não foram observados interação tempo*tratamento ($P=0,8716$) e efeito de tratamento ($P=0,6241$); porém foi observado efeito de tempo ($P<0,0001$), ilustrado no gráfico 35.

Tabela 35- Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) do burst oxidativo de monócitos (burst basal) (UAF) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos			Probabilidades		
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Tratamento
-30	35,57	34,52	31,03	33,71 ^B	2,167	
0	62,32	55,47	53,92	57,23 ^A	4,1026	
30	37,02	35,15	37,53	36,57 ^B	1,3438	
Geral	44,97	41,71	40,83	42,50		0,6241

Tempo: $< 0,0001$

Tempo*trat:0,8716

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -30 (30 dias antes do parto), 0 (até 2 horas após o parto), 30 (30 dias após o parto).

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 35 – Valores médios e respectivos erros padrão da média do burst oxidativo de monócitos (burst basal) (UAF) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

5.8.3 Burst oxidativo de neutrófilos com estímulo SaPI

Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) do burst oxidativo de neutrófilos com estímulo SaPI (UAF), estão apresentados na tabela 36. Não foi observada interação tempo*tratamento ($P=0,6503$) e não houve efeito de tratamento ($P=0,9474$); porém foi observado efeito de tempo ($P<0,0001$), que está ilustrado no gráfico 36.

Tabela 36 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) do burst oxidativo de neutrófilos com estímulo SaPI (UAF), no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos			Probabilidades		
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Tratamento
-30	507,83	511,83	497,33	505,67 ^A	38,2489	
0	116,17	117,92	127,18	120,42 ^B	18,276	
30	93,82	72,35	90,52	85,56 ^B	6,9331	
Geral	239,27	234,03	238,34	237,22		0,9474

Tempo: < 0,0001
Tempo*trat:0,6503

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -30 (30 dias antes do parto), 0 (até 2 horas após o parto), 30 (30 dias após o parto).

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -30 (30 dias antes do parto), 0 (até 2 horas após o parto), 30 (30 dias após o parto).

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 37 – Valores médios e respectivos erros padrão da média da burst oxidativo de monócitos com estímulo SaPI (UAF) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -30 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto) e 30 dias pós-parto

5.8.5 Burst oxidativo de neutrófilos com estímulo PMA

Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) do burst oxidativo de neutrófilos com estímulo PMA estão demonstrados na tabela 38. Não foi observada interação tempo*tratamento ($P=0,2151$) e não houve efeito de tratamento ($P=0,5049$); porém foi observado efeito de tempo ($P=0,0051$), como ilustrado no gráfico 38.

Tabela 38 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) do burst oxidativo de neutrófilos com estímulo PMA no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos			Probabilidades		
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Tratamento
-30	983,17	950	1026,5	986,56 ^B	84,8113	
0	1423,5	1108	1420,17	1317,22 ^A	84,8113	
30	1029,83	1250,67	1401,5	1227,33 ^A	84,8113	
Geral	1145,5	1102,89	1282,72	1177,04		0,5049

Tempo: 0,0051

Tempo*trat:0,2151

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -30 (30 dias antes do parto), 0 (até 2 horas após o parto), 30 (30 dias após o parto).

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 38 – Valores médios e respectivos erros padrão da média do burst oxidativo de neutrófilos com estímulo PMA (UAF) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -30 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto) e 30 dias pós-parto

5.8.6 Burst oxidativo de monócitos com estímulo PMA

Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) do burst oxidativo de monócitos com estímulo PMA (UAF) estão demonstrados na tabela 35, e ilustrados no gráfico 39. Não foi observada interação tempo*tratamento ($P=0,2132$) e

não houve efeito de tratamento ($P=0,5049$) e efeito de tempo ($P=0,9439$), como ilustrado no gráfico 39.

Tabela 39 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) burst oxidativo de monócitos com estímulo PMA (UAF) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos			Probabilidades		
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Tratamento
-30	90,55	111,65	85,23	95,81 ^B	5,6989	
0	188,00	152,75	179,33	173,36 ^A	15,4447	
30	95,00	105,35	119,15	106,50 ^B	5,4117	
Geral	124,52	123,25	127,91	125,22		0,9439

Tempo: 0,0003

Tempo*trat: 0,2132

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -30 (30 dias antes do parto), 0 (até 2 horas após o parto), 30 (30 dias após o parto).

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 39 – Valores médios e respectivos erros padrão da média de burst de monócitos com estímulo PMA (UAF) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -30 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto) e 30 dias pós-parto

5.8.7 Percentual da fagocitose de neutrófilos

Valores médios e erros padrão da média (EPM) do percentual de fagocitose de neutrófilos (%) estão apresentados na tabela 40. Não foram observados interação tempo*tratamento ($P=0,3918$) e efeito de tratamento ($P=0,3892$); porém foi observado efeito de tempo ($P=0,0166$), conforme ilustrado no gráfico 40.

Tabela 40 – Valores médios e erros padrão da média (EPM) percentual da fagocitose de neutrófilos (%) no periparto de ovelhas suplementadas ou não ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos			Probabilidades		
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Tratamento
-30	27,45	15,63	18,63	20,57 ^{BA}	2,8532	
0	27,22	28,05	19,90	25,06 ^A	2,7232	
30	17,33	17,12	15,88	16,78 ^B	1,3626	
Geral	24,00	20,27	18,14	20,80		0,3892
Tempo: 0,0166						
Tempo*trat: 0,3918						

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -30 (30 dias antes do parto), 0 (até 2 horas após o parto), 30 (30 dias após o parto).

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 40 - Valores médios e respectivos erros padrão da média do percentual da fagocitose de neutrófilos (%) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -30 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto) e 30 dias pós-parto

5.8.8 Intensidade da fagocitose de neutrófilos

Valores médios e erros padrão da média (EPM) intensidade da fagocitose de neutrófilos (UAF) estão apresentados na tabela 41. Não foram observados interação tempo*tratamento ($P=0,1476$) e efeito de tratamento ($P=0,4181$); porém foi observado efeito de tempo ($P=0,0006$), ilustrado no gráfico 41.

Tabela 41 – Valores médios e erros padrão da média (EPM) da intensidade da fagocitose de neutrófilos (UAF) no periparto de ovelhas suplementadas ou não ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos				Probabilidades	
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Tratamento
-30	11,77	5,90	7,28	8,32 ^B	1,2008	
0	10,18	12,02	6,78	9,66 ^B	1,2008	
30	15,17	15,40	14,75	15,11 ^A	1,2008	
Geral	12,37	11,11	9,61	11,03		0,4181

Tempo: 0,0006

Tempo*trat: 0,1476

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -30 (30 dias antes do parto), 0 (até 2 horas após o parto), 30 (30 dias após o parto).

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 41 - Valores médios e respectivos erros padrão da média da intensidade da fagocitose de neutrófilos (UAF) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -30 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto) e 30 dias pós-parto

5.8.9 Percentual da fagocitose de monócitos

Valores médios e erros padrão da média (EPM) percentual de monócitos fagocitando (%) estão apresentados na tabela 42. Não foi observada interação tempo*tratamento ($P=0,2034$), e não houve efeito de tratamento ($P=0,2907$); porém foi observado efeito de tempo ($P<0,0001$), ilustrado no gráfico 42, por meio das médias gerais dos grupos, durante os momentos 30 dias antes do parto, no parto e 30 dias após o parto.

Tabela 42 – Valores médios e erros padrão da média (EPM) percentual da fagocitose de monócitos (%) no periparto de ovelhas suplementadas ou não ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação a o parto	Tratamentos				Probabilidades	
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Tratamento
-30	7,47	5,80	4,95	6,07 ^B	0,5423	
0	18,83	18,10	13,58	16,84 ^A	1,2784	
30	4,27	5,62	5,20	5,03 ^B	0,6295	
Geral	10,19	9,84	7,91	9,31		0,2907
Tempo: <0,0001						
Tempo*trat:0,2034						

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -30 (30 dias antes do parto), 0 (até 2 horas após o parto), 30 (30 dias após o parto).

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 42 – Valores médios e respectivos erros padrão da média do percentual da fagocitose de monócitos (%) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

5.8.10 Intensidade da fagocitose de monócitos

Na tabela 43 estão apresentados valores médios e erros padrão da média (EPM) da intensidade da fagocitose de monócitos (UAF). Não foi observada interação tempo*tratamento ($P=0,3088$) e não foi observado efeito de tratamento ($P=0,2511$); porém houve efeito de tempo ($P=0,0002$), como ilustrado no gráfico 43.

Tabela 43 – Valores médios e erros padrão da média (EPM) intensidade da fagocitose de monócitos (UAF) no periparto de ovelhas suplementadas ou não ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos			Probabilidades	
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM
-30	5,23	4,37	4,40	4,67 ^A	0,1776
0	4,73	4,72	4,07	4,51 ^A	0,1776
30	3,67	3,80	3,52	3,66 ^B	0,1776
Geral	4,54	4,29	3,99	4,28	0,2511

Tempo: 0,0002

Tempo*trat:0,3088

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -30 (30 dias antes do parto), 0 (até 2 horas após o parto), 30 (30 dias após o parto).

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 43 – Valores médios e respectivos erros padrão da média da intensidade da fagocitose de monócitos (UAF) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -30 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto) e 30 dias pós-parto

5.8.11 CD8

Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) de CD8 estão apresentados na tabela 44. Não foram observados interação tempo*tratamento ($P=0,5683$) e efeito de tratamento ($P=0,5465$). Foi observado efeito de tempo ($P<0,0001$), ilustrado no gráfico 44.

Tabela 44 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) de CD8 (%) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos			Probabilidades		
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Tratamento
-30	16,81	14,43	17,28	16,17 ^B	1,3537	
-15	22,28	18,57	19,93	20,26 ^A	1,3537	
0	19,32	18,33	19,32	18,99 ^{BA}	1,3537	
7	21,42	17,47	19,10	19,33 ^{BA}	1,3537	
30	20,72	15,73	18,22	18,22 ^{BA}	1,3537	
Geral	20,11	16,91	18,77	18,59	1,3537	0,5465

Tempo: $<0,0001$

Tempo*trat: 0,5683

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -30, -15 (30 e 15 dias antes do parto), 0 (até 2 horas após o parto), 7, 30 (7 e 30 dias após o parto).

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 44 – Valores médios e respectivos erros padrão da média de CD8 (%) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7 e 30 dias pós-parto

5.8.12 CD4

Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) de CD4 estão apresentados na tabela 45. Não foram observados interação tempo*tratamento ($P=0,9669$) e efeito de tratamento ($P=0,7867$). Foi observado efeito de tempo ($P<0,0001$), ilustrado no gráfico 45.

Tabela 45 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) de CD4 (%) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos			Probabilidades		
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Tratamento
-30	57,60	60,08	55,88	57,86 ^A	1,7913	
-15	45,92	46,90	45,83	46,22 ^C	1,7774	
0	53,73	54,15	50,28	52,72 ^{BA}	1,7774	
7	46,83	48,27	47,48	47,53 ^{BC}	1,7774	
30	52,22	53,30	51,45	52,32 ^B	1,7774	
Geral	51,26	52,54	50,19	51,17		0,7867

Tempo: <0,0001

Tempo*trat: 0,9669

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -30, -15 (30 e 15 dias antes do parto), 0 (até 2 horas após o parto), 7, 30 (7 e 30 dias após o parto).

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 45 – Valores médios e respectivos erros padrão da média de CD4 (%) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7 e 30 dias pós-parto

5.8.13 Razão CD4/CD8

Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) da razão CD4/CD8 estão apresentados na tabela 46. Não foram observados interação tempo*tratamento ($P=0,5726$ e efeito de tratamento ($P=0,5473$). Foi observado efeito de tempo ($P<0,0001$), ilustrado no gráfico 46.

Tabela 46 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) da razão CD4/CD8 (%) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos			Probabilidades		
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Tratamento
-30	0,26	0,22	0,27	0,25 ^B	0,02108	
-15	0,35	0,29	0,31	0,32 ^A	0,02108	
0	0,30	0,29	0,30	0,30 ^{BA}	0,02108	
7	0,33	0,27	0,30	0,30 ^{BA}	0,02108	
30	0,32	0,25	0,28	0,28 ^{BA}	0,02108	
Geral	0,31	0,26	0,29			0,5473

Tempo: <0,0001

Tempo*trat: 0,5726

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -30, -15 (30 e 15 dias antes do parto), 0 (até 2 horas após o parto), 7, 30 (7 e 30 dias após o parto).

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 46 – Valores médios e respectivos erros padrão da média da razão CD4/CD8 (%) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7 e 30 dias pós-parto

5.8.14 CD16⁻ CD14⁺

A tabela 47 mostra os valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) de CD16⁻ e CD14⁺. Houve interação tempo*tratamento (P=0,0248), ilustrada no gráfico 47.

Tabela 47 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) de CD16⁻ e CD14⁺ (%) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos			Probabilidades		
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Tratamento
-30	0,98 ^b	2,04 ^a	1,00 ^b	1,34	0,1452	0,0136
-15	1,14	1,33	1,31	1,26	0,1875	0,9027
0	0,83	0,38	0,81	0,67	0,0831	0,0902
7	0,78	0,57	0,68	0,68	0,0798	0,5578
30	0,77	0,91	0,57	0,75	0,0734	0,1980
Geral	0,90	1,04	0,87	0,94		0,0983

Tempo: 0,0011

Tempo*trat:0,0248

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas:letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferença entre os tratamentos;

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 47 – Valores médios e respectivos erros padrão da média de CD16- e CD14+ (%) no período periparto das ovelhas do grupo controle, do grupo tratado com vitamina D e das tratadas com vitamina E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7 e 30 dias pós-parto

5.8.15 CD16 + CD14 +

Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) de CD16+ e CD14+ estão apresentados na tabela 48. Não foram observados interação tempo*tratamento ($P=0,9256$) e efeito de tratamento ($P=0,5065$). Foi observado efeito de tempo ($P=0,0002$), ilustrado, por meio das médias dos grupos, no gráfico 48.

Tabela 48 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) de CD16+ e CD14 + (%) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos			Probabilidades		
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Tratamento
-30	3,65	3,43	3,16	3,41 ^C	0,3702	
-15	5,64	5,19	5,43	5,42 ^A	0,3702	
0	3,94	3,22	3,27	3,48 ^{BC}	0,3702	
7	3,93	4,19	3,86	3,99 ^{BC}	0,3702	
30	5,58	4,93	3,91	4,81 ^{BA}	0,3702	
Geral	4,55	4,19	3,92	4,22		0,5065
Tempo: 0,0002						
Tempo*trat: 0,9256						

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -30, -15 (30 e 15 dias antes do parto), 0 (até 2 horas após o parto), 7, 30 (7 e 30 dias após o parto).

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 48 – Valores médios e respectivos erros padrão da média de CD16+ e CD14+ (%) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7 e 30 dias pós-parto

5.8.16 CD16 + CD14 -

Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) de CD16 + e CD14- estão apresentados na tabela 49 e gráfico 49. Não foi observada interação tempo*tratamento ($P=0,9904$) e não houve efeito de tratamento ($P=0,7442$); porém foi observado efeito de tempo ($P< 0,0001$).

Tabela 49 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) de CD16+ e CD14- (%) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos			Probabilidades		
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Tratamento
-30	11,72	8,52	11,15	10,46 ^C	1,1340	
-15	35,52	34,88	33,65	34,68 ^B	2,4327	
0	34,47	30,08	34,72	33,09 ^B	2,6441	
7	40,90	44,32	44,42	43,21 ^{BA}	2,4031	
30	47,22	43,77	45,52	45,50 ^A	2,1093	
Geral	33,96	32,31	33,81	33,39		0,7442

Tempo: $< 0,0001$

Tempo*trat: 0,9904

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -30, -15 (30 e 15 dias antes do parto), 0 (até 2 horas após o parto), 7, 30 (7 e 30 dias após o parto).

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 49 - Valores médios e respectivos erros padrão da média de CD16+ e CD14- (%) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7 e 30 dias pós-parto

5.8.17 CD206

Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) de CD206 estão apresentados na tabela 50. Não foram observados interação tempo*tratamento ($P=0,9212$) e efeito de tratamento ($P=0,9542$); porém houve efeito de tempo ($P<0,0001$), ilustrado no gráfico 50.

Tabela 50 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) de CD206 (%) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos			Probabilidades		
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Tratamento
-30	2,59	2,27	2,83	2,56 ^C	0,3775	
-15	6,62	7,50	6,61	6,91 ^{BA}	0,3574	
0	9,09	8,95	8,14	8,73 ^A	0,9232	
7	5,18	5,45	4,85	5,16 ^B	0,5092	
30	5,31	4,59	5,68	5,19 ^{BA}	0,3762	
Geral	5,76	5,75	5,62	5,67		0,9542

Tempo: < 0,0001

Tempo*trat: 0,9212

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -30, -15 (30 e 15 dias antes do parto), 0 (até 2 horas após o parto), 7, 30 (7 e 30 dias após o parto).

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 50 - Valores médios e respectivos erros padrão da média de CD206 (%) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7 e 30 dias pós-parto

5.8.18 WC1

Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) de WC1 estão apresentados na tabela 51. Não foram observados interação tempo*tratamento ($P=0,3717$) e efeito de tratamento ($P=0,2761$); porém houve efeito de tempo ($P<0,0001$), mostrado no gráfico 51, por meio das médias gerais dos tratamentos.

Tabela 51 - Valores médios e respectivos erros padrão da média (EPM) de WC1 (%) no periparto de ovelhas suplementadas ou não com vitaminas D ou E no pré-parto – São Paulo 2018

Dias em relação ao parto	Tratamentos			Probabilidades		
	Controle	Vitamina D	Vitamina E	Média	EPM	Tratamento
-30	0,11	0,10	0,11	0,11 ^C	0,01796	
-15	0,51	0,58	0,85	0,64 ^A	0,07687	
0	0,33	0,51	0,68	0,51 ^{BA}	0,07595	
7	0,25	0,50	0,36	0,37 ^B	0,06569	
30	0,47	0,54	0,59	0,54 ^{BA}	0,07926	
Geral	0,33	0,44	0,52	0,43		0,2761

Tempo: $<0,0001$

Tempo*trat: 0,3717

Fonte: (Nascimento, 2018)

Notas: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças nos momentos experimentais -30, -15 (30 e 15 dias antes do parto), 0 (até 2 horas após o parto), 7, 30 (7 e 30 dias após o parto).

TRATAMENTO= efeito principal de tratamento

TEMPO= efeito principal de tempo

TEMPO*TRAT= interação entre o tratamento e o tempo

Gráfico 51 - Valores médios e respectivos erros padrão da média de WC1 (%) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

* -30, -15 dias antes do parto, 0 (até 2 horas após o parto), 7 e 30 dias pós-parto

5.10 RELAÇÕES ENTRE VARIÁVEIS

5.10.1 Relação entre vitamina D e vitamina E

A relação entre a vitamina D e vitamina E ($P < 0.0001$) foi positiva e de média intensidade ($r = 0,347$), está demonstrada no gráfico 52.

Gráfico 52 - Relação entre a determinação de vitamina D e vitamina E (ng/dL) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

5.10.2 Relação entre colesterol e TAS

A relação entre colesterol e TAS, foi positiva, de média intensidade ($r=0,384$) e significativa ($P=0,000$), como mostra o gráfico 53.

Gráfico 53 – Relação entre a concentração sérica de colesterol (mmol/L) e TAS (mmol/L) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

5.10.3 Relação entre HRFP e vitamina E

A relação entre HRFP e vitamina E foi de média intensidade ($r=0,542$) e significativa ($P=0,000$), como mostra o gráfico 54.

Gráfico 54 - Relação entre a concentração de HRFP ($\mu\text{mol/L}$) e vitamina E (ng/dL) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

5.10.4 Relação entre burst basal de monócitos e HRFP

A relação entre burst basal de monócitos e HRFP ($P=0,000$) foi positiva e de alta intensidade ($r=0,815$), está demonstrada no gráfico 55.

Gráfico 55 - Relação entre burst basal de monócitos (UAF) e HRFP ($\mu\text{mol/L}$) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

5.10.5 Relação entre burst basal de monócitos e vitamina E

A relação entre burst basal de monócitos e vitamina E ($P=0,041$) foi positiva e de média intensidade ($r=0,389$) e está apresentada no gráfico 56.

Gráfico 56 - Relação entre burst basal de monócitos (UAF) e vitamina E (ng/dL) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

5.10.6 Relação entre burst oxidativo de monócito com estímulo de PMA e HRFP

A relação entre burst oxidativo de monócitos com estímulo PMA e HRFP, demonstrada no gráfico 57, foi positiva e de alta intensidade.

Gráfico 57 - Relação entre burst oxidativo de monócitos com estímulo PMA (UAF) e HRFP ($\mu\text{mol/L}$) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

5.10.7 Relação entre percentagem de fagocitose de monócitos e HRFP

A relação entre o percentual de fagocitose de monócitos e HRFP ($P=0,000$), foi positiva e de alta intensidade, como mostra o gráfico 58.

Gráfico 58 - Relação entre percentual de fagocitose de monócitos (%) e HRFP ($\mu\text{mol/L}$) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

5.10.8 Relação entre o percentual de fagocitose de monócitos e vitamina E

A relação entre percentual de fagocitose de monócitos e a concentração de vitamina E ($P=0,016$), foi positiva e de média intensidade ($r=0,451$), como mostra o gráfico 59.

Gráfico 59 - Relação entre percentual de fagocitose de monócitos (%) e vitamina E (ng/dL) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

5.10.9 Relação entre a intensidade de fagocitose de neutrófilos e GSH-Px

A relação entre a intensidade de fagocitose de neutrófilos (UAF) e a atividade de GSH-Px ($P=0,016$), foi de média intensidade e positiva, como mostra o gráfico 60.

Gráfico 60 - Relação entre intensidade de fagocitose de neutrófilos (UAF) e GSH-Px (U/g de Hb) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

5.10.10 Relação entre a intensidade de fagocitose de neutrófilos e SOD

A relação entre a intensidade de fagocitose de neutrófilos (UAF) e a atividade de SOD (U/g de Hb) ($P=0,01$), foi positiva e de média intensidade como mostra o gráfico 61.

Gráfico 61 - Relação entre intensidade de fagocitose de neutrófilos (UAF) e SOD (U/g de Hb) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

5.10.11 Relação entre a intensidade de fagocitose de neutrófilos e TBARS

A relação entre a intensidade de fagocitose de neutrófilos (UAF) e TBARS (μM) foi significativa ($P=0,05$), positiva e de média intensidade ($r=0,513$) como mostra o gráfico 62.

Gráfico 62 - Relação entre intensidade de fagocitose de neutrófilos (UAF) e TBARS (μM) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

5.10.12 Relação entre CD16+CD14- e SOD

Relação entre CD16+CD14- (%) e a atividade de SOD (U/g de Hb) ($P=0,05$), foi positiva e de média intensidade como mostra o gráfico 63.

Gráfico 63 - Relação entre CD16+CD14- (%) e a atividade de SOD (U/g de Hb) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

5.10.13 Relação entre CD16+CD14- e GSH-Px

Relação entre CD16+CD14- (%) e a atividade de GSH-Px (U/g de Hb) ($P=0,02$), foi positiva e de média intensidade como mostra o gráfico 64.

Gráfico 64 - Relação entre CD16+CD14- (%) e a atividade de GSH-Px (U/g de Hb) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

5.10.14 Relação entre CD16+CD14+ e TBARS

Relação entre CD16+CD14+ (%) e TBARS (μM) ($P=0,019$), foi positiva e de média intensidade ($r=0,308$) e significativa ($P=0,019$), como mostra o gráfico 65.

Gráfico 65 - Relação entre CD16+CD14+ (%) e TBARS (μM) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

5.10.15 Relação entre CD16-CD14+ e HRFP

Relação entre CD16-CD14+ (%) e HRFP ($\mu\text{mol/L}$) ($P=0,000$), foi positiva e de média intensidade ($r=0,443$) como mostra o gráfico 66.

Gráfico 66 - Relação entre CD16-CD14+ (%) e HRFP ($\mu\text{mol/L}$) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

5.10.16 Relação entre GSH-Px e Temperatura

Relação entre GSH-Px (U/g de Hb) e temperatura (T°C), foi significativa ($P=0,002$), negativa e de baixa intensidade ($r=-0,229$) como mostra o gráfico 67.

Gráfico 67 - Relação Relação entre GSH-Px (U/g de Hb) e temperatura (T°C) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

5.10.17 Relação entre TAS e Temperatura

Relação entre TAS (mmol/L) e temperatura (T°C), foi significativa ($P=0,000$), negativa e de baixa intensidade ($r=-0,268$) como mostra o gráfico 68.

Gráfico 68 - Relação Relação entre TAS (mmol/L) e temperatura (T°C) no período periparto das ovelhas do grupo controle e das suplementadas com as vitaminas D ou E no 108º dia de gestação – São Paulo 2018

6 DISCUSSÃO

As ovelhas utilizadas no presente estudo iniciaram o período de gestação com escore de condição corporal médio de 3,5 (escala de 0 a 5,0) e, ao entrarem no período experimental, isto é, aos 45 dias antes do parto, o escore de condição corporal médio foi para 3,0. Nessas condições nenhuma ovelha manifestou qualquer problema de saúde, todas se mantiveram híginas durante todo o período.

Das variáveis estudadas, o colesterol, que apresentou efeito principal de tempo e de tratamento; e as concentrações de vitamina D, TBARS e porcentagem de CD16- e CD14+, que apresentaram interação entre tempo e tratamento foram influenciadas pela aplicação das vitaminas, porém as demais variáveis estudadas, com exceção às derivadas do teste de tolerância à glicose, apresentaram apenas efeito principal de tempo, isto é, foram influenciadas pelos dias em relação ao parto.

Em relação às vitaminas utilizadas, as determinações de seus metabólitos, isto é alfa tocoferol e 25 hidroxicolecalciferol, foram realizadas em todos os momentos experimentais e em todas as ovelhas que entraram no presente estudo. Não foram identificados artigos que utilizassem ovelhas gestantes e que recebessem única aplicação de doses elevadas de vitamina E, sob a forma de acetato de α -tocóferol; e/ou de Vitamina D, como, colecalciferol, verificando os efeitos dos mesmos no período periparto. A escolha da utilização do veículo oleoso para as ovelhas do grupo controle se deu para que fosse observado exclusivamente o efeito das vitaminas e não houvesse dúvida quanto a qualquer possível efeito de interferência decorrente da utilização de um veículo oleoso. As formulações vitamínicas aqui utilizadas foram desenvolvidas, sob encomenda, por laboratório especializado e o produto, não comercial, teve suas concentrações confirmadas pelas análises realizadas em paralelo com as das ovelhas. Para minimizar as diferenças de volume final decorrentes das diferenças de concentração entre as duas formulações vitamínicas, optou-se por ajustar os volumes dos grupos vitamina D e controle de acordo com o volume final obtido para a dose de vitamina E, já que essa formulação não conseguia ser estável em concentrações maiores.

Estudos com uma das duas vitaminas aqui utilizadas foram realizados em ovelhas, variando a via de administração, a concentração e a dose. Nieto et al., 2016; D ϕ NNEM et al., 2015; Daniels et al., 2000; Anugu et al., 2013; Ochoa et al., 1992; Kott

et al., 1998; Hatfield et al., 2002; Chauhan et al., 2016, são autores que trabalharam com a vitamina E. Em relação à vitamina D, estudos anteriores foram realizados em ovinos (SMITH et al., 1985; ABBAS et al., 1987; HIDIROGLOU et al., 1989; PAULSON et al., 1990), porém em humanos há tendência para maior número de artigos mais recentes publicados com a suplementação dessa vitamina (BOUCHER, 2011; MOZAFFARI et al., 2012; MITRI & PITTAS, 2014).

As concentrações de 25 hidroxicolecalciferol analisadas permitiram que se observasse a interação entre tratamento e tempo, onde ficou evidente que as ovelhas suplementadas tiveram suas concentrações plasmáticas maiores que as demais a partir da aplicação, permanecendo essas concentrações mais elevadas nesse grupo por pelo menos dez semanas do parto. Hidiroglou et al (1984) utilizando elevadas doses de vitamina D3 em ovelhas (até 5×10^6 por ovelha), também observaram aumento dos teores de 25 hidroxicolecalciferol plasmático já a partir de 24 horas da administração intramuscular. Utilizamos doses que variaram entre 3,0 a 5,3 milhões de UI, dependendo do peso da ovelha, já que nosso objetivo foi administrar de acordo com o peso vivo da ovelha (70.000 UI/kg de peso vivo), de qualquer forma, Hidiroglou et al (1984), também observaram que os teores plasmáticos aumentados de 25 hidroxicolecalciferol permaneceram até o final do período experimental, isto é, até 22 dias da aplicação da vitamina.

Quanto às concentrações de α -tocoferol observadas no presente estudo, essas aumentaram, após 15 dias da aplicação nos três grupos experimentais, evidenciando que esse efeito plasmático observado não foi dependente do tratamento utilizado. Poder-se-ia considerar que houvesse problema com a quantidade de alfatocoferol nos produtos utilizados, porém, a análise realizada dos teores de alfa tocoferol tanto no veículo, como na solução oleosa contendo vitamina D, mostrou teores desprezíveis, apenas foram encontradas concentrações de 450 mg/mL no produto contendo vitamina E.

Curioso foi a relação encontrada entre as concentrações plasmáticas de vitamina D e as de vitamina E ($P < 0,0001$; $r = 0,347$), indicando que os teores plasmáticos de vitamina D (25 OH coleciferol) influenciam os teores plasmáticos de vitamina E (alfa tocoferol), apenas um artigo foi encontrado relacionando os efeitos dessas vitaminas, onde foi observado que em ratos deficientes em vitamina E, apesar de não haver diferença nas concentrações de 25 hidroxicolecalciferol, houve redução de 40% na concentração da forma ativa 1,25 dihidroxicolecalciferol e também houve

redução em 39% na atividade da D3 hidroxilase hepática e tendência a diminuir em 22% a D3 hidroxilase renal, sugerindo que a deficiência na vitamina E, inibe o metabolismo da vitamina D no fígado e nos rins com menores concentrações dos metabólitos ativos e redução das concentrações do complexo de receptor-hormônio nos tecidos alvo (SERGEEV et al., 1990). Devido à falta de artigos que abordem essa relação metabólica entre as duas vitaminas, fica difícil fazer inferências apenas considerando as concentrações plasmáticas da 25 hidroxicolecalciferol e de alfatocoferol. Hidiroglou et al. (1991) observaram que ovinos que receberam 20, 40 ou 60 mg/kg de acetato de alfa tocoferol pela via intramuscular, tiveram, após lag time de até 3 horas, pico de concentrações plasmáticas de alfatocoferol por sete dias, mantendo um platô por pelo menos 15 dias de concentrações mais elevadas que as anteriores, porém menores do que as do pico. Esses autores mostraram também que não existe relação simples entre as concentrações plasmáticas e os estoques hepáticos de vitamina E, e que há boa estocagem hepática após a administração pela via intramuscular dessa vitamina. Ressaltaram também que os mecanismos que controlam os teores plasmáticos de alfa tocoferol são diferentes daqueles que controlam os estoques hepáticos.

Assim, podemos inferir que esse aparente aumento da concentração de alfa tocoferol, observado nos três grupos, independentemente da suplementação, está vinculado ao equilíbrio oxidativo que ocorre no período periparto, já que houve correlação entre as concentrações de HRFP e vitamina E de média intensidade ($r=0,542$), bem como efeito de tempo para o HRFP, que foi maior aos 30 dias antes do parto, e ainda houve a interação de tratamento e tempo para o TBARS evidenciando, aos 30 dias antes do parto, menor concentração de TBARS para as ovelhas que receberam vitamina E em relação às demais. Essa relação da vitamina E com o HRFP confirma o já observado por Nascimento et al. (2015) em estudo realizado com ovelhas suplementadas com duas doses de vitamina E entre 1 e 7 dias antes o parto (P1) e entre 15 e 25 dias antes do parto (P2), em que as concentrações de HRFP foram maiores uma e duas semanas após o parto, respectivamente.

Esses resultados observados de vitamina E plasmática, HRFP e TBARS mostram que as ovelhas tratadas com elevadas doses de vitamina E produziram menor quantidade de TBARS, indicador da produção de substâncias oxidantes, muito provavelmente devido à vitamina E estar em outros tecidos. O TBARS é usado como marcador de estresse oxidativo (ZIEGLER-HEITBROCK et al., 2014). Estudos

demonstraram o aumento das EROs no período periparto de ovelhas (RIZZO et al., 2008) e vacas (LIU, et al., 2016; KONVIČNÁ et al., 2015; CASTILLO et al., 2005). Em se tratando de animais de produção, em que o parto é um evento de grande importância, devemos considerar o processo inflamatório agudo em que o útero e o colo do útero passam por reorganizações estruturais e funcionais profundas, incluindo danos nos tecidos (RIZZO et al., 2008). Assim, o processo de inflamação aguda é acompanhado da geração de grandes quantidades de citocinas, levando ao aumento da produção de ROS que, em excesso, ocasionam estresse oxidativo (RIZZO et al., 2008).

Além dessa melhor resposta observada para as ovelhas suplementadas com a vitamina E, foi observada tendência para as ovelhas suplementadas com vitamina D apresentarem melhor status antioxidante total ($P=0,083$), confirmando o que Wiseman (1993) já comentava sobre o papel dessa vitamina como antioxidante. Em revisão sobre o assunto, Mokhtari et al (2016) atribuem a ação antioxidante da vitamina D na indução da expressão de moléculas relacionadas às defesas antioxidantes como a GSH, a GSH-Px e a SOD; e também por suprimir a expressão da NADPH oxidase. Porém, no presente estudo a mensuração das atividades da GSH-Px e da SOD não foram influenciadas pela suplementação com essa vitamina,

Devido ao efeito do parto, e à maior produção de substâncias oxidativas do período periparto, os marcadores do metabolismo oxidativo, mais especificamente os que mensuram atividades antioxidantes como a SOD, GSH-Px e TAS apresentaram efeito de tempo e tiveram, de maneira geral, o mesmo comportamento, isto é, os três tiveram seus valores reduzidos por ocasião do parto, muito provavelmente pela maior demanda por substâncias antioxidantes nesse momento. As enzimas SOD e GSH-Px representam o primeiro grupo de antioxidantes enzimáticos, e são a principal forma de defesa antioxidante intracelular (CELI, 2010). Apesar dessa menor atividade das enzimas no momento do parto, normalmente o sistema antioxidante manifesta atividade, isto é, suas enzimas estão com atividade aumentada, para combater o estresse oxidativo (BARBOSA et al., 2010), o que deve ser mensurado por marcadores de oxidação, como os TBARs.

Essa maior atividade metabólica e, portanto, do metabolismo oxidativo, pode ser percebida também ao analisarmos os dados de temperatura retal das ovelhas. A temperatura tem influência direta no metabolismo (GILLOOLY et al., 2001; PÖRTNER et al., 2006), desempenha papel na cinética enzimática (RAO &

BULLOCK, 1954) aumentando a demanda de oxigênio (FRY E HART, 1946) e atividade respiratória (CLARKE, 2004; GILLOOLY et al., 2006), como observado no presente estudo com a relação negativa e significativa da temperatura retal no TAS e atividade de GSH-Px ($r=-0,268$; $P=0,000$; $r=-0,229$; $P=0,002$, respectivamente).

Apesar da redução temperatura corporal ser considerada, há bom tempo, um dos sinalizadores do parto tanto para vacas quanto para ovelhas, no estudo de Nabenishi & Yamazaki (2017), foi observado que, três horas antes do parto essa temperatura volta a subir. Os resultados da temperatura, nos permitiram além de monitorar a higidez das ovelhas, pois ficaram dentro dos valores considerados fisiológicos para a espécie (entre 39,0 e 40°C; Brion, 1964), observar maiores valores no pós-parto imediato e na lactação, o que está de acordo com o observado em relação à maior atividade metabólica.

A suplementação vitamínica, em especial a suplementação com elevadas doses de vitamina D3 não interferiu nas concentrações de cálcio ionizável ou cálcio total, que só foram influenciados pelo parto. A intensa atividade metabólica do período também objetiva a manutenção das concentrações de cálcio, principalmente no período puerperal, em função da colostrogênese e lactogênese, que predispõem ao quadro de hipocalcemia (GONZÁLEZ & SILVA, 2006; BRONDANI et al., 2016). Esse fato foi observado no presente estudo, apesar do cálcio total ter diferido apenas nos extremos do período experimental, ao analisarmos o cálcio ionizável, que é o disponível para a síntese de leite, notamos que 15 dias antes do parto houve, independente do tratamento, menor concentração sérica desse cátion, o que pode ser coincidente com a colostrogênese, conforme proposto anteriormente. Hidiroglou et al (1984) que observaram aumento no teor de cálcio total após 48 horas da administração de elevadas doses de vitamina D (5×10^6 UI/ovino), porém, após esse período os teores de cálcio voltaram aos basais. No presente estudo, não foi realizada coleta de sangue e análise tão próxima à administração das vitaminas, e, portanto, não fomos capazes de identificar esse possível efeito do tratamento nas concentrações de cálcio.

Outras variáveis que apresentaram influência do parto e não da aplicação das vitaminas foram ureia, creatinina, ácido úrico, AST, GGT, albumina e proteína total. As enzimas hepáticas GGT e AST, normalmente são usadas para monitorar a função hepática em ruminantes (ARAÚJO, 2010; THRALL et al., 2015). Os valores de GGT permaneceram dentro dos valores de referência de 20 a 52 U/L à 30°C (KANEKO et

al., 2008) até o parto. Após o parto, a atividade dessa enzima ficou acima dos valores considerados fisiológicos para todas as ovelhas, independente do tratamento utilizado. Resultados semelhantes de aumento da atividade da GGT para valores acima dos de referência no pós-parto também foram observados por Hadeef et al (2014), que relacionaram esse aumento à infiltração de gordura hepática (HADEF et al.; RYAN et al., 2014), decorrente da mobilização mais intensa das reservas de gordura corporal; conforme observado no presente estudo. Nosso estudo foi iniciado no pré-parto e podemos afirmar que a mobilização de reservas corporais foi mais importante no período de lactação, conforme evidenciado pelo comportamento das concentrações de AGNE, betahidroxibutirato e também pelo ECC durante o período experimental (JAKSON & WINKLER 1969, SARGISON et al. 1994, KANEKO et al. 2008; SANTOS et al., 2011).

Com relação à AST, apesar desta enzima permanecer com os valores dentro da amplitude considerada normal para a espécie ovina, de 60 a 280 U/L à 30°C (KANEKO et al., 2008), maior atividade de AST foi observada a partir de 7 dias pós-parto, que provavelmente a relaciona com a mobilização de reservas proteicas, isto é, massa magra, que ocorreu também no pós-parto e foi observada por outros autores (ANTUNOVIC et al., 2011; HADEF et al., 2014). Descarta-se a possibilidade de aumento de AST relacionado à maior atividade muscular em função das contrações uterinas no momento do parto, pois no pós-parto imediato, isto é, no momento zero, foi identificado aumento da atividade da CK, sinalizando o trabalho da musculatura para o parto e a AST só veio a aumentar uma semana após esse momento. A atividade da enzima CK, apresentou-se abaixo dos valores de referência durante todo o período experimental (100-546 U/L à 30°C; KANEKO et al., 1997; KANEKO et al., 2008), não sendo identificados fatores que justificassem esse comportamento em ovinos, porém em revisão sobre o assunto em bovinos, Braun et al, (1995) consideram que para animais adultos normais, isto é sem lesão na musculatura esquelética, onde se concentra a atividade desta enzima, que também está presente no miocárdio, intestino e cérebro, atividade da CK é menor que 100 UI/L.

Essa mobilização de reservas, em especial a de tecido muscular, também pode ser confirmada ao analisarmos os dados da creatinina, que tiveram seus valores diminuídos no pós-parto. A creatinina é uma substância nitrogenada não proteica, que tem origem no metabolismo da creatina e fosfocreatina, tem importante papel na musculatura, seus teores aumentam quando há massa muscular desenvolvida, pode

ainda sofrer influência, de alguns fatores, dentre os quais a idade, pois em recém-nascidos, as concentrações normalmente são mais altas (KANEKO et al., 2008). Em condições de perda de massa muscular a creatinina pode apresentar suas concentrações diminuídas, como observado em vacas em lactogênese para obtenção de aminoácidos mobilizados dos músculos esqueléticos, podendo haver contribuição da involução uterina (BLUM et al., 1985; BELL et al., 1997). No presente estudo, os teores de creatinina encontrados estavam abaixo dos valores considerados de referência para a espécie que, de acordo com Dubreuil, Arsenault e Bélanger, (2005) entre 75 e 113 $\mu\text{mol/L}$ e, de acordo com Kaneko et al. (2008) de 106 a 168 $\mu\text{mol/L}$. Estudos utilizando ovelhas Santa Inês sadias no período periparto também encontraram valores de creatinina abaixo dos considerados referência pelos autores acima citados e próximos aos encontrados no presente estudo, indicando que poder-se-ia realizar estudo mais específico com esse objetivo para adequar essa amplitude de referência (ARAÚJO, 2010; NASCIMENTO et al., 2015).

Espera-se que antes do parto ocorra redução dos teores de proteínas devido a transferência de imunoglobulinas para o colostro (BARCELOS et al., 2000; NASCIMENTO, 2012) e no final da gestação para síntese de proteínas fetais, como observado por Antunovic et al. (2002). Apesar da evidente utilização das reservas tanto de gordura quanto de proteína por parte das ovelhas, principalmente durante a lactogênese, as concentrações de proteína total e albumina permaneceram, durante todo o experimento dentro dos valores de referência para a espécie, isto é, entre 60 e 79g/L e 24-30 g/L (KANEKO et al, 2008), respectivamente. A concentração de albumina é influenciada pelo status proteico em longo prazo (WITTEWER et al., 1993; GRESSLER et al., 2015; BRONDANI et al., 2016), que pode refletir, apesar do controle homeostático bem mais estreito, em baixas concentrações de proteínas totais, (BRITO et al., 2006; BRONDANI et al., 2016, HADEF et al, 2016). Mudanças significativas nas concentrações de albumina podem ser observadas em períodos superiores à 30 dias de restrição protéica, devido sua baixa velocidade de renovação. Outro marcador do status proteico, porém à curto prazo, é a ureia, que pode estar reduzida quando há diminuição no consumo alimentar ou mínima mobilização de reservas (BRONDANI et al., 2016). A diminuição da proteína total pode ser atribuída, no presente estudo à redução das concentrações de albumina já que as duas tiveram comportamentos bem semelhantes, muito provavelmente refletindo maior demanda por fontes proteicas, especialmente para o início da lactogênese (CALDEIRA et al,

2007; ANTUNOVIC et al., 2011, BRONDANI et al, 2016), o que pode ser bem percebido também pelo comportamento da ureia, que ainda permanece com teores mais baixos em relação ao início do estudo, até duas semanas do pós-parto.

Aos 30 dias antes do parto, as concentrações de ureia estão diminuídas em relação às do início do período experimental, sendo que quando há redução sensível dos teores de albumina e proteína total, isto é, 15 dias antes do parto, as concentrações séricas de ureia são as menores de todo o período. Apesar desses menores valores, os teores de ureia séricos permaneceram dentro dos valores de referência para ovinos, entre 4-10 mmol/L (CALDEIRA et al., 2007; Brondani et al., 2016), durante todo o período experimental, indicando que as ovelhas, apesar de mobilizarem suas reservas, não chegaram a desenvolver quadro de subnutrição no período pré-parto (CALDEIRA et al, 2007; HADEF et al, 2016). Pode-se garantir por esse marcador, apesar da mobilização das reservas, que as ovelhas dispunham de alimentação balanceada em relação à energia e proteína, já que maior concentração de ureia em ovelhas em lactação pode ser o resultado da proteína muscular catabolizada quando grandes reservas corpóreas são mobilizadas, como observado na relação do ECC e peso corporal de estudo em ovelhas (ANTUNOVIC et al., 2011). Concentrações de ureia aumentadas são mais frequentemente encontradas quando a dieta é deficiente em energia ou quando há excesso de proteína na dieta e, neste caso, o acúmulo excede a capacidade de armazenamento (ANDREWS et al., 1997), apesar de poderem estar aumentadas em fêmeas subnutridas devido ao catabolismo de compostos nitrogenados, como observado acima.

Ainda sobre o metabolismo proteico, temos as análises de ácido úrico, que também tem ação antioxidante, já que sua ação como preditor do estresse oxidativo e no desenvolvimento de obesidade, hipertensão e doenças cardiovasculares tem sido investigada (GLANTZOUNIS et al., 2005; SAUTIN & JOHNSON, 2008; KERASIOTI et al., 2016). Glantzounis et al. (2005), atribuem aumento das concentrações de ácido úrico como uma tentativa de resposta protetora, devido as evidências de sua atuação como um antioxidante plasmático ou ainda como pró-oxidante, quando intracelular. Sua participação no metabolismo oxidativo ocorre quando, em ambiente oxidativo, a xantina oxidase converte a hipoxantina em ácido úrico e radicais superóxidos, que serão reduzidos pela ação da SOD a peróxido de hidrogênio e O_2 (KANEKO et al, 2008). Apesar de no presente estudo as concentrações de ácido úrico terem aumentado após o parto, independente do tratamento utilizado, apontando para

melhora na capacidade antioxidante gradativa, não foram observadas correlações das concentrações de ácido úrico com a atividade de SOD, GSH-Px, TAS, HRFP e TBARS e, portanto, seu aumento provavelmente está mais relacionado ao seu envolvimento com o metabolismo proteico em função da redução de reservas musculares das ovelhas, embora se saiba que sua importância nesse metabolismo seja muito mais evidente nas aves para sinalizar o início do consumo da utilização das reservas protéicas com o avançar de um quadro de deficiência energética (KANEKO et al., 2008).

No final da gestação e início da lactação, a maioria dos tecidos maternos passam por adaptações que, de acordo com taxas de lipogênese e lipólise no tecido adiposo, são exemplos de controles homeorréticos importantes da partição de nutrientes fundamentais para suprir as exigências da glândula mamária para a síntese do leite (BAUMAN et al., 1980; HOLTENIUS et al., 2007; CELI et al., 2010; ; TREVISI et al., 2012; LEBLANC, 2012; JALILIAN et al., 2016). Durante a gestação, o número de fetos impõe às ovelhas gestantes aumento de demanda metabólica, que normalmente está relacionado à intensidade do balanço energético negativo (PUGH, 2005; DUEHLMEIER et al., 2011; JALILIAN et al., 2016). A diminuição dos triglicerídeos na lactação precoce são consistentes com o aumento da demanda de energia e do balanço energético negativo que foram mais importantes no período de lactação (KARAPEHLIVAN et al. 2007; ANTUNOVIC et al., 2011). De acordo com Aitken (2007) os valores de referência para triglicerídeos em ovinos estão entre 0,1998 a 0,9991 mmol/L. Como os triglicerídeos são utilizados como fonte de energia metabólica celular, acumulam-se no tecido adiposo, seu principal local de metabolismo endógeno nos ruminantes, de onde são mobilizados em resposta às demandas energéticas corpóreas (BELL et al., 1981; DRACKLEY et al., 2001; Sato et al., 2004; GRESSLER et al., 2015). Apesar da diminuição observada para os teores de triglicerídeos a partir do momento do parto, em todos os momentos do presente estudo, estes ficaram dentro dos valores considerados fisiológicos para a espécie, demonstrando que não houve intensa mobilização, já seus teores aumentados estão relacionados à lipidose hepática por intenso acúmulo de triacilglicéreis (RUKKW AMSUK et al., 1999).

Mecanismos de mobilização de energia podem se alterar em consequência da redução do consumo na gestação (RODRIGUES et al., 2007; NASCIMENTO, 2012; BRONDANI et al., 2016). Em situações de excessiva mobilização de gordura

corporal em ruminantes de alta produção com déficit energéticos importantes, há diminuição das concentrações de glicose e aumento das concentrações de BHB e AGNE (GONZÁLEZ & SILVA, 2003; SILVA et al., 2013; ARAÚJO et al., 2014; SUCUPIRA, 2015). Em vacas leiteiras com alta mobilização de reservas lipídicas, e, portanto, em BEN, principalmente nas primeiras semanas pós-parto, devido à lactação, o acetoacetato, produzido normalmente no metabolismo dos ácidos graxos, não consegue ser metabolizado na velocidade necessária, sofrendo redução à β -hidroxibutirato (BHB) ou sendo descarboxilado até acetona em condições de desequilíbrio energético (INGVARTSEN et al., 2003; RICCÓ, 2004; CAMPOS, 2007; RODRIGUES et al., 2007).

O BHB reflete o grau de terminação do processo de oxidação da gordura no fígado (LEBLANC, 2012). Concentrações plasmáticas de BHB acima de 1,6 mmol/L indicam desnutrição, ou intensa mobilização de reservas de gordura e ovelhas em quadro de toxemia da prenhez usualmente apresentam concentrações plasmáticas de BHB superiores à 3,0 mmol/L (DUEHLMEIER et al., 2011). Neste estudo, os valores médios de BHB ficaram relativamente baixos, ao redor de 0,42 mmol/L, nos três grupos e, apesar das concentrações estarem dentro dos valores de referência para a espécie, os animais estavam em BEN, conforme observado pela redução no ECC e outros parâmetros já discutidos. Lotfollahzadeh et al. (2016), em estudo realizado com ovelhas Afshari hípidas gestantes e não gestantes, observaram concentrações de BHB de $0,61 \pm 0,3$ em ovelhas gestantes e $0,39 \pm 0,3$ (mmol/L) em ovelhas vazias. Raoofi et al. (2013) observaram em ovelhas em gestação única concentrações médias de BHB de $0,51 \pm 0,3$ e múltipla $0,89 \pm 0,3$ (mmol/L), sendo que os valores encontrados pelos autores para ovelhas em gestação única são semelhantes aos valores encontrados para as concentrações desse metabólito que no presente estudo que aumentaram durante a lactação. Ressalta-se que no presente estudo as ovelhas foram “blocadas” também em relação ao número de fetos, determinado por meio de exame ultrassonográfico, sendo que no grupo controle havia 4 gestações únicas, 4 duplas e 2 triplas; no grupo que recebeu vitamina D havia 3 gestações únicas, 7 duplas e 0 triplas. E no grupo que tratado com vitamina E havia 4 gestações únicas, 4 duplas e 2 triplas. No presente estudo, as concentrações de BHB aumentaram durante a lactação, confirmando o fato de que a lactogênese imprimiu maior intensidade de BEN em relação ao final da gestação, independente do

tratamento; e que esse BEN foi de pequena magnitude por ter mantido os teores de BHB dentro dos considerados fisiológicos para o período e espécie.

Junto com o BHB, um importante marcador da mobilização de reservas corporais é o AGNE que, apesar de não ter sido influenciado pelo tratamento, ilustrou a mobilização das reservas de gordura das ovelhas no presente estudo, pois suas concentrações aumentaram progressivamente no pré-parto tendendo a baixar apenas após 30 dias da lactação. No início da lactação, devido à baixa concentração plasmática de insulina e menor utilização de glicose decorrente da baixa resposta do tecido adiposo à insulina, ocorre supressão da lipogênese (VERNON & TAYLOR, 1988). Devido ao BEN, considerando a via gliconeogênica, e a consequente mobilização de reservas corporais da fêmea no periparto, há elevação de AGNE, mobilizado do tecido adiposo por ação de lipases, e, em resposta a esta condição são transportados ao fígado onde são oxidados formando corpos cetônicos (KANEKO et al., 2008; SARGISON et al., 1994; JAKSON & WINKLER, 1969). À medida que a gestação dos ovinos avança, as concentrações maternas de insulina diminuem e as concentrações de AGNE aumentam (REGNAULT et al, 2004). As concentrações de AGNE demonstram a magnitude da mobilização dos depósitos (LEBLANC, 2012). No presente estudo, ovelhas apresentaram ampla variação, entre 158,05 a 1009,64 ($\mu\text{mol/L}$), com média geral das concentrações plasmáticas de AGNEs de 382,25 ($\mu\text{mol/L}$), diferente do observado por Araújo et al., (2014), sendo 270,04 ($\mu\text{mol/L}$) e 275,72($\mu\text{mol/L}$), em ovelhas com 1 e 2 ou mais fetos respectivamente, apontando para maior magnitude de mobilização de reservas das ovelhas utilizadas no presente estudo. Silva et al. (2013), estudou ovelhas no periparto, e também observaram efeito de tempo para essa variável considerada sinalizadora da mobilização de reservas energéticas. A tendência ($P=0,0799$) observada na interação de tratamento*tempo, nos permite sugerir que as ovelhas suplementadas com vitamina D tiveram menores concentrações de AGNE e, principalmente no momento do parto, em relação às ovelhas dos demais grupos,

Para suprir as necessidades energéticas e proteicas há redução do escore da condição corporal (ECC) e do peso corporal (RODRIGUES et al., 2006), como observado nas ovelhas do presente estudo. Pois apesar de híidas, apresentaram ECC médio de 2,29. O ECC é um método simples e rápido de estimar a quantidade de reservas corpóreas e pode auxiliar a prever o status nutricional (LEBLANC,

2012). Sugere-se para o terço final da gestação ECC entre 3,0 e 3,5; e no parto 3,5 (Smith e Sherman,1994) diferente do observado no momento do parto no presente estudo, pois o ECC médio foi 2,2. No desmame, que se deu aos 30 dias pós-parto, encontrou-se ECC de 1,58, também abaixo do sugerido, entre 2,0 (SMITH & SHERMAN,1994) e 2,5 (SMITH & SHERMAN,1994; SUSIN et al., 1996). Todos em escala de 0 a 5 (SMITH & SHERMAN; 1994). Aita et al., 2012, ao estudar ovelhas no periparto criadas extensivamente, observaram maior número de ovelhas em gestação única com escores de condição corporal antes do parto e ao desmame entre 1,0 e 1,5, principalmente ao desmame, o que pode ser explicado pelo sistema de criação extensivo com pouca disponibilidade de forragem durante a gestação e lactação. Antonovic et al (2011) observaram escores de $3,10 \pm 0,74$ em ovelhas gestantes; de $2,48 \pm 0,65$ nas lactentes; e de $2,86 \pm 0,38$ nas vazias. As reservas corporais de proteína e energia começam a ser mobilizadas quando o consumo de nutrientes é inferior às necessidades de manutenção (OETZEL, 1988; SUCUPIRA, 2003). De acordo com Caldeira et al (2007) e Whitney et al (2009) ovelhas com ECC inferior podem apresentar maior concentração de ureia, o que não foi observado no presente estudo, conforme previamente discutido. Interessante estudo realizado com suplementação diária com 360UI de α -tocopherol ou placebo, 6- 7 semanas antes do parto de ovelhas observou que quando essas fêmeas suplementadas que apresentavam baixo ECC, considerado em escala de 1 (magra) a 5 (obesa), houve maior índice de natalidade do que as ovelhas com ECC médio ou alto ($P = 0,001$). Os resultados desse estudo indicaram que a suplementação diminui a taxa de mortalidade de ovelhas com ≥ 3 cordeiros (DØNNEM, et al., 2015). Em estudo realizado com ovelhas suplementadas com 1,450mg/kg ou 330UI de acetato de DL alfa-tocoferol/dia três semanas antes do parto, não foram observados efeitos sobre peso e ECC (KOTT et al., 1998; REDDEN et al., 2010). Nieto et al. (2016), utilizando produto contendo 27,2 UI mg de α -tocopherol em aplicações semanais de 4UI/kg de PV, a partir dos 50 dias antes do parto e 60 dias após o parto, observaram que o peso médio das ovelhas diminuiu de $74,6 \pm 2,4$ para $58,1 \pm 2,2$ kg, e que embora essa variação seja esperada no pós-parto, a perda de peso de ovelhas foi ligeiramente menor para as fêmeas que receberam vitamina E.

Interessante foi o comportamento do colesterol que foi influenciado pelo tratamento e pelo tempo, sem interação entre os dois. Ovelhas tratadas com a vitamina E apresentaram menores teores de colesterol que as ovelhas controle e que

as tratadas com a vitamina D. Com exceção do último momento experimental, isto é, 30 dias após o parto, nos demais momentos os valores de colesterol ficaram entre os valores considerados fisiológicos para a espécie de 1,35 e 1,97 mmol/L (KANEKO et al, 2008). De maneira geral o colesterol reflete o consumo de energia por parte do animal (GONZÁLEZ et al., 2000; PRADHAN et al., 2008; ARAÚJO, 2010; ANTUNOVIC et al., 2011), e foi observado que, as concentrações de colesterol foram diminuindo, atingindo menores valores uma semana após o parto o que mostra que realmente os animais estavam consumindo menor quantidade de energia do que suas respectivas demandas e que, de alguma forma, esse comportamento foi mais intenso para as ovelhas suplementadas com a vitamina E. Resultados semelhantes foram observados por Kaseki et al (1986) que trabalharam com ratos deficientes e com status normal de vitamina E e os suplementaram, via oral, com dose única de 66UI/kg de vitamina E. Esses autores observaram redução de colesterol plasmático nos dois grupos de ratos tratados, porém a intensidade de redução foi maior no grupo deficiente, e atribuíram essa redução ao fato da suplementação ter ativado mais a 7- α -hidroxilase, enzima taxa limitante envolvida na síntese de ácidos biliares e que tem atividade reduzida nos animais deficientes em vitamina E. Apesar dos autores só reconhecerem redução dos teores de colesterol para o grupo deficiente e após 12 horas da suplementação, após 48 horas os teores de colesterol ainda estavam mais baixos, em relação ao momento basal, para os dois grupos suplementados.

O comportamento do colesterol com concentrações menores no final da gestação e aumentando durante a lactação é um padrão já observado em bovinos (DUNCAN & GARTON, 1963; HARTMAN & LASCELLES, 1965; KWEON et al, 1986 ANDREF et al, 1987; HERDT & SMITH, 1996). Esse comportamento é atribuído às mudanças que ocorrem no ciclo da lactação, principalmente decorrentes da redução das concentrações de lipoproteínas séricas e, já foi constatado que tanto as concentrações de vitamina E como as de colesterol variam nos estágios de lactação, conforme padrão observado (WEISS et al, 1992; HERDT & SMITH, 1996). Por não trabalharem com vacas suplementadas, Herdt & Smith (1996) atribuíram as mudanças nas concentrações de vitamina E às observadas para as concentrações de colesterol e sugerem que as variações das concentrações desta vitamina, associadas ao estágio da lactação, estão atreladas às mudanças nas concentrações de lipoproteínas séricas, mas concordam que a suplementação parenteral ou oral com essa vitamina pode alterar a concentração sérica ou plasmática da mesma

independente de interferir nas concentrações das lipoproteínas séricas. No presente estudo, foi observada relação significativa ($P=0,0146$), de baixa intensidade ($r=0,174$), entre as concentrações plasmáticas de vitamina E e as concentrações séricas de colesterol total provavelmente pelo fato da vitamina E ser um composto solúvel em gordura que depende de lipoproteínas para o seu transporte em plasma, como observado em humanos (YOSHIDA et al., 1997; TRABER et al., 2000; ILLISON et al., 2011). Ao fazermos separadamente a correlação entre o colesterol e os teores plasmáticos de alfatocoferol, somente foi observada relação para as ovelhas suplementadas com a vitamina D ($r=0,288$; $P=0,021$). Esse acontecimento pode ser decorrente dos fatos da vitamina D também ser lipossolúvel e, no presente estudo, seus teores permaneceram mais elevados no grupo suplementado, bem como devido à influência dos teores plasmáticos de vitamina D (25 OH colecalciferol) sobre teores plasmáticos de vitamina E (alfa tocoferol), mencionado anteriormente ($P<0,0001$; $r=0,347$). A relação entre vitamina E e colesterol para os grupos controle ($P=0,326$) e de ovelhas suplementadas com vitamina E ($P=0,487$) não foi significativa.

Sabe-se que as lipoproteínas plasmáticas de baixa densidade (LDL) contêm grande quantidade de vitamina E e que o LDL entra nas células através do mecanismo controlado por receptor específico (KÖKOĞLU et al., 1991). Os efeitos da vitamina E em aumentar a resistência à oxidação ou reduzir a oxidação de LDL foram observados em humanos (DIEBER-ROTHENEDER et al, 1991; PRINCEN et al, 1995) e têm importância nos estudos da prevenção da aterosclerose. Para ruminantes, não há estudos que objetivem esses resultados, porém já se sabe que a concentração da vitamina E é relativamente homogênea entre as lipoproteínas, sendo maior na HDL, por essa ser a proteína de maior presença nos bovinos (HERDT & SMITH, 1996).

O cortisol, bem como a insulina também não foram influenciados pelo tratamento, apresentando influência unicamente do tempo em relação ao parto, quando os dois hormônios tiveram suas concentrações elevadas. Apesar de ser utilizado como indicador de estresse, o cortisol, tem importante participação na sinalização do momento do parto e devido seu potente efeito glicogênico, normalmente determina um pico glicêmico, conforme observado no presente estudo (SWENSON; REECE, 1996; BEERDA et al, 2004; CAMPOS et al., 2009). O declínio das concentrações de cortisol no final da gestação e início da lactação foi observado em ovelhas por diversos autores (CAMPOS et al., 2009; FORD et al., 1990). Já Araújo et al. (2014) embora tenham observado hiperglicemia em coletas realizadas até 6

horas após o parto de ovelhas, não encontraram aumento nas concentrações de cortisol, provavelmente relacionados ao tempo de coleta após o parto, pois esse hormônio tem vida média de 60 minutos ou menos (KANEKO et al, 2008), o que pode ter contribuído para os autores não terem identificado o pico de cortisol sinalizador do parto.

A mensuração de cortisol pode ser realizada a partir de tecidos e fluidos, como cabelo, urina, fezes e leite (BERTULAT et al., 2013), todos apresentam vantagens e limitações. No entanto, para vacas em lactação, o leite pode ser o material biológico de primeira escolha, pela praticidade de manipulação de animais, portanto, é completamente compatível com as recomendações de bem-estar animal (SGORLON et al., 2015; BURNETT et al., 2015). A mensuração de cortisol pode ser um indicador útil de respostas a estressores agudos que atuam até 2h antes da coleta de amostras, como observado em vacas em lactação (VERBEK et al., 1998). Foi observado por outros autores, concentrações de cortisol aumentadas em vacas no parto (LIMA, 2013; AURICH et al., 1993; HUDSON et al., 1975) e reduzidas um dia após o parto em cabras (KHAN & LUDRI; 2002). Negrão & Marnet (2006), observaram que as vacas com maior rendimento leiteiro apresentavam maiores teores de cortisol plasmático. Wise et al. (1988) encontraram concentrações plasmáticas de cortisol mais elevadas em vacas em condições de estresse térmico comparadas às mantidas em ambientes refrigerados (JUNIOR et al, 2003). Essas concentrações aumentadas de cortisol podem interferir na resposta imune, inibindo a resposta inflamatória, afetando a resposta de células T, diminuindo a migração de neutrófilos (GONZÁLEZ & SILVA, 2003). Esse fato já foi observado em vacas, onde se encontrou relação entre elevadas concentrações de cortisol com a supressão imune (HORST & JORGENSEN, 1982). A capacidade de resposta imune pode ser comprometida em condições de estresse crônico (MATTERI et al, 2000), assim como observado por Giesecke et al., 1985, que relacionaram o estresse crônico como causa de variações na produção e composição do leite em vacas, incluindo a contagem de células somáticas. Ovelhas com baixas concentrações de cortisol apresentaram maior produção de leite e menor contagem de células somáticas que ovelhas com altas concentrações de cortisol, reforçando a relação com a resposta imune (CAROPRESE et al, 2010). Christison & Johnson (1972) encontraram concentrações plasmáticas significativamente mais baixas de cortisol, quando comparadas ao grupo de vacas em ambientes termoneutro. Como observado nos

diversos estudos mencionados, as concentrações de cortisol podem refletir condições estressoras, porém, suas concentrações no sangue e leite podem sofrer influências de fatores genéticos, ambientais, além de respostas individuais (VERBEEK et al., 2012; SGORLON et al., 2015), assim suas respostas não podem isoladamente indicar de forma categórica a condição de estresse. Além de sua atuação no complexo estresse x sistema imunológico x inflamação (AMADORI, 2009), o cortisol, que é glicocorticóide, em conjunto com as catecolaminas provocam alterações metabólicas visando mobilizar e fornecer energia para o organismo, através da lipólise, da glicogenólise e da degradação de proteínas, dando subsídios para a homeostase e ativando a glicogenólise no líquido extra-celular e a glicogênese e gliconeogênese no fígado, inibindo a insulina e estimulando o glucagon (GONZÁLEZ & SILVA, 2003). A regulação do eixo HPA é estabelecida pelo *feedback* negativo dos glicocorticóides, que atuam no hipotálamo, inibindo a liberação de CRH (hormônio liberador de corticotrofina), e na adenohipófise, inibindo a secreção de ACTH (DICKSON, 1996; McFarlane et al (1995), assim promove maior aporte de glicose para o organismo, principalmente para as células cerebrais (GONZÁLEZ & SILVA, 2003).

Portanto, o aumento das concentrações de glicose no parto pode ser devido ao aumento das concentrações de glucagon e glicocorticóides que promovem a depleção dos estoques de glicogênio hepático (CAMPOS et al., 2009, GRUMMER, 1995), mas, no presente estudo foi claramente relacionado ao aumento dos teores de cortisol, hormônio considerado estimulante da gliconeogênese, em decorrência do estresse do parto (GRESSLER, et al., 2015). As concentrações plasmáticas de glicose permaneceram estáveis para todas as ovelhas e só subiram no momento do parto, reduzindo suas concentrações logo após, conforme já observado por outros autores (KUNZ et al. 1985; VASQUEZ-ANON et al., 1994; ANTUNOVIC et al., 2011; ARAÚJO et al, 2014).

Havia certa expectativa de que a suplementação com a vitamina D interferisse, de alguma forma na glicemia, já que já foi evidenciada relação inversa entre o status de vitamina D e a prevalência de diabetes em humanos (MITRI & PITTAS, 2014). No presente estudo, ao se fazer a relação entre as concentrações de glicose e vitamina D, com os dados de todas as ovelhas, não foi identificada correlação entre essas variáveis ($P=0,3032$), porém ao se trabalhar a relação separadamente para cada grupo se observou que apesar da relação permanecer inexistente para as ovelhas do grupo controle ($P=0,221$), houve tendência para

relação das ovelhas suplementadas com vitamina D ($P=0,066$) e relação para as ovelhas suplementadas com a vitamina E ($P=0,010$ e $r=0,329$). Essa tendência para as ovelhas suplementadas com a vitamina D pode estar relacionada a relação positiva e de média intensidade encontrada para as concentrações de vitamina D e vitamina E ($P<0,0001$; $r=0,347$).

A resistência insulínica observada em humanos e animais de laboratório no final da gestação também ocorre em ruminantes (PATTERSON et al, 1993; PATTERSON et al. 1994). Para ruminantes, a importância deste mecanismo é maior quando os animais recebem dietas com altos teores de energia; apresentam elevada adiposidade, isto é, possuem ECC superior ou igual a 3,5 no pré-parto; e possuem maiores concentrações séricas de insulina, com consequente resistência a ação deste hormônio nos tecidos periféricos (SCHIMITT et al., 2012; KERESTES et al., 2009; ROCHE et al., 2009; BEEVER, 2006). Portanto, a habilidade reduzida da atuação da insulina na lipogênese, facilita a mobilização de gordura durante o final da gestação (BELL, 1995). As concentrações de insulina plasmática diminuem no período final da gestação e no início da lactação em vacas leiteiras, com picos agudos no dia do parto (KUNZ et al., 1985). Porém, no presente estudo, apesar no pico glicêmico no parto, e pico insulinêmico no mesmo momento, talvez em função das ovelhas terem entrado no período periparto com ECC moderado e assim não mobilizarem reservas de gordura de forma expressiva, essa foi gradativa, notado pelas concentrações de AGNE que aumentaram de forma moderada, concordando com De Koster e Opsomer (2013), que acreditam que a capacidade de secreção de insulina pelo pâncreas é influenciada pelas concentrações de AGNE em vacas com aptidão para a produção de leite. Apesar de não ter ficado evidente a ocorrência da resistência insulínica no presente estudo e devido ao fato do aumento das concentrações plasmáticas de AGNE estar relacionado com o desenvolvimento de um estado de resistência insulínica, através da supressão da resposta da glicose e estímulo da liberação de insulina (REGNAULT, 2004), poder-se-ia inferir que as ovelhas tratadas com vitamina D, por terem apresentado tendência ($P=0,0799$) a menores teores de AGNES no momento do parto apresentaram maior sensibilidade insulínica em relação às demais ovelhas do estudo. Porém, como esses animais estavam com ECC moderado, esse efeito não pôde ser melhor evidenciado, assim, acredita-se que estudos com a suplementação dessa vitamina devam ser realizados em ovelhas com ECC elevado

para se observar se de fato há interferência desta vitamina no quadro de sensibilidade insulínica.

Para avaliar a sensibilidade insulínica, no presente estudo, realizou-se o teste de tolerância à glicose, como descrito por Ford et al. (2009). O teste empregado, com administração IV de glicose foi considerado capaz de demonstrar efeitos da sensibilidade insulínica em ovelhas (SHORTEN, et al., 2016). Outra forma de se estimar a sensibilidade à insulina pode ser obtida conforme sugerido por Balogh et al. (2008) e Rabasa-Lhoret et al. (2003), pelo cálculo do índice de verificação de sensibilidade quantitativa da insulina (RQUICKI) adaptado da medicina humana e já utilizado em bovinos por Holtenius e Holtenius (2007) para a rápida estimativa da sensibilidade à insulina. A adição à equação da concentração plasmática basal de BHB foi sugerida obtendo-se assim o conhecido RQUICKI BHB. A inclusão do BHB se justifica, pois, para a obtenção desse índice há necessidade de jejum para manter a relação insulina glicose desse período e, como nos ruminantes o jejum não é possível, já que o rúmen representa um grande reservatório de alimento para longos períodos de jejum, a inclusão do BHB minimiza esse fato (BALOGH et al., 2008). No presente estudo, a inclusão dessa variável realmente melhorou a acuidade da fórmula, já que foi possível notar a diferença entre os momentos para a variável RQUICKI BHB o que não foi possível com a RQUICKI sem a inclusão do betahidroxibutirato. Menores valores desse índice estão relacionados à resistência insulínica ou menor sensibilidade à insulina (RABASA-LHORET et al., 2003). Apesar de não ser observada diferença entre os tratamentos referente à sensibilidade insulínica, talvez essa pudesse ser evidenciada se as ovelhas tivessem com ECC igual ou superior a 3,5, em escala de 1 a 5, durante o período periparto, havendo, portanto, necessidade de mais estudos observando essas condições para que se realmente se confirme essa possibilidade, já que no momento do parto foram observados menores valores para RQUICK BHB o que concorda com o observado em relação ao aumento do AGNE, insulina, glicose.

Da análise da área sob a curva AUC (área under the curve), obtida por meio do TTG, não foi possível evidenciar diferença entre os grupos, experimentais, já que esse teste foi realizado no momento onde se tem maior frequência da ocorrência distúrbios do metabolismo energético na ovelha, isto é, ao redor do 130º dia de gestação (ARAÚJO, 2010). Porém, foi possível identificar efeito de produto sobre os resultados de AUC BHB ($P=0,0006$) e AUC AGNE ($P=0,0005$), o que significa que há

interferência do número de fetos no teste de tolerância à glicose, apesar das ovelhas terem sido distribuídas em blocos quanto ao tipo de gestação (única ou gemelar). Quanto maior a relação feto:ovelha, maior será a demanda e energética e, portanto maior será a mobilização de reservas, o que pode ser melhor interpretado ao associarmos os resultados do AUC de BHB e AGNE ao ECC no momento do teste (entre -15 e 0). Akbari et al. (2015) sugeriram modelo experimental com ovelhas para avaliar a patogênese das condições associadas ao aumento da mobilização lipídica e a resistência insulínica, a partir da indução do quadro com infusão intravenosa de emulsão lipídica que elevou as concentrações de AGNE. Contudo, a análise dos índices HOMA, RQUICKI e RQUICKI-BHB, que também mostraram diferenças significativas em vacas (BALOGH et al., 2008; GUYOT et al. 2017), não podem ser diretamente comparados com interpretações de resultados em seres humanos, onde RQUICKI é avaliado durante condições de jejum, pois em ruminantes, como observado em vacas leiteiras lactantes apresentam há um estado metabólico diferente (hipoinsulinemia, hipoglicemia) em comparação com pacientes diabéticos humanos (hiperinsulinemia, hiperglicemia). Resultados também poderão ser influenciados quando os animais se encontram em condição de estresse, resultando em hiperglicemia, e aumento de AGNE (GUYOT et al., 2017).

Estudos realizados sobre resistência insulínica com ovelhas durante a gestação e lactação demonstraram diminuição da sensibilidade e da capacidade de resposta da absorção de glicose estimulada por insulina nos músculos esqueléticos quando comparadas com ovelhas vazias (VERNON et al., 1990; VERNON & TAYLOR, 1988; PETTERSON et al., 1993). Vacas de leite no início da lactação comparadas a vacas secas mostraram sinalização de insulina reduzida (fosforilação de tirosina IRS-1) no tecido adiposo (JI et al., 2012), assim como vacas de média produção (KERESTES et al., 2009). Debras et al. (1989), utilizando clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico em cabras, observaram, durante o início da lactação, meio da lactação e período seco; redução da capacidade de resposta da absorção de glicose estimulada por insulina, apenas no início da lactação. Em se tratando de períodos gestacionais, utiliza-se o teste de tolerância à glicose (TTG) com maior frequência (SCHMIDT et al., 1999; GELONEZE et al., 2006), método simples, e com baixo risco de efeitos colaterais como hipoglicemia, porém tem como desvantagem a impossibilidade de ser realizado em indivíduos com diabetes tipo 1 ou mesmo tipo 2; e que apresentem deficiência intensa na produção de insulina (GELONEZE et al.,

2006), já que a própria sobrecarga de glicose pode induzir supressão na produção hepática de glicose em diferentes graus, bem como induzir sua própria metabolização (WAJCHENBERG et al., 1999; GELONEZE et al., 2006); portanto não houve impedientes para a realização desse teste no presente estudo, já que trabalhamos com ovelhas híbridas.

Duehlmeier et al. (2013) avaliaram a sensibilidade à insulina em ovelhas gestantes aproximadamente 15 dias antes do parto, diferente do realizado no presente estudo, em que o TTG foi realizado aos 28 dias do parto; os autores trabalharam com diferentes riscos de TP, estabelecidos de acordo com fatores predisponentes, como idade, raça e condições nutricionais, e realizaram TTG com administração IV de glicose aos $10,6 \pm 2,3$ dias antes do parto no grupo de alto risco (RH), $15,3 \pm 4,5$ dias antes do parto no grupo de ovelhas de baixo risco (LR) e $4,6 \pm 1,5$ dias antes do parto para o grupo de ovelhas com toxemia (TP), observaram que os hormônios da gestação (progesterona, cortisol, estrógenos e prolactina) estavam em concentrações semelhantes nos três grupos experimentais e contribuem para a resistência insulínica. Nesse sentido parece que as alterações nos teores de progesterona, estrógenos e cortisol circulantes, no periparto, contribuem também para redução substancial da função imune, especialmente de neutrófilos (LEBLANC, 2012). Esses hormônios proporcionam a principal resposta imunitária do útero, a imunidade inata e a migração de neutrófilos aliada à atividade fagocitária e oxidativa que está associada ao risco de retenção de placenta (RP) metrite e endometrite (DOHOO & MARTIN, 1984; KREMMER et al. 1993).

A competência do sistema imune é deprimida durante o período periparto (KEHRLI et al., 1989). As causas para a redução da função imune não são bem conhecidas, mas deve haver envolvimento do balanço energético negativo e ou do balanço proteico nesse processo (KREMER et al., 1993; GOFF, 1999; ESPOSITO et al., 2014; BOUVIER-MULLER et al., 2016).

Na avaliação dos aspectos da imunidade, em relação à geração de EROs, os neutrófilos e monócitos só foram influenciados pelo momento do parto, lembrando que para essas análises o material analisado foi de 30 dias pré e pós-parto e no dia do parto. A resposta dos neutrófilos e dos monócitos estimulados com SaPI foi semelhante, isto é, foi menor no momento do parto e assim permaneceu até 30 dias após, indicando menor resposta frente a estímulo de bactéria Gram positiva. Curioso é que a intensidade de fagocitose apresentou comportamento oposto entre esses dois

grupos de células, aumentando apenas após 30 dias do parto para os neutrófilos e diminuindo nesse período para os monócitos. Porém, ao analisarmos a porcentagem de fagocitose desses grupos celulares, foi observado maior número de neutrófilos fagocitando no momento do parto em relação ao período pós-parto e um pico de monócitos fagocitando no momento do parto. Essa resposta em pico para os monócitos também foi observada em relação à produção de EROs sem estímulo e estimulados com PMA. Quanto aos neutrófilos, estes também apresentaram burst oxidativo basal e burst oxidativo por estímulo PMA aumentado no parto, porém esses permaneceram aumentados aos 30 dias pós esse período. Portanto, com exceção do burst oxidativo com estímulo SaPI e a intensidade de fagocitose de neutrófilos, observamos maiores respostas no momento do parto para os demais parâmetros nos dois grupos celulares. Os monócitos e os neutrófilos tem importante papel no momento do parto (BARDOU et al., 2014) e o período pós-parto é mais suscetível a infecções devido menor resposta imune (POMEROY et al., 2018; LEBLANC et al., 2010). Devido ao potencial efeito benéfico dessas vitaminas na melhora da resposta imune, em esperava-se que a suplementação melhorasse a resposta das ovelhas suplementadas, especialmente com vitamina E (MORGANTE et al, 1999; HATFIELD et al., 2000; DONNEM et al., 2015), porém a diferença entre esses autores e o presente trabalho está no fato da menor intensidade da mobilização das reservas de gordura, pois Bouvier-Muller et al. (2016) observou interferência dos AGNE, quanto maior esse metabólito menor a resposta. Já Daniels et al. (2000), ao estudarem o efeito da suplementação oral 400UI de vitamina E/dia na resposta imune de 52 ovelhas, um mês antes do parto e desafiadas imunologicamente com vacina contra parainfluenza, observaram que embora a suplementação tenha aumentado a concentração sérica de vitamina E no cordeiro, avaliado 3 dias após o nascimento, não influenciou a imunidade humoral na ovelha ou a imunidade passiva do cordeiro. Assim como no presente estudo, as concentrações de vitamina E aumentaram, porém não houve efeito do tratamento sobre a fagocitose, ou qualquer outro parâmetro vinculado à produção de ERO por monócitos e neutrófilos.

A vitamina D tem se mostrado necessária na regulação das respostas imune inata e adaptativa em humanos (NELSON et al., 2012; LANG et al., 2013). Há aumento da necessidade de vitamina D durante a gestação, o que pode estar associado ao aumento da capacidade de controlar infecções, bem como limitar processos inflamatórios, e assim contribuir para melhorar a sobrevivência de cordeiro

(LOCKWOOD et al., 2016), já que a vitamina D é transferida via placenta para o feto (KOVACS 2008; LAPILLONNE, 2010). Pesquisa sobre os efeitos da vitamina D e a gravidade da mastite induzida experimentalmente em gado leiteiro forneceu evidências *in vivo* de mecanismo intracrino de via de sinalização de vitamina D em macrófagos e demonstrou o potencial de vitamina D para reduzir a gravidade da infecção bacteriana na glândula mamária bovina (NELSON et al., 2012) e ovina (LOCKWOOD et al., 2016).

Apesar de estudos apontarem melhora da resposta imune em ovelhas e/ou cordeiros suplementados com vitamina D, Lockwood et al. (2016), suplementaram ovelhas com duas doses de 1×10^6 UI de colecalciferol intramuscular no final da gestação com objetivo de melhorar a resposta imune inata de cordeiros, devido seu papel como regulador do sistema imunológico (Lang et al., 2013) e, ao avaliarem a função imune, a partir da capacidade de fagocitose de monócitos e PMNs e da análise de imunoglobulinas-G e anticorpos de toxidóide tetânico após o nascimento, observaram que não houve aumento da competência imune de cordeiros à suplementação materna de vitamina D e atribuíram à incapacidade de resposta do sistema imunológico. Nesse sentido, apesar de estudos indicarem a melhora da vitamina E e/ou da vitamina D na resposta celular, não houve efeito das vitaminas sobre o percentual de intensidade de neutrófilos e monócitos nas condições do presente estudo, muito provavelmente pelas ovelhas não terem sofrido desafio metabólico importante que exigisse vantagem ou benefício da suplementação.

Foi demonstrada que a capacidade fagocítica de monócitos foi significativamente diminuída em vacas que desenvolveram endometrite nos primeiros 20 dias pós-parto (BRODZKI et al., 2014). Porém, ainda não está elucidado se a composição de subconjuntos ou uma função individual de monócitos possa interferir na suscetibilidade à doenças. Nos seres humanos, no entanto, demonstrou-se que existem associações entre condições inflamatórias e composição do subconjunto de monócitos (BALBOA et al., 2015). Características funcionais distintas foram relatados para os diferentes subconjuntos em resposta ao LPS, que na circulação incita monócitos e macrófagos, manifestando resposta imunológica através de ações no sistema nervoso central através da ativação do eixo hipotálamo – pituitário – adrenal, que através da liberação de hormônios demonstram a situação de estresse (Henrique, 2015), e na presença de quimiocinas, a curto prazo (3h) induziu uma resposta de citocinas pró-inflamatória mais forte em subconjuntos de CD14 + (cM (clássicos) e

intM (intermediários)) em comparação com o CD14-ncM (não-clássicos) (HUSSEN et al., 2013), e uma resposta pró-inflamatória mais forte em geral após estimulação prolongada de LPS (18 h) (CORRIPIO-MIYAR et al., 2015).

A administração de complexo vitamínico ADE em ovelhas híidas 10 dias antes do parto, não interferiu no metabolismo energético e oxidativo, porém proporcionou melhora do *status* antioxidante dos leucócitos polimorfonucleares não estimulados (burst basal) ou estimulados pela LPS (SUCUPIRA, 2015). No presente estudo não foram observados efeitos diretos sobre os estímulos testados, PMA e SaPI, porém ao analisarmos os dados de relação entre as variáveis, foi observada relação entre burst basal de monócitos e HRFP ($P < 0,0001$; $r = 0,815$); burst oxidativo de monócitos estimulados com PMA e HRFP ($P < 0,0001$; $r = 0,0001$); porcentagem de fagocitose de monócitos e HRFP ($P < 0,0001$; $r = 0,793$); porcentagem de fagocitose de monócitos e teores de vitamina E plasmático ($P = 0,016$; $r = 0,451$); bem como intensidade de fagocitose de neutrófilos com GSH-Px e SOD ($P = 0,016$; $r = 0,4501$ e $P = 0,01$; $r = 0,579$, respectivamente), mostrando efeito positivo e indireto da suplementação com a vitamina E/status antioxidante, principalmente sobre os monócitos, já que a vitamina E está mais relacionada a HRFP do que a GSH-Px ou a SOD.

Os monócitos promovem a peroxidação de lipídios como LDL através da geração de EROs, assim como macrófagos secretam várias cicloquinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α e IL-6, que aumentam a adesão endotelial dos monócitos (SINGH et al., 2005). Estudos em humanos apontam que a suplementação com alfatocoferol, especialmente em doses elevadas, diminuiu a liberação de citocinas pró-inflamatórias, e a adesão de monócitos ao endotélio (DEVARAJ et al., 1996; SCHAAN, 2003; SINGH et al., 2005). Também foi apontado que a suplementação com vitamina E, por meio de sua função antiinflamatória sobre a expressão de sICAM-1, desencadeou efeito inibitório em moléculas de adesão e, portanto, da adesão de monócitos que, se aderidos às células endoteliais humanas iniciariam eventos para o desenvolvimento da aterogênese (MARTIM et al., 1997). O estresse oxidativo atua sobre monócitos com liberação de O₂ predominantemente através da NADPH oxidase por ativação de PKC, e nas células endoteliais pode ser através das mitocôndrias (VENUGOPAL et al., 2002; SCHAAN, 2003), o que pode ser suprimido pelo alfatocoferol, o que talvez explique o aumento da liberação de O₂ nos monócitos em pacientes diabéticos (VENUGOPAL et al., 2002).

Estudos com a suplementação de vitamina E em ratos submetidos a estresse induzido demonstraram efeitos benéficos sobre o metabolismo oxidativo com a redução das concentrações de TBARS (GOLDFARB et al., 1996). Sharma et al. (2000), também sugeriram que a suplementação de vitamina E pode ter efeitos benéficos na prevenção de complicações crônicas quando associada à terapia convencional em pacientes com diabetes mellitus, através de seu papel antiinflamatório. Maiores concentrações de vitamina E foram encontradas no plasma e fígado e menores concentrações de TBARS em músculo e fígado de ratos controle em relação à diabéticos (NAZIROĞLU et al., 2001).

Nas análises de imunofenotipagem realizadas no presente estudo, foi observado efeito de tempo para todos os anticorpos monoclonais utilizados. Houve para CD16-CD14+ interação tempo*tratamento ($P=0,0248$), 15 dias após a aplicação das vitaminas, quando as ovelhas suplementadas com vitamina D apresentaram aumento da expressão desses marcadores em relação aos demais grupos. Bardou et al., (2014), observaram que o aumento da expressão de CD16- e CD14+ pode estar relacionado ao trabalho de parto em mulheres, assim monócitos parecem desempenhar papel central, embora complexo durante a gestação, pois estão envolvidos na alocação fetal e no parto. Os monócitos CD16- formam a maior população, cerca de 90% e as células CD16+ representam cerca de 10% de todos os monócitos em condições fisiológicas em repouso. O número de monócitos CD16+ pode, no entanto, aumentar ou diminuir em várias condições, como nos quadros inflamatórios, infecções graves e sepse. Além disso, pode haver aumento temporário de monócitos CD16+ com exercício e estresse excessivos. No presente estudo, ovelhas híidas com ECC baixo, no momento do parto apresentaram menor CD8, CD16-CD14+, CD16+CD14-, CD16+CD14+, WC1 e a proporção CD4/CD8. Enquanto CD4 e CD206 foram maiores no parto, sem efeito de tratamento. Em estudo com 30 ovelhas, distribuídas de acordo com concentrações sanguíneas de cortisol, foi observada relação $CD4 + / CD8 +$ menor em ovelhas com concentrações de cortisol mais elevadas (CAROPRESE et al., 2010).

Pomeroy et al. (2018), mostraram que maiores contagens de dois subconjuntos de monócitos CD14 + foram preditivas de doença, enquanto, números mais elevados do subconjunto de monócitos CD14 - foram negativamente associados à doença, e a este papel de oposição entre os conjuntos foi atribuído papel funcional na resposta inflamatória em vacas leiteiras, indicando que o número e a composição

dos subconjuntos de monócitos antes do parto estão relacionados à susceptibilidade a doenças infecciosas dentro de 2 semanas pós-parto, o que demonstra variações na resposta imunológica neste período.

A interação com a vitamina D em CD16-CD14+, no presente estudo, pode ter ocorrido devido a possível atuação no sistema imunológico, pois seu metabólito biologicamente ativo 1,25-dihidroxicolecalciferol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) atua como poderoso imunoregulador (GRIFFIN et al., 2003). Quantidades significativas de receptores de vitamina D em monócitos, macrófagos e timo sugerem papel específico da vitamina D no sistema imunológico (MAGGINI et al., 2007). A maioria das células do sistema imunológico, exceto as células B, expressam receptores de vitamina D (MATHIEU et al., 1994; DELUCA & CANTORNA, 2001; GREGORI et al., 2002; HOLICK, 2004; MAGGINI et al., 2007). Há evidências em estudos epidemiológicos em humanos e em animais que o status de vitamina D influencia a ocorrência de doenças autoimunes mediadas por Th1, devido à capacidade do $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ em inibir a maturação de células dendríticas (DC); em regular a baixa produção da IL-12 imunoestimuladora; e em aumentar a IL-10 (LEMIRE et al., 1995; DELUCA & CANTORNA, 2001) imunossupressora (MAGGINI et al., 2007). Também foi apontada ação da vitamina D sobre a regulação e a diferenciação de células como linfócitos, como observado em CD4 por alguns pesquisadores (CANTORNA et al., 2004; ARNSON et al., 2007; SZODORAY et al., 2008; CUTOLO et al., 2008,2009; MARQUES et al., 2010), também macrófagos e células *natural killer* (NK), além do aumento do número e função das células T reguladoras (Treg), inibição *in vitro* da diferenciação de monócitos em células dendríticas (ARNSON et al., 2007); e por sua interferência na produção de citocinas *in vivo* e *in vitro*, diminuição da produção das citocinas interferon- γ , IL-2 e TNF- α , a partir de células Th1 e estímulo da função células Th2 *helper* (CANTORNA et al., 2004; SZODORAY et al., 2008) inibição da produção de IL-17 a partir de células Th17 e estimulação de células T NK *in vivo* e *in vitro*, inibição *in vitro* da diferenciação de monócitos em células dendríticas.

Ao observarmos a relação positiva de CD16-CD14+, de média intensidade com HRFP ($r=0,443$; $P<0,0001$), que possui relação com também significativa e de média intensidade com a vitamina E ($r=0,347$; $P<0,0001$) e do percentual de fagocitose de monócitos com a vitamina E ($r=0,451$; $P=0,016$), bem como do burst basal de neutrófilos com a vitamina E ($r=0,389$; $P=0,041$), podemos inferir que, de certa forma a vitamina E interferiu em aspectos da imunidade nas ovelhas no

presente estudo. Vacas suplementadas a partir dos 60; 30; 15 ou 0 dias antes do parto até um mês de lactação com 1000UI de vitamina E, foram monitoradas e foi observada melhora da resposta imune por meio do aumento das concentrações plasmáticas de imunoglobulinas e menor estresse oxidativo, observado com a atividade antioxidante total no plasma reduzida aos 30 dias antes do parto e no parto, mostrando melhor estado imune de vacas suplementadas com vitamina E devido ao menor estresse oxidativo (CHATTERJEE et al., 2003). A atividade antioxidante, avaliada por meio da habilidade de redução férrica plasmática (HRFP), apresentou-se menor no dia do parto em todos os grupos, mas a redução foi menor nos animais suplementados aos 30 e 60 dias antes do parto, fazendo com que os autores concluíssem que a suplementação com vitamina E deveria ser iniciada pelo menos 30 dias do pré-parto para reduzir o estresse oxidativo em vacas no periparto (CHATTERJEE et al., 2003). A suplementação com vitaminas antioxidantes deve ser uma prática implementada no período periparto de fêmeas ruminantes, em especial nas que estão com ECC elevado, pois, de maneira geral, se observa em animais hípidos maior demanda por substâncias antioxidantes nesse período.

A utilização de vitamina E em conjunto com o selênio foi feita por Sterndale et al (2017) para melhorar a competência imunológica de ovelhas e cordeiros. Os autores suplementaram ovelhas com vitamina E e selênio durante a gestação, e não observaram interferência na produção de anticorpos colostrais ou na resposta imune adaptativa e na resposta imune inata de cordeiros com 14 dias de vida. Mesmo com as concentrações de α -tocoferol e selênio aumentaram de 40 a 50% durante o final da gestação nos animais suplementados, porém a resposta limitada das ovelhas à suplementação com vitamina E e selênio poderia estar associada às ovelhas estarem em equilíbrio energético positivo durante final da gestação, à menor concentração de vitamina E e selênio na dieta, a dose utilizada, bem como a forma e o tempo de suplementação. Outros autores não conseguiram evitar redução nos teores de vitamina E em vacas no pré-parto nem mesmo com a suplementação com cerca de 1000 UI/vaca/dia de vitamina E (BRZEZINKA-SLEBODZINSKA et al., 1994; WEISS, 1990), esse fato também foi por nós observado no presente estudo. A melhora na função de neutrófilos no parto foi observada com a suplementação de vacas com 3000 e 5000 UI de vitamina E uma semana antes do parto (POLITIS et al., 1995; HOGAN et al., 1992; WEISS et al., 1992). Apesar dos resultados ainda conflitantes existentes na literatura, LeBlanc et al. (2002), consideram que a administração

parenteral de vitamina E no pré-parto em vacas deva ser realizada ao menos 15 dias antes do parto para que seja possível evidenciar algum efeito positivo.

Desta forma, devemos considerar que efeitos sobre o metabolismo das vitaminas D e E, e seu papel sobre o perfil bioquímico, metabolismo energético, metabolismo oxidativo e aspectos da imunidade, bem como o momento ideal para suplementação parenteral no periparto ainda devam ser estudados, especialmente em ovelhas com elevado escore de condição corporal e recebendo dietas com alta energia, especialmente silagem de milho como fonte de volumoso. Cumpre ressaltar, que a suplementação vitamínica não substitui os quesitos básicos para nutrição de ruminantes, porém pode muito contribuir para condições fisiológicas que tendem a proporcionar desafios metabólicos no período periparto em sistemas intensivos para animais de produção, bem como para mulheres gestantes e pacientes diabéticos.

7. CONCLUSÕES

1 – Ovelhas com ECC moderado não apresentaram resistência insulínica, assim não foi possível evidenciar efeito da suplementação das vitaminas D e E nesse aspecto;

1.a RQUICKI BHB é melhor indicador da sensibilidade insulínica do que o RQUICKI para ovelhas no período periparto

2- Quanto ao metabolismo oxidativo, apenas a vitamina E foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica no momento do parto;

3 – Maiores concentrações plasmáticas de alfatocoferol estão positivamente relacionadas com melhora da resposta oxidativa dos monócitos sem estímulo e estimulados por PMA, bem como a porcentagem de fagocitose desse grupo de células;

4 - A suplementação com a vitamina D 108 dias de gestação aumenta a resposta CD16-CD14+

5 – Concentrações plasmáticas de 25 hidroxicolecalciferol influenciaram os teores plasmáticos de alfa tocoferol

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. Cellular and molecular immunology. 3. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1997, 494 p.
- ABELL, L.L.; LEVY, B.B.; BRODIE, B.B.; KENDALL, F.E. A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity. J biol chem. v.195(1) mar, p.357-66, 1952.
- ABUELO A, DE KOSTER J, HERNANDEZ J, et al. Quantifying bovine insulin: conversion of units. Vet Clin Pathol. 41(3):308–10, 2012.
- AEBERHARD, K.; BRUCKMAIER, R.M.; BLUM, J.W. Metabolic, enzymatic and endocrine status in high-yielding dairy cows - Part 2. Journal of Veterinary Medicine A, Berlin, v. 48, p. 111-127, 2001.
- AGARWAL, A.; ALLAMANENI S.S.R.; NALLELLA K.P.; GEORGE, A.T.; MASCHA, E. Correlation of reactive oxygen species levels with the fertilization rate after in vitro fertilization: a qualified meta-analysis. Fertil and Sterility, v.84, p.228–231, 2005.
- AITKEN I.D. Aitken, Diseases of sheep, Blackwell Publishing, Oxford, UK, 4, 624, 2007.
- AIRES, M. de M. Fisiologia. Fisiologia, v. 1, n. 2, p. 1057–1059, 2008.
- AL QUDAH, K.M. Oxidant and antioxidant profile of hyperketonemic ewes affected by pregnancy toxemia. Veterinary Clinical Pathology, v.40, p.60-65, 2011.
- ALVAREZ, J. A.; ASHRAF, A. Role of Vitamin D in Insulin Secretion and Insulin Sensitivity for Glucose Homeostasis. International Journal of Endocrinology, v. 2010, p. 1–18, 2010.
- AMADORI M., STEFANON B., SGORLON S., FARINACCI M. Immune system response to stress factors. It J Anim Sci.,8(1):287–99, 2009.
- AMER, J.; GOLDFARB, A.; FIBACH, E. Flow cytometric measurement of reactive oxygen species production by normal and thalassaemic red blood cells. European Journal of Haematology, v. 70, n. 2, p. 84–90, 2003.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 27(Suppl 1):S5–10, 2004.
- ANDREF, BAZIN S, SILIART B. Interest and limits of blood chemistry in high producing cows. Isr J Vet Med 43:110-116, 1987.
- ANDREWS A. Pregnancy Toxaemia In the Ewe. In Practice,19, p.306-312, 1997.

ANTUNOVIÄ†, Z.; NOVOSELEC, J. Blood Metabolic Profile and some of Hormones Concentration in Ewes During Different Physiological Status. electronic form only: NE, v. 17, n. 5, p. 687–695, [s.d.] Disponível em: <<http://bib.irb.hr/prikazi-rad?lang=en&rad=531188>>.

ANTUNOVIC Z., SENČIĆ D., ŠPERADA M., LIKER, B. Influence of the season and the reproductive status of ewes on blood parameters. *Small Ruminant Research* 45, 39-44, 2002.

ANTUNOVIC, Z.; NOVOSELEC, J.; SAUERWEIN, H.; SPERANDA, M.; VEGARA, M.; PAVIC, V. Blood metabolic profile and some of hormones concentration in ewes during different physiological status. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, v. 17, n. 5, p. 687- 695, 2011.

ANUGU, S., PETERSSON-WOLFE, C. S., COMBS, G. F., & PETERSSON, K. H. Effect of vitamin E on the immune system of ewes during late pregnancy and lactation. *Small Ruminant Research*, v.111, p.83–89, 2013.

ARAÚJO, C.A.S.C. Estudo comparativo do perfil metabólico e hormonal de ovelhas com gestação única, gemelar e não getantes alimentadas com dieta de alta densidade energética. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 212p., 2010.

ARAÚJO, C.A.S.C.; NIKOLAUS, J.P.; MORGADO, A.A.; MONTEIRO, B.M.; RODRIGUES, F.A.M.L.; VECHIATO, T.A.F.; SOARES, P.C.; SUCUPIRA, M.C.A. Perfil energético e hormonal de ovelhas Santa Inês do terço médio da gestação ao pós-parto. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 34, n.12, p.1251-1257, 2014.

ARMSTRONG, D., and R. BROWNE. The analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. *Adv. Exp. Med. Biol.* 366:43–58, 1994.

ARNSON Y, AMITAL H, SHOENFELD Y. Vitamin D and autoimmunity: new etiological and therapeutic considerations. *Ann Rheum Dis*, 66:1137-42, 2007.

AUFFRAY C, SIEWEKE MH, GEISSMANN F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 27:669-92, 2009.

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

ASEMI, Z.; HASHEMI, T.; KARAMALI, M.; SAMIMI, M.; ESMAILLZADEH, A. Effects of vitamin D supplementation on glucose metabolism, lipid concentrations, inflammation, and oxidative stress in gestational diabetes: a double-blind randomized controlled clinical trial. *The American journal of clinical nutrition*, v. 98, n. 6, p. 1425–32, 1 dez. 2013.

BABIOR, B. The Respiratory Burst of Phagocytes. *Journal of Clinical Investigation*, v. 73, n. March, p. 599–601, 1984.

BALBOA L, BARRIOS-PAYAN J, GONZALEZ-DOMINGUEZ E, LASTRUCCI C, LUGO-VILLARINO G, MATA-ESPINOZA D, SCHIERLOH P, KVIATCOVSKY D, NEYROLLES O, MARIDONNEAU-PARINI I, SÁNCHEZ-TORRES C, SASIAIN MDEL C, HERNÁNDEZ-PANDO R. Diverging biological roles among human monocyte subsets in the context of tuberculosis infection. *Clin Sci (Lond)*, 129:319–330, 2015.

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

BALOGH O., SZEPEŠ O., KOVACS K., et al. Interrelationships of growth hormone Alu polymorphism, insulin resistance, milk production and reproductive performance in Holstein-Friesian cows. *Vet Med.* ;53(11):604–16, 2008.

BARBOSA, L. P.; RODRIGUES, M. T.; GUIMARÃES, J. D.; TORRES, C. A. A.; CARVALHO, G. R.; AMORIM, L. S.; DUTRA, P. A. Influência da condição corporal ao parto no balanço energético e desempenho reprodutivo de cabras leiteiras no pós-parto. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 68, n. 5, p. 1283–1291, 2016.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; DE CÁSSIA GONÇALVES ALFENAS, R.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios *Revista de Nutricao*, 2010.

BARDOU, M.; HADI, T.; MACE, G.; PESANT, M.; DEBERMONT, J.; BARRICHON, M.; WENDREMAIRE, M.; LAURENT, N.; SAGOT, P.; LIRUSSI, F. Systemic increase in human maternal circulating CD14+CD16 - MCP-1+ monocytes as a marker of labor. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 210, n. 1, 2014.

BARHAM, D.; TRINDER, P. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *Analyst*. v.97. p.142-145, 1972.

BARREIROS, A.L. B. S; DAVID J.M.; DAVID J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Sociedade Brasileira De Química*. 29(1): 113-23, 2006.

BARTELS, H.; BOHMER, M. Serum creatinine determination without protein precipitation. *Clin chim acta*. v.37, p.193, 1972.

BAUMAN D.E. Regulation of nutrient partitioning during lactation: homeostasis and homeorhesis revisited. *Ruminant Physiology*; 311–28, 2000.

BAUMAN D.E., CURRIE W.B. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation—a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *J Dairy Sci* 63(9):1514–29, 1980.

BAUMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response. *Immunology Today*, v. 15, n. 2, p. 74–80, 1994.

BELENCHIA, A.M.; TOSH, A.K.; HILLMAN, L.S.; PETERSON, C.A. Correcting vitamin D insufficiency improves insulin sensitivity in obese adolescents: a randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 97, p.774-781, 2013.

BELL, A. W. In: *Lipid metabolism in ruminant animals* (Christie, W. W., ed), Pergamon Press Oxford, 1981.

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

BELL A.W., BAUMAN D.E. Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2(3):265–78, 1997.

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

BERGMAN R.N., IDER Y.Z., BOWDEN C.R., et al. Quantitative estimation of insulin sensitivity. *Am J Physiol.*;236(6):E667–77, 1979.

BERNABUCCI, U., RONCHI, B., LACETERA, N., & NARDONE, A. Markers of Oxidative Status in Plasma and Erythrocytes Of Transition Dairy Cows During Hot Season. *Journal of Dairy Science*, v.85, n.9, p. 2173–9, 2002.

BERNABUCCI, U., RONCHI, B., LACETERA, N., & NARDONE, A. Influence of Body Condition Score on Relationships Between Metabolic Status and Oxidative Stress In Periparturient Dairy Cows. *J. of Dairy Sci.* 88(6), 2017–2026., 2005.

BERTOLINI, D. L.; TZANNO, C.; RESUMO, -Martins. Revisão: Efeitos imunomoduladores da vitamina D. *J Bras Nefrol*, v. 22, n. 3, p. 157–61, 2000.

BERTULAT S., FISCHER-TENHAGEN C., SUTHAR V., MÖSTL E., ISAKA N., HEUWIESER W. Measurement of fecal glucocorticoid metabolites and evaluation of udder characteristics to estimate stress after sudden dry-off in dairy cows with different milk yields. *J Dairy Sci.*;96:3774–87, 2013.

BEZERRA, L.R. Desempenho e comportamento metabólico de cordeiros da raça Santa Inês alimentados com diferentes concentrações de *Spirulina platensis* diluída em leite de vaca. 2006. 41f. Dissertação (Mestrado em Sistemas Agrosilvopastoris no semi-árido) – Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande - PB.

BOBE, G.; YOUNG, J. W.; BEITZ, D. C. Invited review: pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 87, p. 3105-3124, 2004.

BODEN, G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM Diabetes. *Diabetes*, Jan; 46(1): 3-10, 1997.

BORISSOVA, A.M.; TANKOVA, T.; KIRILOV, G.; DAKOVSKA, L.; KOVACHEVA, R. The effect of vitamin D3 on insulin secretion and peripheral insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *International Journal of Clinical Practice*, v. 57, p. 258-261, 2003.

BORGHETTI, P., R. SALERI, E. MOCCHEGIANI, A. CORRADI, and P. MARTELLI. Infection, immunity and the neuroendocrine response. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 130:141–162, 2009.

BOSSAERT P, LEROY J.L., DE VLIEGHER S., et al. Interrelations between glucose-induced insulin response, metabolic indicators, and time of first ovulation in high-yielding dairy cows. *J Dairy Sci.*;91(9):3363–71, 2008.

BOSSAERT P., TREVISI E., OPSOMER G., BERTONI G., DE VLIEGHER S., LEROY J.L.M.R. The association between indicators of inflammation and liver variables during the transition period in high-yielding dairy cows: An observational study. *Vet J.*, 192:222–225, 2012.

BOUCHER B. J. Vitamin D insufficiency and diabetes risks. *Curr Drug Targets*.12:61-87, 2011.

BOUVIER-MULLER, J.; ALLAIN, C.; ENJALBERT, F.; TABOURET, G.; PORTES, D.; CAUBET, C.; TASCA, C.; FOUCRAS, G.; RUPP, R. Response to dietary-induced energy restriction in dairy sheep divergently selected for resistance or susceptibility to mastitis. *Journal of Dairy Science*, v. 99, n. 1, p. 480–492, 2016.

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

BOUWSTRA, R.J.; NIELEN, M.; VAN WERVEN, T. Comparison of the oxidative status of vitamin E supplemented and non-supplemented cows under field conditions. *Tijdschr Diergeneeskde*, v.134, p.656-661, 2009.

BOUWSTRA, R. Mastitis and oxidative stress in vitamin E supplemented dairy cows. 2010.

BLOOD, D. C. et al., *Clínica veterinária*, editora Guanabara Koogan, 7 edição, Rio de Janeiro, 1991.

BLUM, J.W.; WILSON, R.B.; KRONFELD, D.S. Plasma insulin concentrations in parturient cows. *J. Dairy Sci.*, v.56, p.459-464, 1972.

BLUM, J. W.; REDING, T.; JANS, F.; WANNER, M.; ZEMP, M.; BACHMANN, K. Variations of 3-methylhistidine in blood of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, Madison, v. 68, n. 10, p. 2580-2587, 1985.

BRAUN, J.P.; LEFEBURE, H.; BÉZILLE, P.B.; RICO, A.G.; TOUTAIN, P.L.; Creatine kinase in cattle: a review. *Revue da Medicine Vétérinaire*, v.10, p.615-622, 1995.

BRION, A. *Vademecum del Veterinário*. 2.ed. Barcelona: Gea, 1964, 732p.

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

BRINGHURST FR, DEMAY MB, KRONENBERG HM. Hormones and Disorders of Mineral Metabolism. In: Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR editors. *Williams Textbook of Endocrinology*, 11 ed. Philadelphia: Elsevier, 2008.

BRITO, M.A.; GONZÁLEZ, F.H.D.; RIBEIRO, L.A.O.; CAMPOS, R.; LACERDA, L.; BARBOSA, P.R. E BERGMANN, G. Composição do sangue e do leite em ovinos leiteiros no sul do Brasil: variações na gestação e lactação. *Ciênc. Rural* , 36: 942-948, 2006.

BRODZKI P, KOSTRO K, BRODZKI A, LISIECKA U, KUREK L, MARCZUK J. Phenotyping of leukocytes and granulocyte and monocyte phagocytic activity in the peripheral blood and uterus of cows with endometritis. *Theriogenology*, 82:403–410, 2014.

BRONDANI, W. C.; LEMES, J. S.; FERREIRA, O. G. L.; ROLL, V. F. B. ; DEL PINO, F. A. B. Perfil metabólico de ovelhas em gestação. *Arch. Zootec.* 65 (R): 1-6. 2016.

BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E., MILLER, J.K., QUIGLEY, J.D., MOORE, J.R., MADSEN, F.C. Antioxidant Status of Dairy Cows Supplemented Prepartum with Vitamin E and Selenium. *J. Dairy Sci.* 77, 3087–3095, 1994.

BUCOLA G, DAVID H. Quantitative determination of serum triglycerides by use of enzymes. *Clin Chem.* v.19, p.476-82, 1973.

BURTON, J. L., M. E. KEHRLI, J.R., S. KAPIL., and R. L. HORST. Regulation of L-selectin and CD18 on bovine neutrophils by glucocorticoids: effects of cortisol and dexamethasone. *J. Leukoc. Biol.* 57:317-325, 1995.

BURTON, J.L., MADESN, S.A., CHANG, L.-C, WEBER, P.S.D., BUCKHAM, K.R., R.VAN DORP, HICKEY, M.-C. & EARLEY, B. Gene expression signatures in neutrophils exposed to glucocorticoids: a new paradigm to help explain ‘neutrophil dysfunction’ in periparturient dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 105, pp. 197-219, 2005.

CADE, C.; NORMAN, A.W.; Vitamin D3 improves impaired glucose tolerance and insulin secretion in the vitamin D-deficient rat in vivo. *Endocrinology*, v.119, p.84-90, 1986.

CALDEIRA , R.M.; BELO, A.T.; SANTOS, C.C.; VAZQUES, M.I.; PORTUGAL, A.V. The effect of body condition score on blood metabolites and hormonal profiles in ewes. *Small Ruminant Research*, v. 68, p.233-241, 2007.

CAMPOS, R.; GONZÁLEZ, F., COLDEBELLA, A., LACERDA, L. Indicadores do metabolismo energético no pós-parto de vacas leiteiras de alta produção e sua relação com a composição do leite. *Rev. Ciênc. Rural.*, 2007.

CAMPOS, R. HERNANDEZ, E., GIRALDO, L., GONZÁLEZ, F. Cortisol e sua relação com a regulação endócrina no período de transição em vacas leiteiras sob condições do trópico colombiano. *CIÊNCIA ANIMAL BRASILEIRA. Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria*, Belo Horizonte, MG, p.790-794, 2009.

CANTORNA MT, MAHON B. Mounting evidence for vitamin D as an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence. *Exp Bio Med (Maywood)* 229(11):1136-42, 2004.

CAO, G.; ALESSIO, H.M.; CUTLER, R.G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, v.140, p.303-311, 1993.

CAROPRESE, M.; ALBENZIO, M.; MARZANO, A.; SCHENA, L.; ANNICCHIARICO, G.; SEVI, A. Relationship between cortisol response to stress and behavior, immune profile, and production performance of dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, v. 93, n. 6, p. 2395–2403, 2010.

CAROPRESE, M., G. ANNICCHIARICO, L. SCHENA, A. MUSCIO, R. MIGLIORE, and A. SEVI. Influence of space allowance and housing conditions on the welfare, immune response and production performance of dairy ewes. *J. Dairy Res.* 76:66–73, 2009.

CAROPRESE, M., M. ALBENZIO, G. ANNICCHIARICO, and A. SEVI. Changes occurring in immune responsiveness of single- and twin- bearing Comisana ewes during the transition period. *J. Dairy Sci.* 89:562–568, 2006.

CASTILLO, C.; HERNANDEZ, J.; BRAVO, A. Oxidative Status During Late Pregnancy and Early Lactation In Dairy Cows. *The Vet. J.*, v.169, p.286-292, 2005.

CASTILLO, C.; HERNANDEZ, J.; VALVERDE, I. et al. Plasma malonaldehyde (MDA) and total antioxidant status (TAS) during lactation in dairy cows. *Research in Veterinary Science*, v.80, p.133-139, 2006.

CASTRO G, et al. Diet-induced obesity induces endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the amygdala of rats. *FEBS Open Bio.*; 11;3:443-9, 2013.

CASTRO, L. C. G. de. O sistema endocrinológico vitamina D. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 55, n. 8, p. 566–575, 2011.

CELI, P.; DI TRANA, A.; QUARANTA, A. Metabolic profile and oxidative status in goats during the peripartum period. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, v. 48, n. 7, p. 1004, 2008.

CELI, P. Biomarkers of oxidative stress in ruminant medicine. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, p.1-8, 2010a.

Available: <<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/08923973.2010.514917>>
Access in 18 jul 2014.

CELI, P. The role of oxidative stress in small ruminants' health and production. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.39, p.348-363, 2010.

CERIELLO, A. Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism*, v.49, Suppl1, p. 27-29, 2000.

CHATTERJEE, P. Effect of vitamin E supplementation on plasma antioxidant vitamins and immunity status of crossbred cows. *Asian Australasian Journal of ...*, v. 0, n. group I, p. 1614–1618, 2003.

CHAUHAN, S. S.; LIU, F.; LEURY, B. J.; COTTRELL, J. J.; CELI, P.; DUNSHEA, F. R. Functionality and genomics of selenium and Vitamin E supplementation in ruminants. *Animal Production Science*, 56 (8), 1285-1298, 2016.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Química Nova*, Vol. 31, No. 3, 623-636, 2008.

CHILLIARD, Y. Metabolic adaptations and nutrient partitioning in the lactating animal. In *Biology of Lactation*, pp. 503–552 [J Martinet, LM Houdebine and HH Head, editors]. Paris: INRA Ed. (1999).

CHRISTISON, G.I.; JOHNSON, H.D. Cortisol turnover in heat-stressed cows. *Journal of Animal Science*, Champaign, v.35, n.5, p.1005-1010, 1972.

CLARKE, A. Why does metabolism scale with temperature? *Funct. Ecol.* 18, 243–251, 2004.

COETZEE, J.F.; GEHRING, R.; BETTENHAUSEN, A.C.; LUBBERS, B.V.; TOERBER, S.E.; THOMSON, D.U.; KUKANICH, B.; APLEY, M.D. Attenuation of acute plasma cortisol response in calves following intravenous sodium salicylate administration prior to castration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. v.30 (4), p.305-313, 2007.

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

CORRIPIO-MIYAR, Y.; HOPE, J.; MCINNES, C. J.; WATTEGEDERA, S. R.; JENSEN, K.; PANG, Y.; ENTRICAN, G.; GLASS, E. J. Phenotypic and functional analysis of monocyte populations in cattle peripheral blood identifies a subset with high endocytic and allogeneic T-cell stimulatory capacity. *Veterinary Research*, v. 46, n. 1, 2015.

CRAIG, F. E.; FOON, K. A. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*, 111 (8), p. 3941-3967, 2008.

CRUVINEL, W. M.; JUNIOR, D. M.; ARAÚJO, J.A.P.; CATALEN, T.T.T.; SOUZA, A.W.S.; SILVA, N.P.; ANDRADE, L.E.C. Sistema Imunitário –Parte 1 Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. Revista. Brasileira de Reumatologia ,50(4), 434-61, 2010.

CURI, R.; PROCOPIO, J. – Fisiologia Básica – Guanabara Koogan, v1 882p, 2009.

CUTOLO M, OTSA K. Review: vitamin D, immunity and lupus. Lupus 2008; 17:6-10

CUTOLO M. Vitamin D and autoimmune rheumatic diseases. Rheumatology, 48: 210-2, 2009.

DAY, M. J. Biology of Lymphocytes and Plasma Cells In: Feldman, B. F., Zinkl, J. G., Jain, N. C., & Schalm, O. W. Schalm's veterinary hematology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. p. 240–246, 2000.

DEBRAS E, GRIZARD J, AINA E, et al. Insulin sensitivity and responsiveness during lactation and dry period in goats. Am J Phys; 256(2):E295–302, 1989.

DEFRONZO RA. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. Med Clin North Am.;88(4):787–835, 2004.

DE KOSTER, J. D.; OPSOMER, G. Insulin resistance in dairy cows. The Veterinary clinics of North America. Food animal practice, v. 29, p. 299–322, 2013.

DELUCA H.F. & CANTORNA M.T. Vitamin D: its role and uses in immunology. FASEB J 15, 2579–2585, 2001.

DEVARAJ, S.; LI, D.; JIALAL, I. The effects of alpha tocopherol supplementation on monocyte function: Decreased lipid oxidation, interleukin 1 β secretion, and monocyte adhesion to endothelium. Journal of Clinical Investigation, v. 98, n. 3, p. 756–763, 1996.

DEVASKAR, S. U.; THAMOTHARAN, M. Metabolic programming in the pathogenesis of insulin resistance. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders, V.8 (2), P. 105-112, 2007.

DHUPA, N.; PROULX, J. Hypocalcemia and hypomagnesemia. In: SHAER, Michael. The veterinary clinics of North America – Small animal practice. Advances in fluid and electrolyte disorders, v. 28 - n. 3: 587-607, 1998.

DICKSON, W.M. Endocrinologia, reprodução e lactação. Glândulas endócrinas In: SWENSON, M.J.; REECE, W.O. (Eds.) Dukes fisiologia dos animais domésticos. Rio de Janeiro: Guanabara, p.572-614, 1996.

DIEBER-ROTHENEDER, M.; PUHL, H.; WAEG, G.; STRIEGL, G.; ESTERBAUER, H. Effect of oral supplementation with d-alpha-tocopherol on the vitamin e content of human low density lipoproteins and resistance to oxidation. Journal of lipid reserch, v.32, p. 1325-1332, 1991.

DØNNEM, I.; RANDBY, T.; HEKTOEN, L.; AVDEM, F.; MELING, S.; Å.Ø.Våge^{b2}T.Ådnøy^a, T.; STEINHEIM, G.; WAAGE, S. Effect of vitamin E supplementation to ewes in late pregnancy on the rate of stillborn lambs. *Small Ruminant Research*, v. 125, p. 154–162, 2015.

DOUMAS, B.T.; WATSON, W.A.; BIGGS, H.G. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromcresol green. *Clin. Chim. Acta*. v.31, p.87, 1971.

DUNCAN, J. R.; PRASE, K. W. *Patologia Clínica Veterinária*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1982.

DUEHLMEIER, R.; FLUEGGE, I.; SCHWERT, B.; GANTER, M. Insulin sensitivity during late gestation in ewes affected by pregnancy toxemia and in ewes with high and low susceptibility to this disorder. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 27, p.359-366, 2013.

DUEHLMEIER, R.; FLUEGGE, I.; SCHWERT, B.; PARVIZI, N.; GANTER, M. Metabolic adaptations to pregnancy and lactation in German Blackheaded Mutton and Finn sheep ewes with different susceptibilities to pregnancy toxemia. *Small Ruminant Research*, v. 96, n. 2–3, p. 178–184, 2011.

DRACKLEY, J. K. Biology of Dairy Cows During the Transition Period: the Final Frontier? *Journal of Dairy Science*, v. 82, p. 2259–2273, 1999.

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

DUBREUIL, P.; ARSENAULT J.; BÉLANGER D. Biochemical reference ranges for groups of ewes of different ages. *Vet. Rec.* v.156(20), p.636-638, 2005.

DUFFIELD, T., Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. *Vet. Clin. N Am-Food A*. 16:231-253. 2000.

DUNCAN WH, GARTON GA. Blood lipids. 3. Plasma lipids of the cow during pregnancy and lactation. *Biochem J* 89:414- 419, 1963

ESPOSITO G., IRONS P.C., WEBB E.C., CHAPWANYA A. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. *Anim Reprod Sci.* 144:60–71, 2014.

EVANS, J.L.; MADDUX, B.A.; GOLDFINE, I.D. The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. *Antioxidants & Redox Signaling*, v.7, p.1040-1052, 2005.

FANG, F.; KANG, Z.; WONG, C. Vitamin E tocotrienols improve insulin sensitivity through activating peroxisome proliferator-activated receptors. *Molecular nutrition & food research*, v. 54, n. 3, p. 345–52, 2010.

FARIA, M. R. Sensibilidade à insulina e metabolismo oxidativo de cordeiros provenientes de ovelhas suplementadas com altas doses de vitamina D no período pré-parto. Dissertação de mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 2017.

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

FENN, J. B. Electrospray ionization mass spectrometry: How it all began *Journal of Biomolecular Techniques*, 2002.

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

FERRIER, L. et al. Evaluation of body composition in dogs by isotopic dilution using a low-cost technique, Fourier-transform infrared spectroscopy. *Journal of Nutrition*, v.132, p.1725S-1727S, 2002.

FINCH J. M. and TURNER R. J. Effect of selenium and vitamin E on the immune responses of domestic animals. *Research in Veterinary Science* 60, 97–106, 1996.

126.FORD, E. J. H.; EVANS, J.; ROBINSON, I. Cortisol in pregnancy toxemia of sheep. *British Veterinary Journal*, v. 146, n. 6, p. 539–542, 1990.

FORD, STEPHEN P. et al. Maternal obesity accelerates fetal pancreatic β -cell but not α -cell development in sheep: prenatal consequences. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 297, n. 3, p.835-843, 2009.

FOSSATI, P.; PRGNCIPE, L.; BERTI, G. Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. *Clin Chem*. v.26. p. 227-231, 1980.

FREITAS, M C; CESCHINI, F L; RAMALLO, B T. Resistência à insulina associado à obesidade: Efeitos anti-inflamatórios do exercício físico. *R. Bras. Ci. e Mov.*; 22(3): 139-147, 2014.

FRY, F. E. AND HART, J. S. The relation of temperature to oxygen consumption in the goldfish. *Anat. Rec.* 96, 586, 1946.

FTHENAKIS, G. C.; ARSENOS, G.; BROZOS, C.; FRAGKOU, I. A.; GIADINIS, N. D.; GIANNENAS, I.; MAVROGIANNI, V. S.; PAPADOPOULOS, E.; VALASI, I. Health management of ewes during pregnancy. *Animal Reproduction Science*, v. 130, p. 198–212, 2012.

GABBAY M.A., SATO M.N., FINAZZO C., et al. Effect of cholecalciferol as adjunctive therapy with insulin on protective immunologic profile and decline of residual beta-cell function in new-onset type 1 diabetes mellitus. *Arch Pediatr Adolesc Med.*, 166:601–7, 2012.

GLANTZOUNIS, G. K.; TSIMOYIANNIS, E. C.; KAPPAS, A. M.; GALARIS, D. A. Uric Acid and Oxidative Stress. *Current Pharmaceutical Design*, v. 11, p. 4145-4151, 2005.

GARDNER, D. S., K. TINGEY, B. W. M. VAN BOM, S. E. OZANNE, V. WILSON, J. DANDREA, D. H. KEISLER, T. Stephenson, and M. E. Symonds. Programming of glucose-insulin metabolism in adult sheep after maternal undernutrition. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* v.289, p.947–954, 2005.

GEISSMANN F, JUNG S, LITTMAN D. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*, 19:71–82, 2003.

GELONEZE, B.; TAMBASCIA, M.A. Avaliação laboratorial e diagnóstico da resistência insulínica. *Arq Bras Endocrinol Metab.* v.50, n.2, Abril, 2006.

GIESECKE, W.H. The effect of stress on udder health of dairy cows. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v.52, p.175-193, 1985.

GHISELLI, A.; SERAFINI, M.; MAIANI, G. et al. fluorescence- based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radical Biology and Medicine*, v.18, p.29-36, 1995.

GHISELLI, A.; SERAFINI, M.; NATELLA, F. et al. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radical Biology and Medicine*, v.29, p.1106-1114, 2000.

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

GILLOOLY, J. F., BROWN, J. H., WEST, G. B., SAVAGE, V. M. AND CHARNOV, E. L. Effects of size and temperature on metabolic rate. *Science* 293, 2248-2251, 2001.

GILLOOLY, J., ALLEN, A., SAVAGE, V., CHARNOV, E., WEST, G. AND BROWN, J. Response to Clarke and Fraser: effects of temperature on metabolic rate. *Funct. Ecol.* 20, 400-404, 2006.

GLUCKMAN, P. D.; LILLYCROP, K. A.; VICKERS, M. H.; PLEASANTS, A. B.; PHILLIPS, E. S.; BEEDLE, A. S.; BURDGE, G. C.; HANSON, M. A. Metabolic plasticity during mammalian development is directionally dependent on early nutritional status. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 104, n. 31, p. 12796–12800, 2007.

GOFF, J.P. and J.R. STABEL. Decreased Plasma Retinol, A---Tocopherol, And Zinc Concentration During the Periparturient Period: Effect on Milk Fever. *Dairy. Sci.* 73:3195, 1990.

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

GOFF, J. P. RECENT RESEARCH ON HYPOCALCEMIA and IMMUNITY. Iowa State University College of Veterinary Medicine Ames, IA. <https://ecommons.cornell.edu/.../HHNC2013.Goff.Manu.pdf;...1> 2013 acesso em: dez/2017.

GOLDFARB, A. H.; MCINTOSH, M. K.; BOYER, B. T. Vitamin E attenuates myocardial oxidative stress induced by DHEA in rested and exercised rats. *J Appl Physiol*, v. 80, n. 2, p. 486–490, 1996.

GOKCE E, ATAKISI O, KIRMIZIGUL AH AND UNVER A. Passive immunity in lambs: serum lactoferrin concentrations as a predictor of IgG concentration and its relation to health status from birth to 12 weeks of life. *Small Ruminant Research* 116, 219–228, 2014.

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

GONZÁLEZ, F. H. D. & SCHEFFER, J. F. S. PERFIL SANGÜÍNEO: FERRAMENTA DE ANÁLISE CLÍNICA, METABÓLICA E NUTRICIONAL. In: I Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil., Anais...2003.

GONZÁLEZ, F.H.D & SILVA, S.C.da. Introdução à bioquímica clínica veterinária. Porto Alegre, UFRGS, 198 p., 2003.

GONZÁLEZ-GARCÍA, E.; TESNIERE, A.; CAMOUS, S.; BOCQUIER, F.; BARILLET, F.; HASSOUN, P. The effects of parity, litter size, physiological state, and milking frequency on the metabolic profile of Lacaune dairy ewes. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 50, p. 32–44, 2015.

GRADINARU, D.; BORSA, C.; IONESCU, C.; MARGINA, D.; PRADA, G.I.; JANSEN, E. Vitamin D status and oxidative stress markers in the elderly with impaired fasting glucose and type 2 diabetes mellitus. *Aging Clin Exp Res*. v.24, n.6, p.595-602, 2012.

GREGORI S, GIARRATANA N, SMIROLDI S, USKOKOVIC M, ADORINI L. A 1,25-dihydroxyvitamin D3 analog enhances regulatory t-cells and arrests autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes*, 51:1367–74, 2002.

GRESSLER, M. A. L.; SOUZA, M. I. L.; SOUZA, A. S. de ; FILIÚ, W. F. de O. ; AGUENA, S., M.; FRANCO, G. L., Respostas bioquímicas de ovelhas submetidas a flushing de curto prazo em região subtropical. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.*, Salvador, v.16, n.1, p.210-222 jan./mar., 2015.

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

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

GUYOT, H.; DETILLEUX, J.; LEBRETON, P.; GARNIER, C.; BONVOISIN, M.; ROLLIN, F.; SANDERSEN, C. Comparison of various indices of energy metabolism in recumbent and healthy dairy cows. *PLoS ONE*, v. 12, n. 1, 2017.

HAARSTRICH D. Insulinsensitivität und Insulinresponse nach einer Langzeit-Supplementation von konjugierten Linolsäuren bei laktierenden Milchkuhen. Hannover(Germany): Klinik für Rinder, Tierärztliche Hochschule Hannover; 2011.

HADEF, A.; MIROUD, K.; KAIDI, R. Biochemical markers of peripartum nutritional status in postpartum anoestrous ewes grazing natural pasture in north eastern Algeria. *Annals of Biological Research*, v.5, n.9, p.31-37, 2014

HADEF, A.; MIROUD, K.; KAIDI, R. Postpartum progesterone profile and some peripartum blood parameters related to lipid metabolism and liver function in ewes. *Veterinarija ir Zootechnika*, v. 74, n. 96, p. 1–8, 2016.

HAFEZ EL-FAR A., MAHFOUZ M. K., ABDEL MAKSOUD H. A. Biochemical changes in glutathione redox system and glucose regulation in late pregnant ossimi ewes. *J Am Sci.*, n.6, p.953–957, 2010.

HAFFAF, S.; BENALLOU, B. Changes in energetic profile of pregnant ewes in relation with the composition of the fetal fluids. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 6, n. 3, p. 256–258, 2016.

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

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

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid Peroxidation: Its Mechanism, Measurement And Significance. *American Journal of Clinical Nutrition*, V.57 P. 715-725, 1993.

HAMMON D.S., EVJEN I.M., DHIMAN T.R., GOFF J.P., WALTERS J.L. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Vet. Immunol. Immunopath.*; 113:21-29, 2006.

HANDEL, I.; WATT, K. A.; PILKINGTON, J. G.; PEMBERTON, J. M.; MACRAE, A.; SCOTT, P.; MCNEILLY, T. N.; BERRY, J. L.; CLEMENTS, D. N.; NUSSEY, D. H.; MELLANBY, R. J. Vitamin D status predicts reproductive fitness in a wild sheep population. *Scientific Reports*, v. 6, n. January, p. 1–11, 2016.

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

HARTMAN P.E., LASCELLES A.K. Variation in the concentration of lipids and some other constituents in the blood plasma of cows at various stages of lactation. *Aust J Biol Sci* 18:114- 123, 1965.

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

HATFIELD, P. G., ROBINSON, B. L., MINIKHIEM, D. L., KOTT, R. W., ROTH, N. I., DANIELS, J. T., & SWENSON, C. K. *Journal of Animal Science*. May, 2002.

HATFIELD et al., P.G. HATFIELD, J.T. DANIELS, R.W. KOTT, D.E. BURGESS, T.J. EVANS. Role of supplemental vitamin E in lamb survival and production: a review. *J. Anim. Sci.*, 77, pp. 1-9, 2000.

HATHERILL, J.R.; TILL, G.O.; WARD, P.A. Mechanisms of oxidant-induced changes in erythrocytes. *Agents and Actions*, Switzerland, v.32, p.351-358, 1991.

HENRIQUE, FÁBIO LUÍS. Estresse durante a gestação e desmama e sua influência no desempenho de cordeiros. Dissertação de Mestrado. FZEA, Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2015.

HENZE, P., BICKHARDT, K., FUHRMANN, H., SALLMANN, H.-P. Spontaneous pregnancy toxemia (ketosis) in sheep and the role of insulin. *J. Vet. Med. A* 45, 255–266, 1998.

HERDT, T.H.; SMITH, J.C. Blood-lipid and lactation-stage factors affecting serum vitamin E concentrations and vitamin E cholesterol ratios in dairy cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 8, p.228-232, 1996.

HERDT, T. H. Ruminant adaptation to negative energy balance. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 16:215-230. 2000a.

HERDT, T. H., W. RUMBEIHA and W. E. BRASELTON. The use of blood analyses to evaluate mineral status in livestock. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 16: 423-444, 2000b.

HIDIROGLOU, M. Trace Element Deficiencies and Fertility in Ruminants: A Review. *Journal of Dairy Science*, v. 62, n. 8, p. 1195–1206, 1979.

HIDIROGLOU, M. et al. Plasma and milk concentrations of vitamin D3 and 25-hydroxy vitamin D3 following intravenous injection of vitamin D3 or 25-hydroxy vitamin D3. *Can J. Comp. Med.*, 48(1):78-80, 1984.

HIDIROGLOU, M.; SHORROCK, C.; WILLIAMS, C. J. Vitamin D3 response in sheep to oral versus parenteral administration and to intramuscular dose levels of vitamin D3. *Canadian journal of animal science*, v. 64, n. 3, p. 697-707, 1984.

HIDIROGLOU, M.; WILLIAMS, C. J. Interrelationships among liposoluble vitamins in ruminants. *American Journal of Veterinary Research*, v. 47, n. 8, p. 1767–1771, 1986.

HIDIROGLOU, M., and K. KARPINSKI. Vitamin E kinetics in sheep. *Br. J. Nutr.*, v.58, p.113, 1987.

HIDIROGLOU, M.; KARPINSKI, K. Disposition kinetics and dosage regimen of vitamin E administered intramuscularly to sheep. *Br. J. Nutr.*, v.65, p.465, 1991.

HIDIROGLOU, M., T. R. BATRA and X. ZHAO. Bioavailability of vitamin E compounds and the effect of supplementation on release of super oxide and hydrogen peroxide by bovine neutrophils. *J. Dairy Sci.* 80:187-193, 1997.

HOEKSTRA W.G. Biochemical function of selenium and its relation to vitamin-E. *Federation Proceedings* 34, 2083–2089, 1975.

HOFMAN, P. L.; REGAN, F.; JACKSON, W. E.; JEFFERIES, C.; KNIGHT, D. B.; ROBINSON, E. M.; CUTFIELD, W. S. Premature Birth and Later Insulin Resistance. *New England Journal of Medicine*, v. 351, n. 21, p. 2179–2186, 2004.

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

HOLICK, M. F. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *The American journal of clinical nutrition*, v. 79, p. 362–371, 2004.

HOLLAND WL, et al. Lipid-induced insulin resistance mediated by the proinflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice. *The journal of clinical investigation*;121(5):1858-1870, 2011.

HOLTENIUS K, AGENAS S, DELAVALD C, et al. Effects of feeding intensity during the dry period. 2. Metabolic and hormonal responses. *J Dairy Sci.* ;86(3): 883–91, 2003.

HOLTENIUS, P.; HOLTENIUS, K. A model to estimate insulin sensitivity in dairy cows. *Acta veterinaria Scandinavica*, v. 49, p. 29, 2007.

HORST RL, JORGENSEN NA. Elevated plasma cortisol during induced and spontaneous hypocalcemia in ruminants. *J Dairy Sci.*,65:2332, 1982

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

HUSSEN J., DUVEL A., SANDRA O., SMITH D., SHELDON I.M., ZIEGER P., SCHUBERTH H.J. Phenotypic and functional heterogeneity of bovine blood monocytes. *PLoS One.*,8:e71502 , 2013.

ILLISON, V. K.; RONDO, P. H. C.; DE OLIVEIRA, A. M.; D'ABRONZO, F. H.; CAMPOS, K. F. The relationship between plasma alpha-tocopherol concentration and vitamin E intake in patients with type 2 diabetes mellitus. *International journal for vitamin and nutrition research. Internationale Zeitschrift fur Vitamin- und Ernährungsforschung. Journal international de vitaminologie et de nutrition*, v. 81, n. 1, p. 12–20, 2011.

INGVARTSEN, K.L. Feeding- and management-related diseases in the transition cow:

Physiological adaptations around calving and strategies to reduce feeding-related diseases. *Anim. Feed Scie. Technol.*, v.126, p.175-213, 2006.

INGVARTSEN, K.L. In: [Prevention of feeding related disorders in dairy cattle]. Report 54, Danish Institute of Agricultural Sciences, ed. by Strudsholm, F & K. Sejrsen, 227-293, 2003.

INGRAHAM, R. H.; KAPPEL, L. C. Metabolic profile testing. *The Veterinary Clinics of North America: food animal practice*, v. 4, n. 2, p. 391-409, 1988.

IVANOVA, P. T.; MILNE, S. B.; MYERS, D. S.; BROWN, H. A. Lipidomics: a mass spectrometry based systems level analysis of cellular lipids *Current Opinion in Chemical Biology*, *Current Opinion in Chemical Biology*, 13:526–531, 2009.

JACOB, M.J. The integrated antioxidants systems. *Nutr Res*, New York, v.15, n.4, p.755-782, 1985.

JAKSON F.D. & WINKLER V.W. Effects of starvation on the fatty acid composition of adipose tissue and plasma lipids of sheep. *J. Nutr.* 100: 201-207, 1969.

JALILIAN, M. T.; MOEINI, M. M. The effect of body condition score and body weight of sanjabi ewes on immune system, productive and reproductive performance. *Acta Agriculturae Slovenica*, v. 102, n. 2, p. 99–106, 2013.

JENSEN, R.; SWIFT, B.L. *Disease of sheep*. 2.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 330p., 1982.

JI P., OSORIO J.S., DRACKLEY J.K., et al. Overfeeding a moderate energy diet prepar- tum does not impair bovine subcutaneous adipose tissue insulin signal transduction and induces marked changes in peripartal gene network expression. *J Dairy Sci* 95(8):4333–51, 2012.

JUNIOR, A. I.; ARCARO, J. R. P.; POZZI, C. R.; FAGUNDES, H.; MATARAZZO, S. V.; OLIVEIRA, C. A. Teores plasmáticos de hormônios, produção e composição do leite em sala de espera climatizada *Rev. bras. eng. agríc. ambient.*, v.7, n.2, Campina Grande May/Aug.,2003.

KAHN C.R. Insulin resistance, insulin insensitivity, and insulin unresponsiveness: a necessary distinction. *Metabolism*;27(12 Suppl 2):1893–902, 1978.

KAHN, S.E., HULL, R.L., UTZSCHNEIDER, K.M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444, 840–846, 2006.

KHAN, J. R.; LUDRI, R. S. Hormone profile of crossbred goats during the periparturient period. *Tropical Animal Health and Production*, v. 34, n. 2, p. 151–162, 2002.

KAHN, C.M., LINE, S. Pregnancy toxemia in ewes. *The Merck Veterinary Manual*. 9th ed. Merck and Co Whitehouse Station :828–832, 2005.

KAMILOGLU, N. Alteration In Antioxidant Status And Lipid Peroxidation Of Sheep Previously Treated With Vitamin A And Beta-Carotene During Breeding And Periparturient Period. ... Institute In Pulawy, p.171–177, 2006.

KAMILOGLU, N. N.; BEYTUT, E.; GURBULAK, K.; OGUN, M. Effects of Vitamin A and beta-carotene injection on levels of vitamin E and on glutathione peroxidase activity in pregnant tuj sheep. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, v. 29, p. 1033–1038, 2005.

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

KANEKO, J.J., HARVEY, D.W., BRUSS, W.L. Clinical biochemistry of domestic animals. 5th ed. San Diego: Academic Press, 1997.

KANEKO, J. J. ; HARVEY, J.W. ; BRUSS, M. Clinical biochemistry of domestic animals, Academic press, San Diego, California, USA, 6, 928, 2008.

KARAGIANNIS, I.; PANOUSIS, N.; KIOSSIS, E.; TSAKMAKIDIS, I.; LAFI, S.; ARSENOS, G.; BOSCOS, C.; BROZOS, C. Associations of pre-lambing body condition score and serum β -hydroxybutyric acid and non-esterified fatty acids concentrations with periparturient health of Chios dairy ewes. Small Ruminant Research, v. 120, n. 1, p. 164–173, 2014.

KARAPEHLIVAN, M., ATAKISI, E., ATAKISI, O., YUCAYURT, R., PANCARCI, S.M. Blood biochemical parameters during the lactation and dry period in Tuj ewes. Small Rumin. Res. 73, 267–271, 2007.

KASEKI, H.; KIM, E.Y.; WHISLER, R.L.; CORNWELL, D.G. Effect of an oral dose of vitamin E on the vitamin E and cholesterol content of tissues of the vitamin E-deficient rat. The Journal of Nutrition, v.116, n.9, p.1631-1639, 1986.

KASIMANICKAM, R., KASIMANICKAM, V., RODRIGUEZ, J., PELZER, K., SPONENBERG, P., THATCHER, C. Tocopherol induced angiogenesis in placental vascular network in late pregnant ewes. Reprod. Biol. Endocrinol. 8, 86, 2010.

KATZ A., NAMBI S.S., MATHER K., et al. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. J Clin Endocrinol Metab., 85(7):2402–10, 2000.

KE, C.; YANG, F.; WU, W.; CHUNG, C.; LEE, R.; YANG, W.; SUBEQ, Y.; LIAO, K. Vitamin D3 reduces tissue damage and oxidative stress caused by exhaustive exercise. International Journal of Medical Sciences. v.13(2), p.147-153, 2016.

KERASIOTI, E.; STAGOS, D.; GEORGATZI, V.; BREGOU, E.; PRIFTIS, A.; KAFANTARIS, I.; KOURETAS, D. Antioxidant Effects of Sheep Whey Protein on Endothelial Cells. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, v. 2016, 2016.

KERESTES M., FAIGL V., KULCSAR M., et al. Periparturient insulin secretion and

whole- body insulin responsiveness in dairy cows showing various forms of ketone pattern with or without puerperal metritis. *Domest Anim Endocrinol.* 37(4):250–61, 2009.

KEHRLI, M. E. JR, and J. P. GOFF. Periparturient hypocalcemia in cows: effects on peripheral blood neutrophil and lymphocyte function. *J. Dairy Sci.* 72:1188-1196, 1989a.

KEHRLI, M. E.; NONNECKE, B. J.; ROTH, J. A. Alterations in bovine neutrophil function during the periparturient period. *American Journal of Veterinary Research*, v. 50, n. 2, p. 207–214, 1989b

KHAN, J. R.; LUDRI, R. S. Hormone profile of crossbred goats during the periparturient period. *Tropical Animal Health and Production*, v. 34, n. 2, p. 151–162, 2002.

KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, v. 444, n. 7121, p. 840–846, 2006.

KIDA, K. Relationships of metabolic profiles to milk production and feeding in dairy cows. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*, v. 65, n. 6, p. 671–7, 2003.

KIMURA K., GOFF J.P., KEHRLI M.E., REINHARDT T.A. Decreased neutrophil function as a cause of retained placenta in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 85: 544-550, 2002.

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

KOENIG, G.; SENEFF, S. Gamma-Glutamyltransferase: A Predictive Biomarker of Cellular Antioxidant Inadequacy and Disease Risk. *Disease Markers*, 2015. (doi: 10.1155/2015/818570)

KOOLHAAS, J. M., S. M. KORTE, S. F. DE BOER, B. J. VAN DER VEGT, C. G. VAN REENEN, H. HOPSTER, I. C. DE JONG, M. A. W. RUIE, AND H. J. BLOKHUIS. Coping styles in animals: Current status in behavior and stress-physiology. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23:925– 935, 1999.

KONVIČNÁ J, VARGOVÁ M, PAULÍKOVÁ I, KOVÁČ G, KOSTECKÁ Z. Oxidative stress and antioxidant status in dairy cows during prepartal and postpartal periods. *Acta Vet Brno.* 84:133–140, 2015.

KOTT R.W., RUTTLE J.L. and SOUTHWARD G.M. Effects of vitamin E and selenium injections on reproduction and pre-weaning lamb survival in ewes consuming diets marginally deficient in selenium. *Journal of Animal Science* 57, 553–558, 1983.

KOTT, R. W.; THOMAS, V. M.; HATFIELD, P. G.; EVANS, T.; DAVIS, K. C. Effects of dietary vitamin E supplementation during late pregnancy on lamb mortality and ewe productivity. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 7,997-1000, 1998.

KOVACS C. S. Vitamin D in pregnancy and lactation: maternal, fetal, and neonatal outcomes from human and animal studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88, 520S-528S, 2008.

KRAMER, J. W.; HOFFMANN, W. E. Clinical enzymology. IN: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. (ed.) *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5.ed. San Diego: Academic Press, cap.12, p.303-325, 1997.

KREMER, W. D., E. N. NOORDHUIZEN-STASSEN, F. J. GROMMERS, Y. H. SCHUKKEN, R. HEERINGA, A. BRAND, and C. BURVENICH. Severity of experimental *Escherichia coli* mastitis in ketonemic and nonketonemic dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76:3428-3436, 1993.

KUMAGAI H. and WHITE C. The effect of supplementary minerals, retinol and α -tocopherol on the vitamin status and productivity of pregnant Merino ewes. *Australian Journal of Agricultural Research* 46, 1159–1174, 1995.

KUNZ-EBRECHT, S. R., V. MOHAMED-ALI, P. J. FELDMAN, C. KIRSCHBAUM, AND A. STEPTOE. Cortisol responses to mild psychological stress associated with proinflammatory cytokines. *Brain Behav. Immun.* 17:373–383, 2003.

KUNZ, P. L.; BLUM, J.W.; HART, I. C.; BICKEL, H.; LANDIS, J. Effects of different energy intakes before and after calving on food intake, performance and blood hormones and metabolites in dairy cows. *Animal Production*, v. 40, p. 219-231, 1985.

KUSENDA M. Insulin-Sensitivität und Insulin-Response nach einer einmaligen Dexamethasonbehandlung bei Milchkuhen in der Frühlaktation. Hannover (Germany): Klinik für Rinder, Tierärztliche Hochschule Hannover; 2010.

KWEON K, ONO J, OSASA K, et al. Factors affecting serum total cholesterol level of lactating Holstein cows. *Jpn J Vet Sci* 48:481-486, 1986.

KÖKOĞLU, E.; ULAKOĞLU, E. The transport of vitamin E in plasma and its correlation to plasma lipoproteins in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 14, n. 3, p. 175–181, 1991.

LAGER, K.; JORDAN, E. The metabolic profile for the modern transition dairy cow. *South Ruminant Nutrition Conference*. 2012 .

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

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? *Scientia Chromatographica*, v. 5, n. 1, p. 27–46, 2009.

LANG P.O., SAMARAS N., SAMARAS D., ASPINALL R. How important is Vitamin D in preventing infections? *Osteoporosis International*, 24, 1537-1553, 2013.

LAPILLONNE A. Vitamin D deficiency during pregnancy may impair maternal and fetal outcomes. *Medical Hypotheses*, 74, 71-75, 2010.

LEBLANC, S. J., DUFFIELD, T. F., LESLIE, K. E., BATEMAN, K. G., TENHAG, J., WALTON, J. S., & JOHNSON, W. H. The Effect of Prepartum Injection of Vitamin E On Health In Transition Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, v.85, n.6, 1416–26, 2002.

LEBLANC, S.J.; HERDT, T.H.; SEYMOUR, W.M.; DUFFIELD, T.F.; LESLIE, E. Peripartum serum vitamin E, retinol and beta-carotene in dairy cattle and their associations with disease. *Journal of Dairy Science*, v.87, p.609-619, 2004.

LEBLANC, S.J Adaptação da publicação de S. LeBlanc: Monitoramento da Saúde Metabólica de Gado de Leite Durante o Período de Transição. *Journal of Reproduction and Development*. 56, Suppl. S29 – 35, 2010. XVI Curso Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos – 2012.

LEE, C. Y.; MAN-FAN WAN, J. Vitamin E supplementation improves cell-mediated immunity and oxidative stress of Asian men and women. *The Journal of nutrition*, v. 130, n. 12, p. 2932–2937, 2000.

LEMIRE J.M., ARCHER D.C., BECK L. & SPIEGELBERG H.L. Immunosuppressive actions of 1,25(OH)2D3: preferential inhibition of Th1 functions. *J Nutr* 125, 1704S–1708S, 1995.

LEY, S. H. et al. Lower dietary vitamin E intake during the second trimester is associated with insulin resistance and hyperglycemia later in pregnancy. *European journal of clinical nutrition*, 2013.

LIMA, ALESSANDRA SILVA. Metabolismo oxidativo, perfil bioquímico e função de polimorfonucleares de vacas holandesas primíparas e múltiparas no periparto suplementadas com vitaminas ADE. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 118p., 2013.

LIN, H. V, REN, H., SAMUEL, V. T., LEE, H.-Y., LU, T. Y., SHULMAN, G. I, ACCILI, D. Diabetes in mice with selective impairment of insulin action in Glut4-expressing tissues. *Diabetes*; 60:700–709, 2011.

LITTLE, T.M.; HILLS, F.J. *Agricultural Experimentation – Design and Analysis*, New York: John Wiley & Sons, 350 p., 1978.

LIU, S.; LEI, J.; HANCOCK, S.; SCANLAN, V.; BROOMFIELD, S.; CURRIE, A.; THOMPSON, A. Lamb survival, glutathione redox state and immune function of neonates and lambs from periparturient Merino ewes supplemented with rumen-protected methionine. *Archives of Animal Nutrition*, v. 70, n. 5, p. 389–401, 2016.

LIU Q., LANARI M.C., SCHAEFER D.M. A review of dietary vitamin-e supplementation for improvement of beef quality. *Journal of Animal Science* 73, 3131–3140, 1995.

LOCKWOOD A., CURRIE A., HANCOCK S., BROOMFIELD S., LIU S., SCANLAN V., KEARNEY G. A., THOMPSON A. N. Supplementation of Merino ewes with cholecalciferol in late pregnancy improves the vitamin D status of ewes and lambs at birth but is not correlated with an improvement in immune function in lambs. *Animal Production Science* 56, 757-766, 2016.

LONG, N.M.; L.A., G.; D.T., S.; P.W., N.; S.P., F. Maternal Obesity (MO) and Nutrient Excess (NE) throughout gestation in the ewe increases appetite, adiposity and glucose intolerance in adult offspring. *Reproductive Sciences*, v. 17, n. 3, p. 221A, 2010.

LOOR, J.J., EVERTS, R.E., BIONAZ, M., DANN, H.M., MORIN, D.E., OLIVEIRA, R., RODRIGUEZ-ZAS, S.L., DRACKLEY, J.K. & LEWIN, H.A. Nutrition-induced ketosis alters metabolic and signaling gene networks in liver of periparturient dairy cows. *Physiological Genomics*, Vol. 32, pp. 105-116, 2007.

LORENZO, C.; WAGENKNECHT, L. E.; D'AGOSTINO, R. B.; REWERS, M. J.; KARTER, A. J.; HAFFNER, S. M. Insulin resistance, beta-cell dysfunction, and conversion to type 2 diabetes in a multiethnic population: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes care*, v. 33, n. 1, p. 67–72, 2010.

LOTFOLLAHZADEH, S.; ZAKIAN, A.; TEHRANI-SHARIF, M.; WATSON, D. G. Assessment the alterations of some biochemical parameters in Afshari sheep with possible metabolic disorders. *Small Ruminant Research*, v. 145, p. 58–64, 2016.

LUCY M.C., GREEN J.C., MEYER J.P., et al. Short communication: glucose and fructose concentrations and expression of glucose transporters in 4-to 6-week pregnancies collected from Holstein cows that were either lactating or not lactating. *J Dairy Sci* 95(9):5095–101, 2012.

LYKKESFELDT J., SVENDSEN O. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Vet. J. (London, England: 1997)* 173, 502—511. 2007.

MACHADO, U. F. Transportadores de glicose. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 42, n. 6, p. 413–421, 1998.

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

MAGGINI, S.; WINTERGERST, E. S.; BEVERIDGE, S.; HORNIG, D. H. Selected vitamins and trace elements support immune function by strengthening epithelial barriers and cellular and humoral immune responses. In: *British Journal of Nutrition*, SUPPL. 1, Anais...2007.

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

of Dairy Science, v.81, p. 585-595, 1998.

MANDL, M.; SCHMITZ, S.; WEBER, C.; HRISTOV, M. Characterization of the cd14++cd16+ monocyte population in human bone marrow. PLoS ONE, v. 9, n. 11, 2014.

MANNING, P.J.; SUTHERLAND, W.H.F.; WALKER, R.J.; WILLIAMS, S.M.; JONG, S.A.; RYALLS, A.R.; BERRY, E.A. Effect of high-dose vitamin E on insulin resistance and associated parameters in overweight subjects. Diabetes Care, v.27, p.2166-2171, 2004.

MARTIN, A.; FOXALL, T.; BLUMBERG, J. B.; MEYDANI, M. Vitamin E inhibits low-density lipoprotein-induced adhesion of monocytes to human aortic endothelial cells in vitro. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, v. 17, n. 3, p. 429–436, 1997.

MATTERI, R.L.; CARROLL, J.A. AND DYER, C.J. Neuroendocrine responses to stress. In: The biology of animal stress. Cabi Publishing. Wallingford. UK. pp. 43-76, 2000.

MATHIEU C, WAER M, LAUREYS J, RUTGEERTS O, BOUILLON R. Prevention of autoimmune diabetes in NOD mice by 1, 25 dihydroxyvitamin D₃. Diabetologia, 37:552–8, 1994.

MATSUBARA, C.; NESHIKAWA, Y.; YOSHIDA, Y.; TATEMURA, K. A Spectrophotometric method for the determination of free fatty acid in serum using acyl-coenzyme A synthetase and acyl-coenzyme A oxidase. Analytical Biochem. v.130(1). P.128-133, 1983.

MAYER CM, BELSHAM DD. Central insulin signaling is attenuated by long-term insulin exposure via insulin receptor substrate-1 serine phosphorylation, proteasomal degradation, and lysosomal insulin receptor degradation. Endocrinology, 151(1):75-84, 2010.

MCDOWELL L.R., WILLIAMS S.N., HIDIROGLOU N., NJERU C.A., HILL G.M., OCHOA L., WILKINSON N.S. Vitamin E supplementation for the ruminant. Animal Feed Science and Technology 60, 273–296, 1996.

MCFARLANE A., COGHLAN J., TRESHAM J., WINTOUR E.M. Corticotropin-releasing factor alone, but not arginine vasopressin alone, stimulates the release of adrenocorticotropin in the conscious intact sheep. Endocrinology 136:1821-1827, 1995.

MCMURRAY, C.H.; BLACHFLOWER, W.J.; RICE, D.A. automated kinetic method for d-3-hydroxybutyrate in plasma or serum. Clin Chem., v.30 (3), 1984.

MEYDANI SM and BEHARKA AA. Recent developments in vitamin E and immune response. Nutrition Reviews 56, S49–S58, 1996.

MENGE C.; NEUFELD B.; HIRT W.; SCHMEER N.; BAUERFEIND R.; BALJER G.;

WIELER L.H. Compensation of preliminary blood phagocyte immaturity in the newborn calf. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.62, n.4, p.309- 321, 1998.

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

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

MEHRZAD, J. et al. Viability of milk neutrophils and severity of bovine coliform mastitis. *Journal of Dairy Science*, v.87, p.4150-4162, 2004.

MEHRZAD, J. et al. High milk neutrophil chemiluminescence limits the severity of bovine coliform mastitis. *Veterinary Research*, v.36, p.101-116, 2005.

MICHAYLOVA, V.; ILKOVA, P. Photometric determination of micro amounts of calcium with arsenazo iii. *Anal Chem Acta*. v.53(1). p.194-198, 1971.

MIDTTUM, O.; UELAND, P.M. Determination of vitamins A, D and E in a small volume of human plasma by a high-throughput method based on liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*, v. 25, 1942–1948, 2011.

MILINKOVIĆ-TUR S, PERIĆ V, STOJEVIĆ Z, ZDELAR-TUK M, PIRŠLJIN J Concentrations of total proteins and albumins, and AST, ALT and GGT activities in the blood plasma of mares during pregnancy and early lactation. *Veterinarski arhiv* 75: 195-202, 2005.

MILLER, J. K.; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E.; MADSEN, F. C. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *Journal of dairy science*, v. 76, p. 2812–2823, 1993.

MITRI, J., PITTAS, A.G. Vitamin D and diabetes. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, 43, 205-232, 2014.

MOHAMMADI, V., ANASSORI, E., & JAFARI, S. Measure of energy related biochemical metabolites changes during peri-partum period in Makouei breed sheep. *Veterinary Research Forum: An International Quarterly Journal*, 7(1), 35–9, 2016.

MORGANTE, M.; BEGHELLI, D.; PAUSELLI, M.; DALL'ARA, P.; CAPUCCELLA, M.; RANUCCI, S. Effect of administration of vitamin E and selenium during the dry period on mammary health and milk cell counts in dairy ewes. *Journal of dairy science*, v. 82, n. 3, p. 623–31, 1999.

MOKHTARI, Z., HEKMATDOOST, A., NOURIAN, M. Antioxidant efficacy of vitamin D. *J. Parathy. Dis.* 5, 11–16, 2016.

MOZAFFARI-KHOSRAVI, H., HOSSEINZADEH-SHAMSI-ANAR, M., SALAMI, M.A., HADINEDOUSHAN, H., MOZAYAN, M.R. Effects of a single post-partum injection of a high dose of vitaminD on glucose tolerance and insulin resistance in mothers with first-time gestational diabetes mellitus. *Diabet. Med.* 29, 36–42, 2012.

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

MUKHOPADHYAY, S.; CHATTERJEE, M. Vitamin D3 as a modulator of cellular antioxidant defence in murine lymphoma. *Nutrition Research*, V. 20, N. 1, p. 91-102, 2000.

MUNIYAPPA R, LEE S, CHEN H, et al. Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*;294(1): E15–26, 2008.

MUTINATI, M. et al. Oxidative stress during pregnancy in the sheep. *Reproduction in domestic animals. Zuchthygiene*, v.48, n.3, p.353, 2013.

NABENISHI, H.; YAMAZAKI, A. Decrease in body surface temperature before parturition in ewes. *Journal of Reproduction and Development*, v.63, n.2, p.185-197, 2017.

NANDA, A. S., H. DOBSON, AND W. R. WARD. Relationship between an increase in plasma cortisol during transport-induced estresse and failure of oestradiol to induce a luteinising hormone surge in dairy cows. *Res. Vet. Sci.* 49:25-28, 1990.

NASCIMENTO, Priscilla Marques do. Metabolismo oxidativo e perfil bioquímico de ovelhas Santa Inês no período periparto: efeito da suplementação com vitamina E. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 185p., 2012.

NASCIMENTO, P. M.; MORGADO, A. A.; NUNES, G. R.; NIKOLAUS, J. P.; WEIGEL, R. A.; LIMA, A. S.; STORILLO, V. M.; MORI, C. S.; SUCUPIRA, M. C. A. Metabolismo oxidativo e perfil bioquímico de ovelhas santa inês no período periparto: Efeito da suplementação parenteral com vitamina E. *Semina: Ciencias Agrárias*, v. 36, n. 3, p. 1397–1407, 2015.

NAZIROĞLU, M.; ÇAY, M. Protective role of intraperitoneally administered vitamin E and selenium on the antioxidative defense mechanisms in rats with diabetes induced by streptozotocin. *Biological Trace Element Research*, v. 79, n. 2, p. 149–159, 2001.

NAYYAR, S.; JINDAL, R. Essentiality of antioxidant vitamins for ruminants in relation to stress and reproduction *Iranian Journal of Veterinary Research*, 2010.

NAZIFI S, KARIMI T, GHASRODASHTI A. R. Diabetes mellitus and fatty liver in a cow: case report. *Comp Clin Pathol* 13(2):82–5, 2004.

NEGRAO J.A., MARNET P.G. Milk yield, residual milk, oxytocin and cortisol release during machine milking in Gir, Gir x Holstein and Holstein cows. *Reprod Nutr Dev.*,46:77–85, 2006.

NRC 'Nutrient requirements of small ruminants sheep, goats, cervids, and new world camelids.' (National Academies Press: Washington, DC), 2007.

NELSON, C. D.; REINHARDT, T. A.; LIPPOLIS, J. D.; SACCO, R. E.; NONNECKE, B. J. Vitamin D signaling in the bovine immune system: A model for understanding human vitamin D requirements. *Nutrients* v.4(3), 181-196, 2012 .

OLIVEIRA, D.R. Índices produtivos e perfil metabólico de ovelhas Santa Inês no pós-parto, criadas na microregião Bragantina do Estado do Pará, Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Fluminense, 113p., 2010.

OLIVEIRA, R.P.M.; MADURO, A.H.P.; LIMA, E.S.; OLIVEIRA, F.F. Perfil metabólico de ovelhas Santa Inês em diferentes fases de gestação criadas em sistema semi-intensivo no estado do Amazonas. *Ciência Animal Brasileira*, v.15, p.81-86, 2014.

OLIVEIRA, R.P.M. DE, ASSANTE, R.T., SILVA, A.F., OLIVEIRA, F.F. DE, CRUZ, F.G.G., RUFINO, J.P.F. Avaliação do perfil metabólico em diferentes fases do periparto de ovelhas Santa Inês na Amazônia Ocidental. *Rev. Bras. Saude e Prod. Anim.* 17, 37–44, 2016.

ORTOLANI, E. L. Doenças carenciais e metabólicas em caprinos: urolitíase e Toxemia da Prenhez, In: Encontro Nacional para o Desenvolvimento da Espécie Caprina, 3, 1994. Anais... Jaboticabal: UNESP, 197p., 1994.

ORTOLANI, E.L.; BENESI, F.J. Ocorrência de toxemia da prenhez em cabras (*Capra hircus*, L) e ovelhas (*Ovis Áries*, L) criadas no estado de São Paulo, Brasil. *Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, São Paulo*, v.26, p.229-234, 1989.

ÖZTABAK K, CIVELEK S, OZPINAR A, BURCAK G, ESEN F. The effects of energy restricted diet on the activities of plasma Cu-Zn SOD, GSH-Px, CAT and TBARS concentrations in late pregnant ewes. *Turk J Vet Anim Sci.*; 29:1067–1071, 2005.

PAGLIA, D.E.; VALENTINE, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, v.70(1). p.158-169, 1967.

PAIVA, F. de; NEGRÃO, J.; NETTO, A. Efeito do manejo de aleitamento nos níveis de cortisol no metabolismo e na produção de leite de vacas holandesas. *R. Bras. Zootec*, 2006.

PANOUSIS, N., N. ROUBIES, H. KARATZIAS, S. FRYDAS, AND A. PAPASTERIADIS. Effect of selenium and vitamin E on antibody production by dairy cows vaccinated against *Escherichia coli*. *Vet. Rec.* 149:643-646, 2001.

PAAPE, M., J. MEHRZAD, X. ZHAO, J. DETILLEUX, and C. BURVENICH. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. 7:109-121, 2002.

PARK, Y. H., L. K. FOX, M. J. HAMILTON, and W. C. Daws. Bovine mononuclear leukocyte subpopulations in peripheral blood and mammary gland secretions during lactation. *J. Dairy Sci.* 75:998–1006, 1992.

PASSI, S., A. STANCATO, and M. Cocchi. Monitoring of oxidative stress of ageing and ageing-related diseases. *Prog. Nutr.* 3:35–58, 2001.

PATHAN, M. M. PRODUCTION Antioxidant Status in parturient Meshana buffaloes. In: *Anais...*2010.

PAUL, S.S. and DEY, A. Nutrition in health and immune function of ruminants. *Indian Journal of Animal Sciences*, 85(2), 103-112, february/2015.

PAULSON, S.R.; LANGMAN, C.B. Plasma vitamin d metabolite levels in pregnant and nonpregnant. *Camp. Biochem. Physiol.* v.96(2), p.347-349, 1990.

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

PAYNE, J.M.; SALLY, M.; DEW, M.; MANSTON, R.; FAULKES, M. The Use of The Metabolic Profiles Test in Dairy Herds. V. 87, p. 150-158, 1970

PERSEGHIN, G; CAUMO, A; CALONI, M; TESTOLIN, G; AND LUZI, L. 2001. Incorporation of the fasting plasma FFA concentration into QUICKI improves its association with insulin sensitivity in nonobese individuals. *J. Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 86, 4776-4781, 2001.

PETTERSON J.A., DUNSHEA F.R., EHRHARDT R.A., et al. Pregnancy and undernutrition alter glucose metabolic responses to insulin in sheep. *J Nutr.*,123(7): 1286–95, 1993.

PETTERSON, J. A., R. SLEPETIS, R. A. EHRHARDT, F. R. DUNSHEA, AND A. W. BELL. Pregnancy but not moderate undernutrition attenuates insulin suppression of fat mobilization in sheep. *J. Nutr.* 124:2431-2442. 1994.

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

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

POMEROY, B.; SIPKA, A.; HUSSEN, J.; EGER, M.; SCHUKKEN, Y.; SCHUBERTH, H. J. Counts of bovine monocyte subsets prior to calving are predictive for postpartum occurrence of mastitis and metritis. *Veterinary research*, v. 48, n. 1, p. 13, 2017.

PRADHAN, R.; OSHIMA, K.; OCHIAI, Y.; KOJIMA, T.; YAMAMOTO, N.; GHANEM, M. E.; NAKAGOSHI, N. Effect of total cholesterol, glucose and blood urea nitrogen on embryo quality in post-partum superovulated suckling Japanese Black cattle. *Reproductive Medicine and Biology*, v. 7, n. 2, p. 55–62, 2008.

PRINCEN, H.M.G.; DUYVENVOORDE, W.V.; BUYTENHEK, R.; LAARSE, A.V.D.; GEERT, V.P.; LEUVEN, J.A.G.; HINSBERGH, V.W.M.V. Supplementation with low doses of vitamin E protects LDL from lipid peroxidation in men and woman. *Atherosclerosis, thrombosis and vascular biology*, v.15, p.325-333, 1995.

PUIGSERVER, P., RHEE, J., LIN, J., WU, Z., YOON, J.C., ZHANG, C-Y., KRAUSS, S., MOOTHA, V. K., LOWELL, B.B. & SPIEGELMAN, B.M. Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPAR γ coactivator-1. *Molecular cell*, 8(5):971-982, 2001.

PÖRTNER, H. O. Climate-dependent evolution of Antarctic ectotherms: an integrative analysis. *Deep Sea Res. II Top. Stud. Ocean.* 53, 1071-1104, 2006.

QUARTERMAN, J.; DALGARNO, A.C.; ADAM, A. Some factors affecting the level of vitamin D in the blood of sheep. *British Journal of Nutrition*. v. 18, p.79-89, 1964.

RAOOFI, A., JAFARIAN, M., SAFI, S., VATANKHAH, M. Fluctuations in energy-related metabolites during the peri-parturition period in Lori-Bakhtiari ewes. *Small Rumin. Res.* 109:64–68, 2013.

RABASA-LHORET R., BASTARD J.P., JAN V., et al. Modified quantitative insulin sensitivity check index is better correlated to hyperinsulinemic glucose clamp than other fasting-based index of insulin sensitivity in different insulin-resistant states. *J Clin Endocrinol Metab.*;88(10):4917–23, 2003.

RADOSTITIS, O.M. et al. *Veterinary medicine. A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10.ed. London: Saunders, 2065p., 2007.

RAO, K. AND BULLOCK, T. Q10 as a function of size and habitat temperature in poikilotherms. *Am. Nat.* 88, 33-44, 1954.

REBELATO E. Redox Modulation in Pancreatic Islets and its Implication for Insulin Secretion 2010. 178 f. [thesis (PhD in Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

REDDEN, R. R.; KOTT, R. W.; BOLES, J. a; LAYTON, a W.; HATFIELD, P. G. Effects of late gestation supplementation of rumen undegradable protein, vitamin E, zinc, and chlortetracycline to ewes on indices of immune transfer and productivity. *Journal of animal science*, v. 88, n. 3, p. 1125–34, mar. 2010.

REECE, W.O. *Dukes: Fisiologia dos Animais Domésticos*. Tradução de Ana Maria Nogueira Pinto Quintanilha, Anita Alves Sampaio, Cid Figueiredo, Mauro Rodrigues de Oliveira, Newton da Cruz Rocha e Rita Leal Paixão; Revisão de Newton da Cruz Rocha. 12a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007, 926p.

REGNAULT, T.R.H.; ODDY, H.V.; NANCARROW, C. et al. Glucose-stimulated insulin response in pregnant sheep following acute suppression of plasma non-esterified fatty acid concentrations. *Rep. Biol. End.*, v.2, p.64, 2004.

REMESY, C.; CHILLIARD, Y.; RAYSSIGUIER, Y.; MAZUR, A.; DEMIGNE, C. *Reproduction Nutrition Development*, 26, 1B, 205-226, 1986.

RIBEIRO, L.A.O. Perdas reprodutivas em ovinos no Rio Grande do Sul determinadas pelas condições nutricionais e de manejo no encarneamento e na gestação. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil 106f, 2002.

RIBEIRO, L.A.O.; GONZÁLEZ, F.H.D.; CONCEIÇÃO, T.R. et al. Perfil metabólico de borregas Corriedale em pastagem nativa do Rio Grande do Sul. *Acta Scientiae Veterinariae*. v. 31, n. 3, p. 167-170, 2003.

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

RIZZO, A.; MUTINATI, M.; SPEDICATO, M.; MINOIA, G.; TRISOLINI, C.; JIRILLO, F.; SCIORSCI, R. L. First demonstration of an increased serum level of reactive oxygen species during the periparturient period in the ewes. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, v. 30, n. 4, p. 741–6, jan. 2008.

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

ROCK M.J., KINCAID R.L., CARSTENS G.E. Effects of prenatal source and level of dietary selenium on passive immunity and thermometabolism of newborn lambs. *Small Ruminant Research* 40, 129–138, 2001.

RODRIGUES, C.A.F., RODRIGUES, M.T., BRANCO, R.H., DE QUEIROZ, A.C., DE ARAÚJO, C.V. Influência da condição corporal e da concentração de energia nas dietas no parto sobre o desempenho de cabras em lactação. *Rev. Bras. Zootec.* 35, 1560–1567, 2006.

RODRIGUES, C. A. F.; RODRIGUES, M. T.; BRANCO, R. H.; CARVALHO, G. R. TORRES, R. A.; TORRES FILHO, R. A. Avaliação do consumo e de metabólitos plasmáticos de cabras gestantes com duas condições corporais alimentadas com dietas formuladas com diferentes níveis de energia. *R. Bras. Zootec.*, v.36, n.4, p.945-952, 2007.

ROOK, J. S. Pregnancy Toxemia of Ewes, Does and Beef Cows. *Veterinary Clinics of North America, Food Animal and Practice*, v. 16, n. 2, p. 203-317, 2000.

ROOKE, J, A. et al. Effects of vitamin E and selenium on the performance and

immune status of ewes and lambs. *Journal Agricultural Science*, v.142, p.253-262, 2004.

ROOKE, J. A.; MATHESON, S.; ISON, S.; JACK, M.; ASHWORTH, C. J.; DWYER, C. M. The effect of late pregnancy supplementation of ewes with vitamin E on lamb vigouranimal, 2009.

ROTH HJ, SCHMIDT-GAYK H, WEBER H, NIEDERAU C. Accuracy and clinical implications of seven 25-hydroxyvitamin D methods compared with liquid chromatography–tandem mass spectrometry as a reference. *Ann Clin Biochem.*;45:153-9, 2008.

ROUBIES, N., PANOUSIS, N., FYITIANOU, A., KATSOULOS, P.D., GIADINIS, N., KARATZIAS, H. Effects of age and reproductive stage on certain serum biochemical parameters of Chios sheep under Greek rearing conditions. *J. Vet. Med. A.* 53:277-281, 2006.

RUKKWAMSUK T., WENSING T., KRUIP T.A.M. Relationship between triacylglycerol concentration in the liver and first ovulation in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, 51, 1133–1142, 1999.

RUSSEL, A.J.F. The nutrition of the pregnant ewe. In: British Council. The management and diseases of sheep. Edinburg, 1979.

RUSSEL, K.E.; ROUSSEL, A.J. Evaluation of the ruminant serum chemistry profile. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.23, p.403-426, 2007.

RUSSEL, A.J.F. Body condition scoring of sheep. *In Practice*, v.6, p.91-93, 1984.

RUTTER, G.A.; TSUBOI, T.; RAVIER, M.A. Ca²⁺ microdomains and the control of insulin secretion. *Cell Calcium*, v.40, p.539-551, 2006.

RYAN, JENNIFER M.M.B.B.S.; HENEGHAN, MICHAEL A. M.D. Pregnancy and the liver, CLD - Clinical liver disease V. 4(3), 51-54,2014

SÁ, H.M.; TELES, T.L.; BORGES; MACEDO JUNIOR, G.L.; SILVA, S.P. Perfil metabólico em ovinos alimentados com inclusões crescentes da torta do babaçu na dieta. *Veterinária Notícias*, v.20, p.48-56, 2014.

SAAD, A.M., CONCHA, C., ÅSTRÖM, G. Alterations in neutrophil phagocytosis and lymphocyte blastogenesis in dairy cows around parturition. *J. Vet. Med. Ser. B* 36, 337–345,1989.

SAMPAIO, I.B.M. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998, 221 p.

SANTOS, F.C.O.; MENDONÇA, C.L.; SILVA FILHO, A.P.; CARVALHO, C.C.D.; SOARES, P.C.; AFONSO, J.A.B. Indicadores bioquímicos e hormonais de casos naturais de toxemia da prenhez em ovelhas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.31, p. 974-980, 2011.

SANTOS, R. M.; VASCONCELOS, J. L. M. Consequências do estresse sobre imunidade, metabolismo e desempenho de vacas peri-parto - Parte 2. (Este texto é a parte da palestra apresentada pelo Dr. Ricardo C. Chebel da Universidade de Minnesota, no XVIII Curso Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos, realizado em Uberlândia de 20 e 21 de março de 2014. (10/10/2014 www.MILKPOINT.com.br)

SARGISON, N.D. Pregnancy toxemia. In: Aitken, I.D. (Ed.), *Diseases of Sheep*, 4th ed. Blackwell, Oxford, pp. 359–363, 2007.

SARGISON N.D., SCOTT P.R., PENNY C.D., PIRIE R.S. & KELLY J.M. Plasma enzymes and metabolites as potential prognostic indices of ovine pregnancy toxemia: A preliminary study. *Brit. Vet. J.* 150(3):271-277, 1994.

SASAKI S. Mechanism of insulin action on glucose metabolism in ruminants. *Anim Sci J.*;73(6):423–33, 2002.

SAUTIN, Y. Y.; JOHNSON, R. J. Uric acid: The oxidant-antioxidant paradox. In: *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 6–7, Anais...2008.

SATO, H.; MOHAMED, T.; GOTO, A.; OIKAWA, S.; KUROSAWA, T. Fatty acid profiles in relation to triglyceride level in the liver of dairy cows. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*, v. 66, n. 1, p. 85–7, 2004.

SCHAAN, B. D. O papel da proteína quinase C no desenvolvimento das complicações vasculares do diabetes mellitus. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 47, n. 6, p. 654–662, 2003.

SCHELLING, G. T.; ROEDER, R. A.; GARBER, M. J.; PUMFREY, W. M. Bioavailability and Interaction of Vitamin A and Vitamin E in Ruminants. *The Journal of Nutrition*, v. 125, p. 1799–1803, 1995.

SCHENCK, Patricia A.; CHEW, Dennis J.; NAGODE, LARRY A.; ROSOL, Thomas J. Disorders of Calcium: Hypercalcemia and Hypocalcemia. In: DIBARTOLA, Stephen P. *Fluid, Electrolytes, and Acid-Base Disorders in Small Animal Practice*. St. Louis: Elsevier, 2006.

SCHLUMBOHM, C.; HARMEYER, J. Hypocalcemia reduces endogenous glucose production in hyperketonemic sheep. *J. Dairy Sci.*, v.86, p.1953- 1962, 2003.

SCHLUMBOHM, C.; HARMEYER, J. Twin-pregnancy increases susceptibility of ewes to hypoglycaemic. *Research in Veterinary Science*, 2007.

SCHLUMBOHM, C.; HARMEYER, J. Twin pregnancy increases susceptibility of ewes to hypoglycaemic stress and pregnancy toxemia. *Research in Veterinary Science*, v. 84, p. 286- 299, 2008.

SCHLUMBOHM, C.; HARMEYER, J. Hyperketonemia Impairs Glucose Metabolism in Pregnant and Nonpregnant Ewes. *Journal of Dairy Science*, v. 87, n. 2, p. 350–358, 2004.

SCHMIDT, M. I.; REICHELT, A. J. Consenso sobre diabetes gestacional e diabetes pré-gestacional. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 43, n. 1, p. 14–20, 1999.

SCHMITT, E. et al. Calcium and insulin correlation during the glucose tolerance test in pregnant non-pregnant ewes. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 64, n. 5, p. 1127–1132, 2012.

SCHOENBERG KM, PERFIELD KL, FARNEY JK, BRADFORD BJ, BOISCLAIR YR, OVERTON TR. Effects of prepartum 2,4-thiazolidinedione on insulin sensitivity, and leptin, and adipose tissue gene expression. *J Dairy Sci.*, 94:5523–5532, 2011.

SCHOENBERG K.M., EHRHARDT R.M., OVERTON T.R. Effects of plane of nutrition and feed deprivation on insulin responses in dairy cattle during late gestation. *J Dairy Sci*; 95(2):670–82, 2012.

SERGEEV, I.N., IU, P.A., SPIRICHEV, V.B. The role of vitamin E in metabolism and reception of vitamin D. *Biokhimiia* 55, 1989–1995, 1990.

SGORLON, S.; FANZAGO, M.; GUIATTI, D.; GABAI, G.; STRADAIOLI, G.; STEFANON, B. Factors affecting milk cortisol in mid lactating dairy cows. *BMC Veterinary Research*, v. 11, n. 1, 2015.

SHARMA, A.; KHARB, S.; CHUGH, S. N.; KAKKAR, R.; SINGH, G. P. Evaluation of oxidative stress before and after control of glycemia and after vitamin E supplementation in diabetic patients. *Metabolism: Clinical and Experimental*, v. 49, n. 2, 2000.

SHORTEN P.R.; PLEASANTS, A. B.; BUCKELS, E. J.; JAQUIERY, A. L.; BOSTON, R. C.; ALSWEILER, J. M. Determining insulin sensitivity from glucose tolerance tests in sheep. *J. Anim. Sci.*, 94:3711–3721, 2016.

SHRESTHA, H.K.; NAKAO, T.; SUZUKI, T.; AKITA, M.; HIGAKI, T. Relationships between body condition score, body weight, and some nutritional parameters in plasma and resumption of ovarian cyclicity postpartum during pre-service period in high-producing dairy cows in a subtropical region in Japan. *Theriogenology*. v. 64, p. 855–866, 2005.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. *Eur. L. Biochem.* v. 215, p. 213–219, 1993.

SILVA da, J. S. C.; GUARANÁ, E. L. d. S.; LEMOS, V. F.; SOARES, P. C.; AFONSO, J. A. B.; DE MENDONÇA, C. L. Metabolismo energético, proteico e mineral de ovelhas santa inês híidas e com mastite subclínica. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, v. 33, n. 9, p. 1087–1096, 2013.

SINGH, U.; DEVARAJ, S.; JIALAL, I. VITAMIN E, OXIDATIVE STRESS, AND INFLAMMATION. *Annual Review of Nutrition*, v. 25, n. 1, p. 151–174, 2005.

SMITH, M.C.; SHERMAN, D.M. *Goat medicine*. Philadelphia: Lea & Febiger, 620p, 1994.

SMITH, B. P. *Medicina Interna de Grandes Animais*. 3. Barueri: Manole. 1728 p., 2006.

SOMMERFELDT, J.L.; NAPOLI, J.L.; LITTLEDIKE, E.T.; HORST, R.L. Metabolism of orally administered cholecalciferol by dairy cows. *J. Nutr.* v.113, p.2595, 1983.

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

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. SAS/STAT. Guide of personal computers. Version 9.0. Inc., Cary, NC.

STEIN, W. Creatine Kinase (total activity), creatine Kinase isoenzymes and variants. In: Thomas L, ed. *Clinical laboratory diagnostics* Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft; p.71- 80, 1998.

STENGÄRDE L, HOLTENIUS K, EMANUELSON U, HULTGREN J, NISKANEN R, TRÄVÉN M. Blood parameters in Swedish dairy herds with high or low incidence of displaced abomasum or ketosis. *Vet J.*, 190:124–130, 2011

STERNDAL, S.; BROOMFIELD, S.; CURRIE, A.; HANCOCK, S.; KEARNEY, G. A.; LEI, J.; LIU, S.; LOCKWOOD, A.; SCANLAN, V.; SMITH, G.; THOMPSON, A. N. Supplementation of Merino ewes with vitamin E plus selenium increases α -tocopherol and selenium concentrations in plasma of the lamb but does not improve their immune function. *Animal*, p. 1–9, 2017.

SUCUPIRA, M. C. A. Administração parenteral do complexo vitamínico ADE no pré-parto e sua interferência no parto de ovelhas da raça Santa Inês. Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Professor Livre-Docente em Clínica das Doenças Nutricionais e Metabólicas, junto ao Departamento de Clínica Médica. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 2015.

SUNG, C.-C., LIAO, M.-T., LU, K.-C., & WU, C.-C. Role of vitamin D in insulin resistance. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 1–11, 2012.

SUSIN, I. Exigências nutricionais de ovinos e estratégias de alimentação. In: SILVA SOBRINHO, A.G.; BATISTA, A. M. V.; SIQUEIRA, E. R. (Ed.). *Nutrição de ovinos*. Jaboticabal: Funep, p. 119-141, 1996.

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

SZASZ, G. Gamma-Glutamyltranspeptidase. In: Bergmeyer HU. Methoden der enzymatischen Analyse. Weinheim: Verlag Chemie, p.757, 1974.

SZODORAY P, NAKKEN B, GAAL J, JONSSON R, SZEGEDI A, ZOLD E et al. The complex role of vitamin D in autoimmune diseases. Scand J Immunol, 68(3):261-9, 2008.

TAI, K.; NEED, A.G.; HOROWITZ, M.H.; CHAPMAN, I.M. Vitamin D, glucose, insulin and insulin sensitivity. Nutrition, v.24, p.279-285, 2008.

TALAEI, A.; MOHAMADI, M.; ADGI, Z. The effect of vitamin D on insulin resistance in patients with type 2 diabetes. Diabetology & Metabolic Syndrome, v.5, p. 1-5, 2013.

TALKE, H.; SCHUBERT, G.E. Enzymatic urea determination in the blood and serum in the warburg optical test. Klin wochenschr. v.43, p.174-175, 1965.

TANIYAMA H, SHIRAKAWA T, FURUOKA H, et al. Spontaneous diabetes-mellitus in young cattle histologic, immunohistochemical, and electron-microscopic studies of the islets of Langerhans. Vet Pathol 30(1):46–54, 1993.

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

TIZARD, I.R. Imunologia veterinária: introdução. 9. ed. São Paulo: Elsevier, 533p., 2014.

THOMAS, M.J. The role of free radicals and antioxidants. Nutri., London, v.16 (7), p.716-718, 2000.

THOMAS V.M., ROADER B., BOHN G., KOTT R.W. and EVANS T. The influence of late pregnancy feeding with Vitamin E on lamb mortality and ewe productivity. Proceedings of the Western Section American Society of Animal Science 46, 91–94, 1995.

THRALL M.A. et. al. Hematologia e bioquímica clínica veterinária, 2 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2015.

THRALL, Mary Anna et al. Hematologia e bioquímica clínica veterinária: Metabolismo de Flúídos e Eletrólitos. Tradução de Diogo Scuta Fagliari. São Paulo: Roca, 324 p., 2007.

TODD, S. E.; OLIVER, M. H.; JAQUIERY, A. L.; BLOOMFIELD, F. H.; HARDING, J. E. Periconceptional undernutrition of ewes impairs glucose tolerance in their adult offspring. Pediatric Research, v. 65, n. 4, p. 409–413, 2009.

TRABER, M.G. AND JIALAL, I. Measurement of lipid-soluble vitamins – Further adjustment needed? Lancet 355, 2013 – 4, 2000.

TREVISAN, M.; BROWNE, R.; RAM, M.; MUTI, P.; FREUDENHEIM, J.; CAROSELLA, A. M.; ARMSTRONG, D. Correlates of markers of oxidative status in the general population. *American journal of epidemiology*, v. 154, n. 4, p. 348–56, 2001.

TREVISI, E.; AMADORI, M.; COGROSSI, S.; RAZZUOLI, E.; BERTONI, G. Metabolic stress and inflammatory response in high-yielding, periparturient dairy cows. *Research in Veterinary Science*, v. 93, n. 2, p. 695-704, 2012.

TREVISI, E.; ZECCONI, A.; BERTONI, G.; PICCININI, R. Blood and milk immune and inflammatory profiles in periparturient dairy cows showing a different liver activity index. *Journal of Dairy Research*, v. 77, n. 3, p. 310–317, 2010.

TURK, M. J.; GUEVARA-PATIÑO, J. A.; RIZZUTO, G. A.; ENGELHORN, M. E.; HOUGHTON, A. N. Concomitant Tumor Immunity to a Poorly Immunogenic Melanoma Is Prevented by Regulatory T Cells. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 200, n. 6, p. 771–782, 2004.

TÜZÜN A, ERDİL A, İNAL V, AYDIN A, BAGCI S, YESİLOVA Z, SAYAL A, KARAEREN N, DAGALPK. Oxidative Stress and Antioxidant Capacity in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Clin. Bioch.* 35, 569-572, 2002.

UNDERWOOD, E.J. e SUTTLE, N.F. *The Mineral Nutrition of Livestock*, 4 ed, CABI Publishing, 2010.

VAN KAMPEN, C.; MALLARD, B. A. Effects of peripartum stress and health on circulating bovine lymphocyte subsets. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 59, n. 1–2, p. 79–91, 1997.

VAZQUEZ-ANON, M., S. J. BERTICS, M. LUCK, AND R. R. GRUMMER. Peripartum liver triglyceride and plasma metabolites. *J. Dairy Sci.* 77:1521-1528. 1994.

VENUGOPAL, S. K.; DEVARAJ, S.; YANG, T.; JIALAL, I. Alpha-tocopherol decreases superoxide anion release in human monocytes under hyperglycemic conditions via inhibition of protein kinase C- α . *Diabetes*, v. 51, n. 10, p. 3049–3054, 2002.

VERBEEK, E.; OLIVER, M. H.; WAAS, J. R.; MCLEAY, L. M.; BLACHE, D.; MATTHEWS, L. R. Reduced cortisol and metabolic responses of thin ewes to an acute cold challenge in mid-pregnancy: Implications for animal physiology and welfare. *PLoS ONE*, v. 7, n. 5, 2012.

VERNON, R.G. Homeorhesis. In *Yearbook*, [E Taylor, editor]. Ayr, Scotland: Hann. Res. Inst., p. 64– 73, 1998.

VERNON R.G., FAULKNER A, HAY W.W., et al. Insulin resistance of hindlimb tissues in vivo in lactating sheep. *Biochem J*;270(3):783–6, 1990.

VERNON R.G., TAYLOR E. Insulin, dexamethasone and their interactions in the control of glucose-metabolism in adipose-tissue from lactating and non-lactating sheep. *Biochem J*;256(2):509–14, 1988.

VISIOLI F, KEANEY JF, HALLIWELL B. Antioxidants and Cardiovascular disease; pancreas or tonics for tired sheep. *Cardiovasc. Res.*, 47: 409-412, 2000.

WAJCHENBERG, B. L.; SANTOMAURO, A. T. M. G.; NERY, M.; SANTOS, R. F.; SILVA, M. E. L. R.; URSICH, M. J. M.; ROCHA, D. M. Resistência à insulina: métodos diagnósticos e fatores que influenciam a ação da insulina. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 43, n. 2, p. 76–85, 1999.

WALLER K.P. Mammary gland immunology around parturition. Influence of stress, nutrition and genetics. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 480, 231–245, 2000.

WALTERS, A.H.; BAILEY, T.L.; PEARSON, R.E.; GWAZDAUSKAS, F.C. Parity-related changes in bovine follicle and oocyte populations, oocyte quality, and hormones to 90 Days postpartum. *J. Dairy Sci.*, v.85, p.824–832, 2002.

WALZ, H.A.; WIERUP, N.; VIKMAN, J. et al. β -cell PDE3B regulates Ca^{2+} -stimulated exocytosis of insulin. *Cel. Signalling*, v.19, p.1505-1513, 2007.

WANG, L.A.; GOONEWARDENE, Z. The use of MIXED models in the analysis of animal experiments with repeated measures data. *Canadian Journal of Animal Science*, v.84, p.1-11, 2004.

WEICHSELBAUM, T.E. An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. *American Journal of Clinical Pathology* v.10, p.40-49, 1946.

WEIGEL, R. A.; LIMA, A. S.; MORGADO, A. A.; NUNES, G. R.; MIRIAM, M. M.; HAGEN, S. F.; FERNANDES, W. R.; SUCUPIRA, M. C. A. Oxidative metabolism and muscle biochemical profile of polo horses supplemented with an ADE vitamin complex. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, v. 33, n. SUPPL.1, p. 58–62, 2013.

WEISS, W. P. Vitamin E Requirements for Protection of Dairy Cows Against Infections At Parturition. A. L. Moxon Honorary Lectures, Special Circular 167- 99, 1990.

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

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

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

WHITE CL, REWELL L. Vitamin E and selenium status of sheep during autumn in Western Australia and its relationship to the incidence of apparent white muscle disease. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 47, 535-543, 2007.

WHITNEY, T. R., D. F. WALDRON AND T. D. WILLINGHAM, Evaluating nutritional status of Dorper and Rambouillet ewes in range sheep production. *Sheep Goat Res. J.*, 24: 10-16, 2009.

WISE, M.E.; ARMSTRONG, D.V.; HUBER, J.T.; HUNTER, R.; WIERSMA, F. Hormonal alterations in the lactating dairy cow in response to thermal stress. *Journal of Dairy Science*, Lancaster, v.71, p.2480-2485, 1988.

WISEMAN, H. Vitamin D is a membrane antioxidant. *Federation of European Biochemical Societies*, v.326, p.285-288, 1993.

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

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

WITTEWER, F., HEUER, G., CONTRERAS, P. A., BÖHMWALD, T. M. Valores bioquímicos clínicos sanguíneos de vacas cursando con decúbito en el sur de Chile. *Arch. Med. Vet.* 15, 83-88, 1993.

WROBLEWISK, F.; LA DUE, J.S. Serum glutamic pyruvic transaminase (sgp-t) in hepatic disease: a preliminary report. *Ann Intern Med.* v.45(5), p.801-811, 1956.

YAGI, K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Methods in Molecular Biology*. v.108. p.101-106, 1998.

YAN, XU et al. Up-regulation of Toll-like receptor 4/nuclear factor- κ B signaling is associated with enhanced adipogenesis and insulin resistance in fetal skeletal muscle of obese sheep at late gestation. *Endocrinology*, v. 151, n. 1, p. 380-387, 2010.

YAP, CONSTANCE et al. Vitamin D Supplementation and the Effects on Glucose Metabolism During Pregnancy: A Randomized Controlled Trial. *Diabetes care*, p. DC_140155, 2014.

YONEMURA, K.; FUJIMOTO, T.; FUJIGAKI, Y.; HISHIDA, a. Vitamin D deficiency is implicated in reduced serum albumin concentrations in patients with end-stage renal disease. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation*, v. 36, n. 2, p. 337–44, 2000.

YOSHIDA, H., ISHIKAWA, T. AND NAKAMURA, H. Vitamin E/lipid peroxide ratio and susceptibility of LDL to oxidative modification in Non-Insulin-dependent Diabetes Mellitus. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 1438 – 46, 1997.

ZAKIAN, A., LOTFOLLAHZADEH, S., TEHRANI-SHARIF, M., FARAMARZIAN, K., GHOLAMI, N., et al. Correlation among serum -hydroxybutyric acid, Total antioxidant

capacity and protein profile pré and post-partum in Shall ewes. J. Vet. Med. Res. 2 (5), 1038, 2015.

ZHANG, M.-X.; PAN, G.-T.; GUO, J.-F.; LI, B.-Y.; QIN, L.-Q.; ZHANG, Z.-L. Vitamin D Deficiency Increases the Risk of Gestational Diabetes Mellitus: A Meta-Analysis of Observational Studies. *Nutrients*, v. 7, n. 10, p. 8366–8375, 2015.

ZHU, MEI J. et al. Maternal obesity markedly increases placental fatty acid transporter expression and fetal blood triglycerides at midgestation in the ewe. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 299, n. 5, p. 1224-1231, 2010.

ZIEGLER-HEITBROCK L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol.*,81:584–592, 2007.

ZIEGLER-HEITBROCK L, ANCUTA P, CROWE S, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 116: e74-80, 2010.

ZIEGLER-HEITBROCK, L. Reprint of: Monocyte subsets in man and other species. *Cellular Immunology*, v. 291, n. 1–2, p. 11–15, 2014.