**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Etiologia e prevenção de retenção de placenta em vacas leiteiras

Guilherme Corrêa de Sousa Pontes

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência
Animal e Pastagens

**Piracicaba
2014**

Guilherme Corrêa de Sousa Pontes
Médico Veterinário

Etiologia e prevenção de retenção de placenta em vacas leiteiras

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **ROBERTO SARTORI FILHO**

Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestre em Ciências. Área de
concentração: Ciência Animal e Pastagens

Piracicaba
2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Pontes, Guilherme Corrêa de Sousa

Etiologia e prevenção de retenção de placenta em vacas leiteiras / Guilherme Corrêa de Sousa Pontes. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2014.

86 p : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Bovino 2. Reprodução 3. Retenção das membranas fetais 4. Alfa tocoferol I. Título

CDD 636.214
P814e

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - O autor"

Aos meus pais, Geraldo Magela de Souza Pontes e Maria Aparecida Corrêa de Sousa Pontes, por serem meus exemplos de vida, meu porto seguro e pela fé que em mim depositam. Amo vocês.

À minha querida irmã (Gabriela) que me ajudou e torceu muito para a realização deste objetivo.

Aos amigos pelo apoio, carinho, paciência e conhecimento em todos os momentos.

À Thais, minha namorada, pela paciência, pelo amor, conselhos e incentivo.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao Departamento de Zootecnia pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Roberto Sartori Filho pela oportunidade concedida, confiança, amizade, apoio e GRANDES ensinamentos. Foi sem dúvida um grande mestre e exemplo de profissional. Amadureci bastante, aprendi muito e tenho certeza que grande parte do meu conhecimento eu devo ao senhor. Muito obrigado Roberto.

Aos funcionários do Departamento de Zootecnia da ESALQ, que sempre nos ajudaram com os vários problemas que surgiram. Muito obrigado.

Aos amigos e companheiros do grupo de trabalho: Fernanda Zinsly de Mattos, Amanda Prudêncio Lemes, Monique Guardieiro, Fernanda Lavinia, Pedro Leopoldo Jerônimo Monteiro Jr, Aníbal Ballarotti, Louise Oliveira, Leonardo de França e Melo, Jéssica Nora Drum e Alexandre Barbieri Prata pelo apoio nos momentos de aperto e momentos felizes que passamos juntos. Aprendi muito com vocês! Muito obrigado.

Aos companheiros de experimento um agradecimento especial: Delfim Medeiros, Gabriela Fernandes, Alexandre Barbieri Prata, Pedro Leopoldo Jerônimo Monteiro Jr, Anibal Ballarotti. Sem vocês tudo seria muito mais difícil. MUITO OBRIGADO pela ajuda, amizade e apoio.

Aos ilustres professores do Departamento de Zootecnia por contribuírem direta ou indiretamente para minha formação.

Ao Prof. Dr. Milo Wiltbank pela amizade, pelos ensinamentos e pela ajuda incansável na elaboração e desenvolvimento dos projetos.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Portela Santos, pelo apoio na análise dos dados, pelos ensinamentos, conversas e conselhos durante a estadia em Gainesville.

Ao Rehagro, pelo apoio, incentivo e compreensão. Muito obrigado pela parceria que foi fundamental para a execução do experimento.

Ao pessoal das Fazendas Queima Ferro, Santo Antônio, Rasip e São João. Muito obrigado pela paciência, pela infraestrutura e mão-de-obra cedida ao longo deste ano. Sem elas, nada disso seria possível.

Aos amigos de Sete Lagoas que são como irmãos para mim! Muito obrigado por todos esses anos de grande amizade!

Aos meus pais e à minha irmã, muito obrigado pelo carinho, amor, dedicação e apoio nesta etapa da minha vida! Sem vocês nada disso teria acontecido! Um eterno OBRIGADO! AMO VOCÊS!

À Thais, pelo apoio incondicional, incentivo e motivação ao longo destes dois anos e meio. Por não me deixar desanimar nunca.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

À Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão do auxílio à pesquisa 2012/21066-7.

Finalmente, agradeço a Deus por me proporcionar mais esta conquista e por colocar pessoas tão especiais em minha caminhada!

Muito obrigado!

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim”.

Chico Xavier

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
LISTA DE TABELAS	17
LISTA DE ABREVIATURAS.....	19
1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3 OBJETIVOS	39
4 HIPÓTESES.....	41
5 MATERIAL E MÉTODOS	43
5.1 Delineamento experimental e tratamentos	43
5.2 Animais e fazendas	43
5.3 Diagnóstico de retenção de placenta e natimorto	45
5.4 Manejo reprodutivo para primeira IA	46
5.5 Diagnóstico de gestação e resincronização de vacas não gestantes	47
5.6 Produção de leite	48
5.7 Colheita de sangue e ensaios	49
5.8 Análise Estatística	50
6 RESULTADOS	55
7 DISCUSSÃO	65
8 CONCLUSÕES	73
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES.....	75
REFERÊNCIAS	77

RESUMO

Tratamento com vitamina E injetável no pré-parto para reduzir retenção de placenta e melhorar o desempenho reprodutivo de vacas leiteiras

Os objetivos foram avaliar os efeitos da aplicação de vitamina E pré-parto sobre a incidência de retenção de placenta e desempenho reprodutivo de vacas leiteiras. Entre maio de 2012 e abril de 2013, 890 animais, sendo 390 Holandesas (132 nulíparas e 258 vacas) e 500 mestiças Holandês x Gir (199 nulíparas e 301 vacas) foram envolvidas no estudo em três fazendas. Vacas e novilhas pré-parto foram alojadas em áreas de pastagem com piquetes rotacionados entre outubro e março e receberam 2 kg/d de concentrado, contendo fubá de milho, farelo de soja, minerais e vitaminas. De abril a setembro, as fêmeas pré-parto receberam dieta total composta de silagem de milho, fubá de milho, farelo de soja, minerais e vitaminas. Durante o período pré-parto, as fêmeas receberam 280 (Fazenda 1), 390 (Fazenda 2) e 480 (Fazenda 3) UI de vitamina E por dia via dieta. Em cada fazenda, os animais foram aleatorizados a não receberem tratamento algum (Controle), ou receberem aplicações semanais de 1.000 UI de vitamina E via intramuscular, aos 258 ± 3 , 265 ± 3 e 272 ± 3 d de gestação (VitE). Amostras de sangue foram colhidas de um subgrupo de 141 fêmeas imediatamente antes de serem aleatorizadas para determinar a concentração sérica de α -tocoferol. Amostras de sangue também foram analisadas para determinar as concentrações de cortisol e ácidos graxos não esterificados (AGNEs). As análises estatísticas foram feitas através dos procedimentos GLIMMIX, MIXED, PHREG E LIFETEST do SAS. Variáveis binárias foram analisadas por regressão logística, variáveis contínuas foram analisadas por ANOVA e variáveis relacionadas a tempo a um evento foram avaliadas através de curva de sobrevivência. O α -tocoferol sérico não diferiu entre grupos Controle e VitE, com concentração média de $2,97 \pm 0,10$ $\mu\text{g/mL}$. 53,2% das fêmeas apresentaram concentração inadequada de α -tocoferol sérico baseado em 3 $\mu\text{g/mL}$ como ponto de corte. A probabilidade das vacas terem retenção de placenta diminuiu à medida em que a concentração sérica de α -tocoferol aumentou ($P = 0,01$). A produção de leite foi igual nos grupos Controle e VitE. Aplicação de vitamina E pré-parto reduziu a incidência de natimortos, retenção de placenta e mortalidade até os 200 DEL. O grupo VitE apresentou tendência ($P = 0,08$) de aumento na taxa de concepção à primeira IA (36,7 vs 30,1%) pela menor perda embrionária/fetal entre 30 e 60 d de gestação (12,5 vs 20,5%). Apesar de similar taxa de inseminação entre os grupos, suplementação com vitamina E pré-parto acarretou em 22% de aumento na taxa de prenhez em relação ao grupo Controle. As fêmeas no grupo VitE tiveram menores concentrações de cortisol e AGNEs ao redor do parto. Em resumo, quando as vacas e novilhas foram alimentadas com quantidades limitadas de vitamina E, 28 a 48% das recomendações do NRC para vacas no pré-parto, a suplementação com vitamina E injetável melhorou a saúde e o desempenho reprodutivo das mesmas.

Palavras-chave: Bovino; Reprodução; Retenção das membranas fetais; α -tocoferol

ABSTRACT

Treatment with injectable vitamin E prepartum to reduce retained fetal membranes and improve reproductive performance of dairy cows

Objectives were to evaluate the effects of injectable vitamin E supplementation during the last 3 weeks prepartum on the incidence of retained fetal membranes (RFM) and reproductive performance of dairy cows. Eight-hundred and ninety dairy cows and heifers, being 390 Holsteins (132 nuliparous and 258 parous) and 500 crossbred Holstein x Gyr (199 nuliparous and 301 parous) from three dairy farms were assigned to the study from May 2012 to April 2013. In all three farms, prepartum females were housed in pastures, and from October to March, cows had access to pasture and were managed under grazing and received 2 kg/d of a mixture of finely ground corn, soybean meal, and minerals and vitamins. From April to September, prepartum animals received a TMR composed of corn silage, finely ground corn, soybean meal, and minerals and vitamins. During the prepartum period, animals received 280 (Farm 1), 390 (Farm 2), and 480 (Farm 3) IU of vitamin E/d. Within each farm, cows and heifers were randomly assigned to remain as untreated controls or to receive three i.m. injections of 1,000 IU each of DL- α -tocopherol administered at 258 ± 3 , 265 ± 3 , and 272 ± 3 d of gestation (VitE). Blood was sampled from a subset of 141 animals immediately before enrollment to determine the α -tocopherol status. Blood was also analyzed for concentrations of cortisol and nonesterified fatty acids (NEFA). Statistical analysis was performed with SAS software using the GLIMMIX, MIXED, PHREG and LIFETEST procedures. The concentration of α -tocopherol in serum of females did not differ between treatments and averaged 2.97 ± 0.10 $\mu\text{g/mL}$. A total of 53.2% of the animals had inadequate concentration of serum α -tocopherol based on the 3.0 $\mu\text{g/mL}$ cut-off for adequacy. The probability of cows to have RFM decreased as the concentration of α -tocopherol in serum increased ($P = 0.01$). Milk production did not differ between Control and VitE cows. Treatment with injectable α -tocopherol improved postpartum health by reducing the incidence of stillbirths, RFM, and death by 200 d postpartum. Cows receiving VitE tended ($P = 0.08$) to have improved pregnancy per insemination (P/AI) at first AI (36.7 vs. 30.1%) because of less pregnancy loss between 30 and 60 d of gestation (12.5 vs. 20.5%). Despite similar insemination rate, cows receiving VitE had 22% greater pregnancy rate than control cows, which was attributed to the improved P/AI and reduced pregnancy loss in all inseminations during the first 200 d in milk. Females in VitE had reduced concentrations of cortisol and NEFA around calving. In summary, when cows and heifers were fed limited amounts of supplemental vitamin E, 28 to 48% of the recommendations for prepartum dry cows, supplementation with injectable α -tocopherol improved postpartum health and reproduction.

Keywords: Cattle; Reproduction; Retained fetal membranes; α -tocopherol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Dosagem de cortisol sérico por RIA.....	50
Figura 2 – Croqui da metodologia experimental.....	50
Figura 3 – Concentração de α -tocoferol (média e EP) no soro, de acordo com dias relativos ao parto quando as vacas foram envolvidas no estudo e probabilidade de retenção de placenta de acordo com a concentração sérica de α -tocoferol aos 258 ± 3 d de gestação.....	55
Figura 4 – Concentrações de cortisol pré-parto (A) e ácidos graxos não esterificados (B) em vacas não suplementadas com vitamina E injetável ou três aplicações de 1.000 UI de vitamina E cada aos 258 ± 3 , 265 ± 3 e 272 ± 3 d de gestação.....	56
Figura 5 – Curva de sobrevivência para primeria IA em vacas sem aplicação de vitamina E (Controle) ou 3 aplicações semanais pré-parto de 1.000 UI cada (VitE).....	60
Figura 6 – Curva de sobrevivência para intervalo à prenhez em vacas que não receberam nenhum tratamento (Controle), ou três aplicações pré-parto de 1.000 UI de vitamina E cada (VitE).....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –Incidência de retenção de placenta e índices reprodutivos de vacas suplementadas com 3.000 UI de vitamina E 21 d antes da data prevista para o parto.	30
Tabela 2 –Incidência de retenção de placenta, natimortos, mortalidade de vacas e produção total de leite aos 60, 100 e 305 DEL em vacas suplementadas ou não com três aplicações semanais de 1.000 UI cada a partir de 19,2 ± 4,3 d antes do parto.....	57
Tabela 3 –Suplementação de vitamina E durante o período pré-parto e desempenho reprodutivo de vacas leiteiras (média ± EP).....	61
Tabela 4 –Suplementação de vitamina E durante o período pré-parto e desempenho reprodutivo de vacas leiteiras (média).	62

LISTA DE ABREVIATURAS

AGNEs	- Ácidos graxos não esterificados
BEN	- Balanço Energético Negativo
BHBA	- Betahidroxibutirato
CGB	- Célula gigante binucleada
ECC	- Escore de condição corporal
GH	- Hormônio do crescimento
IATF	- Inseminação artificial em tempo fixo
IFN- τ	- Interferon tau
IGF-1	- Fator de crescimento semelhante à insulina
IL-8	- Interleucina-8
MHC	- Complexo principal de histocompatibilidade
LH	- Hormônio Luteinizante
NEFA	- Nonesterified fatty acids
PTH	- Paratormônio
UI	- Unidades internacionais
mM	- mili-molar
mL	- Mililitros
μ g	- Micrograma
mg/dL	- Miligrama por decilitro
mmol/L	- milimol por litro
mEq/L	- miliequivalentes por litro

1 INTRODUÇÃO

1.1 Caracterização do problema

São muitos os desafios enfrentados por produtores e técnicos para se produzir leite de forma eficiente. Dentre estes, pode-se citar a redução de fertilidade que vem ocorrendo ao longo dos anos com o aumento da produtividade das vacas e consequentemente maior consumo de matéria seca (Lucy et al., 2001).

Outros grandes desafios enfrentados são os distúrbios metabólicos e infecciosos que acometem grande parte das vacas no período peri-parto e que são responsáveis por atraso no retorno à atividade cíclica ovariana, aumento no período de serviço, menor taxa de concepção e queda na produção de leite. Uma das principais ocorrências é a não expulsão dos anexos fetais nas primeiras 24 horas após o parto, aumentando o risco de desenvolvimento de infecções uterinas tais como metrite e endometrites clínica e subclínica.

Metrite é uma patologia que acomete grande número de vacas no período pós-parto e pode ser caracterizada como uma distensão anormal do útero, com descargas vaginais de conteúdo fétido, vermelho-amarronzado e pode ser acompanhada de sinais sistêmicos com febre acima de 39,5°C, anorexia e redução da produção de leite (Sheldon et al., 2006).

A redução na fertilidade das vacas devido a infecções uterinas está ligada não só à afecção do ambiente uterino, mas também envolve hipotálamo, hipófise e ovários. A absorção de componentes bacterianos no útero pode afetar a liberação do pico de LH e consequentemente a ovulação, além de reduzir o crescimento do primeiro folículo dominante no pós-parto, reduzindo também a secreção de estradiol (Sheldon et al., 2004). Segundo Williams et al. (2007), vacas que apresentaram maior crescimento de bactérias patogênicas no útero, tiveram o primeiro folículo ovulatório menor e consequentemente corpo lúteo de menor volume, havendo menor concentração circulante de progesterona após a ovulação.

De fato, a produção de leite e a reprodução estão intimamente relacionadas, de forma que o alcance de alto desempenho reprodutivo é um passo fundamental para obtenção de sucesso na atividade.

Desta forma, o ideal é que as vacas retornem à ciclicidade ovariana e tornem a gestar o mais breve possível após o parto. No entanto, as doenças uterinas retardam o retorno à ciclicidade, aumentando a incidência de vacas em condição anovulatória (Santos et al., 2010), reduzindo a taxa de detecção de cios.

Em rebanhos com alta incidência de vacas em condição anovulatória, não só a detecção de estros é baixa, mas também ocorre redução nas taxas de concepção (Cerri et al., 2004). E ainda, mesmo vacas em anestro sincronizadas e inseminadas em tempo fixo apresentam maior incidência de perdas de gestação (Stevenson et al., 2006), aumentando o período de serviço e consequentemente o intervalo entre partos, o que diminui a eficiência reprodutiva e consequentemente produtiva do rebanho.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Placenta e placentação

A placenta bovina é constituída por uma porção fetal e outra materna e atualmente é classificada como “cotiledonária sinepteliocorial”, em função da forma que assume aos 40-50 d de gestação (Peter, 2013). Hoje se sabe que o epitélio uterino não se perde no processo de implantação embrionária apesar de sofrer modificações. Ocorre a migração e fusão de células gigantes binucleadas (CGB) do trofotoderma com células epiteliais uterinas, modificando o epitélio uterino, tanto no corno gestante quanto no corno não gestante (McNaughton e Murray, 2009) formando junções feto-maternas com até oito núcleos na conexão entre o bezerro e a vaca e responsáveis por quase 50% do tecido epitelial 24 d após a fecundação (Wathes et al., 1980).

A placenta bovina completamente desenvolvida é epiteliocorial. O termo “Syn” refere-se à participação das CGBs (Peter, 2013), levando à classificação sinepteliocorial. O termo cotiledonária, se refere a áreas específicas de proliferação do trofotoderma que irão formar os cotilédones no placentoma. Com o avançar da gestação, as vilosidades se ligam mais intimamente a camadas mais profundas nas criptas carunculares, formando os placentomas. Cada carúncula associada a um cotilédone, forma um placentoma (Schlafer et al., 2000), a unidade funcional da placenta. Segundo Peter (2013), a placenta bovina é formada por 80 a 90 carúnculas que têm grande importância por aumentarem a superfície de trocas entre a mãe e o feto.

À medida que a gestação progride, as células do trofotoderma se diferenciam em células trofoblásticas uninucleadas, cuboidais, responsáveis pela produção de IFN- τ (Roberts et al., 1992), substância responsável pelo reconhecimento materno da gestação e em CGBs (Wooding et al., 1980), responsáveis pela produção de progesterona (Reimers et al., 1985), estrógeno e prostaglandinas (Gross et al., 1988).

Entre os dias 25 e 30 da gestação é possível perceber três membranas justapostas, o córion, a camada intermediária do alantoide e uma camada sutil do âmnio. Entre os dias 40 e 45 o córion está justaposto ao alantoide, no entanto sem

uma completa fusão entre as duas camadas até que entre os dias 50 e 60 se torna difícil a individualização destas duas camadas, uma vez que aparecem fortemente unidas (Peter, 2013).

Os placentomas começam a se formar sutilmente, em pequenas elevações de formato achatado, inicialmente detectáveis apenas em torno do embrião próximos ao dia 37. Por volta do dia 60, eles estão presentes em todo o corno uterino com maior tamanho para aqueles próximos ao concepto (Peter, 2013).

A placenta bovina possui papel importante também na produção de hormônios esteroides, coordenando sua esteroidogênese à do corpo lúteo e às sinalizações fetais (Peter, 2013). A produção de hormônios esteroides parece atuar também no crescimento e na diferenciação das carúnculas (Hoffman e Schuler, 2002). As áreas entre os placentomas, constituídas por aposição de epitélio glandular e trofotoderma, são multifuncionais com grande capacidade de invasão, produção de hormônios, absorção de nutrientes, transporte seletivo, metabolismo e em fim por resistir às defesas do sistema imune da vaca (Peter, 2013).

2.2 Sistema imune e separação da placenta bovina ao parto

O sistema de histocompatibilidade principal ou MHC é uma glicoproteína de membranas, polimórfico, altamente especializado em apresentar antígenos, fundamental para o processo de reconhecimento do sistema imune (McNaughton e Murray, 2009). Na maioria dos mamíferos, estas moléculas não são expressas no trofoblasto. No entanto, o mesmo não ocorre com os bovinos (Bainbridge et al., 2001).

Até os quatro meses de gestação as células do trofotoderma, entre os cotilédones não expressam o MHC de classe 1 até que, após os seis meses de gestação, estas moléculas passam a ser expressas (McNaughton e Murray, 2009). Em caso de expressão anormal destas proteínas nos primeiros meses de gestação, ocorre aumento no número de linfócitos T, sugerindo reação antigênica, levando à rejeição daquele concepto (Hill et al., 2002). Durante muito tempo se acreditou que o reconhecimento dos MHC de classe 1 expressos por células do trofotoderma, como antígenos estranhos fosse prejudicial à gestação e ocasionasse em aborto. No

entanto, hoje, acredita-se que a incompatibilidade imunológica entre a porção materna e fetal seja importante para a maturação e expulsão normal da placenta após o parto (Jooston et al., 1991). Neste estudo, a compatibilidade entre os MHC de classe 1 entre mãe e prole aumentou a probabilidade de ocorrência de retenção de placenta.

O processo natural de maturação dos placentomas tem início no último mês de gestação (McNaughton e Murray, 2009). Neste processo, ocorre uma série de alterações tais como colagenização das carúnculas (Grunert e Morrow, 1986), células binucleadas assumem função reabsortiva como fagócitos e formam células gigantes poli nucleadas com o epitélio materno, com intensa degranulação destas células com a proximidade do parto (Williams et al., 1987) e ainda apoptose das criptas do epitélio materno (Boos et al., 2003).

Em um segundo estágio, as contrações uterinas levam a estados alternados de anemia e hiperemia das vilosidades, levando a alterações na estrutura e forma das mesmas (McNaughton e Murray, 2009). As carúnculas são comprimidas contra o feto e expandem para a periferia do tecido conectivo, facilitando o processo de liberação da placenta (Grunert e Morrow, 1986) até que, segundo Jooston e Hensen (1991) ocorre por fim a ruptura do cordão umbilical após a expulsão do feto, levando a isquemia das vilosidades.

Existem evidências de que a incompatibilidade entre MHC de classe 1 do feto e da mãe, o aumento da expressão destas moléculas nas carúnculas e o estímulo na resposta imune materna são sinalizadores fundamentais para o processo de maturação final e separação da placenta.

Gunnink (1984) propôs a hipótese de que antes do parto a placenta se torna um corpo estranho ao organismo materno, que precisa ser reconhecido e digerido pelo sistema imune para a expulsão normal após o parto. Neste estudo foi demonstrada menor atividade leucocitária em cotilédones colhidos de vacas que desenvolveriam retenção de placenta e ainda menor concentração de fatores quimiotáticos para leucócitos do que aqueles colhidos de vacas que liberariam a placenta normalmente. Estes resultados foram comprovados por Heuwer e Grunert (1987). Neste estudo foram colhidos placentomas ao parto e três horas após e foi encontrada menor concentração de fatores quimiotáticos para leucócitos em vacas

que desenvolveram retenção das membranas fetais (RMF) em relação às vacas normais.

Ainda, Kimura et al. (2002) relataram menor produção de interceulina 8 nas vacas que desenvolveram retenção de placenta (51 ± 12 pg/mL) em relação às vacas que expulsaram a placenta normalmente (134 ± 11 pg/mL), sugerindo um papel importante deste fator quimiotático na ativação e atração de neutrófilos e ainda reforçando a participação do sistema imune no processo de maturação placentária. No mesmo estudo, Kimura et al. (2002) incubaram neutrófilos com extratos de cotilédones placentários em um experimento e mediram a atividade da enzima mieloperoxidase em um segundo experimento. Em ambos os ensaios, as vacas que apresentaram retenção de placenta, tiveram menor atividade neutrofílica e menor habilidade quimiotática em atrair estes leucócitos do período pré-parto até duas semanas após a parição. Resultados semelhantes foram encontrados por Romaniukowa (1984).

Também, Cai et al. (1994) estudaram a função dos neutrófilos em grupos de vacas saudáveis, vacas que apresentaram o complexo retenção de placenta/metrite, e em vacas com mastite e encontraram redução na função neutrofílica durante o parto naquelas que apresentaram algum distúrbio após o parto. Estes resultados reforçam a atuação do sistema imune no mecanismo de liberação da placenta e também sinalizam que a redução da atividade fagocitária dos neutrófilos pode ser um fator predisponente ao desenvolvimento destas desordens.

Desta forma, fatores que levem a imunossupressão de forma geral podem aumentar a incidência de retenção de placenta, diferentemente do que se pensava tempos atrás, quando se acreditava que a atonia uterina era um dos principais causadores da não expulsão das membranas fetais. Esta corresponde a apenas 1 a 2% dos casos de retenção de placenta (Grunert e Morrow, 1986).

2.3 Epidemiologia

Apesar de toda adaptação fisiológica dos sistemas corporais que favorecem a produção de leite após o parto, Santos et al. (2010) relataram que aproximadamente 45% das vacas leiteiras apresentam algum distúrbio metabólico e/ou infeccioso no

primeiro mês de lactação. De forma geral, todas as vacas no período de transição passam por um período de alterações no perfil hormonal de progesterona, estradiol, cortisol, redução da ingestão de matéria seca, balanço energético negativo (BEN), mobilização de gorduras, perda de condição corporal, imunossupressão, além de hipocalcemia pós-parto. Estas alterações aumentam os riscos de desenvolvimento de RMF, metrites e endometrites (LeBlanc et al., 2010).

Retenção de placenta é a não expulsão das membranas fetais entre 12-24 horas após o parto e é um dos principais fatores de risco para o aumento na incidência de infecções uterinas (Bell e Roberts, 2007; McNaughton e Murray, 2009). Segundo Dubuc et al. (2010), das vacas que apresentam RMF, 33,2% desenvolveram metrite e das vacas com metrite, 32,5 e 31,8% desenvolveram endometrite clínica e subclínica, respectivamente. McNaughton e Murray (2009) relataram incidência de retenção de placenta em vacas leiteiras variando de 5 a 10%. No entanto, em algumas situações, a incidência desta desordem pode variar significativamente. DuBois e Williams (1980), em estudo conduzido na Geórgia, relataram incidência de retenção de placenta em vacas Holandesas e Jersey de 24% durante os meses mais quentes do ano e de 12% nos meses mais frios, provavelmente por efeito do estresse calórico direta ou indiretamente afetando o sistema imune das vacas. Ainda, Nobre et al. (2012) encontraram incidência maior de retenção de placenta em vacas que pariram com condição corporal menor que 2,5 (escala de 1 a 5) em relação às demais. Yeon-kyung e Ill-Hwa (2005) relataram uma incidência média de retenção de placenta de 18,3% de um total de 805 partos na Coreia, que variou de 8,3% a 28,1% a incidência entre rebanhos.

LeBlanc et al. (2011) relataram a incidência de metrite de 20%, podendo esta ser mais alta em situações em que a incidência de retenção de placenta é mais alta e a severidade dos casos está intimamente ligada com o BEN no período pós-parto, a que estes animais são submetidos.

Ainda, partos distócicos e/ou gemelares e manipulações obstétricas aumentam os riscos de infecções após o parto (Lewis, 1997; Dubuc et al., 2010), uma vez que o útero é estéril durante o parto, o que facilita a contaminação por microrganismos patogênicos (Foldi et al., 2006).

Martinez et al. (2012), encontraram uma incidência de retenção de placenta de 30,9% (17/55) em vacas que apresentaram fatores de risco ao desenvolvimento de metrite ao parto (distocia, gêmeos ou natimorto). Santos et al. (2010) relataram incidência de distocia, metrite e endometrite clínica nos rebanhos americanos de 14,6, 16,1 e 20,8%, respectivamente e as vacas que apresentam pelo menos uma destas desordens tiveram de 50 a 63% menos chance de retornar à ciclicidade ovariana ao fim do período voluntário de espera e ainda de 25 a 38% a menos de chance de gestarem à primeira inseminação após o parto comparadas a vacas sem distúrbio algum neste período. Estas mesmas observações também podem ser extrapoladas para sistemas de produção a pasto (Ribeiro et al., 2011), no entanto, a incidência de partos distócicos, metrite e endometrite clínica são numericamente inferiores, 8,2, 5,7 e 14,7%, respectivamente.

2.4 Fatores de risco da retenção de placenta

2.4.1 Estresse oxidativo e vitamina E

As causas de retenção de placenta ainda não foram completamente elucidadas, no entanto, sabe-se que a concentração de agentes antioxidantes tem fundamental importância no funcionamento adequado das células do sistema imune, impactando na maior ou menor incidência de RMF e consequentemente de doenças uterinas após o parto. Durante o metabolismo normal das células, são produzidas algumas espécies reativas de oxigênio (ERO) nas cristas mitocondriais durante a cadeia de transporte de elétrons, e se estas acumulam no meio intracelular podem danificar a membrana celular e outras organelas (McNaughton e Murray, 2009). Além disso, podem reagir com outros equivalentes redutores como o NADPH, afetando o metabolismo de glicose (Miller e Brzezinska-Slebodzinska, 1993), reduzindo a habilidade fagocítica de neutrófilos, agravando a depressão do sistema imune e tornando as vacas mais susceptíveis a reterem os anexos fetais após o parto.

A vitamina E é um agente antioxidante lipossolúvel de membrana, responsável por proteger as células dos danos causados pelas EROs, uma vez que inibe as reações em cadeia iniciadas pelos radicais livres (Miller e Brzezinska-Slebodzinska, 1993), por reagirem diretamente com eles (Machlin et al., 1987). No

entanto, com a proximidade do parto, ocorre redução na concentração de α -tocoferol circulante (Weiss et al., 1990, 1992) e as vacas passam por um período de estresse oxidativo (Brzezinska-Slebodzinska et al., 1994) aumentando a susceptibilidade ao desenvolvimento de retenção de placenta após a parição. Duas possíveis justificativas para a redução na concentração de α -tocoferol circulante no período pré-parto são a transferência do mesmo para o colostro (Debier, 2007) e a queda na ingestão de matéria seca experimentada pelas vacas. Segundo Hogan et al. (1992), ocorre aumento na atividade fagocítica dos neutrófilos quando as concentrações de α -tocoferol são mantidas constantes no período periparto.

Além disso, algumas enzimas presentes no organismo possuem ação antioxidante. É o caso da superóxido dismutase, catalase, glutathione transferase e glutathione peroxidase, que possuem ação de remover estes radicais livres do meio. Kankofer (2001) encontrou maior atividade destas enzimas duas semanas antes do parto em vacas que apresentaram RMF em relação às aquelas que expulsaram a placenta normalmente, sugerindo a maior concentração de radicais livres nas vacas com RMF em relação às saudáveis.

Muitos dos efeitos do α -tocoferol independem do efeito antioxidante. São mediados por outras vias de sinalização celular (Azzi, 2007; McCary et al., 2012). Isto pode ser demonstrado comparando-se α -tocoferol com γ -tocoferol, isoformas da vitamina E. Ambas têm efeito similar na proteção contra estresse oxidativo (Chung et al., 2010; Wagner et al., 2004) mas acarretam em diferenças na expressão gênica durante a ativação de células T. Segundo estudo de Zingg et al. (2013), α -tocoferol estimulou a expressão de genes que aumentaram a proliferação celular, enquanto γ -tocoferol inibiu a expressão de muitos desses genes permitindo a citotoxicidade de células T. Independentemente do efeito antioxidante ou por outras vias de sinalização celular, a redução na incidência de retenção de placenta parece estar diretamente associada a melhoria no status imunológico das vacas.

LeBlanc et al. (2004), encontraram correlação negativa alta entre concentração de vitamina E circulante e retenção de placenta. As vacas que apresentaram maior concentração de vitamina E nas semanas que antecederam o parto tiveram menor predisposição a reterem os anexos fetais. Aréchiga et al. (1994), relataram efeito positivo da suplementação com vitamina E, em vacas a 21 d

da data prevista para o parto sobre a incidência de retenção de placenta e desempenho reprodutivo após o parto (Tabela 1).

Tabela 1 - Incidência de retenção de placenta e índices reprodutivos para vacas suplementadas com 3.000 UI de Vitamina E 21 d antes da data prevista para o parto

	Grupo suplementado	Grupo não suplementado	P
Incidência de retenção de placenta, %	3,0 (3/99)	10,1 (10/99)	0,06
Concepção ao primeiro serviço, %	41,2 (40/97)	25,3 (24/95)	0,02
Intervalo parto-concepção, dias	121 ± 7,6	141 ± 7,7	0,06

Também, Erskine et al. (1997), encontraram redução na incidência de retenção de placenta em vacas Holandesas quando estas foram suplementadas com 3.000 UI de vitamina E, oito a 14 d antes da data prevista para o parto. As vacas suplementadas e aquelas do grupo controle apresentaram incidência de retenção de placenta de 6,4% (13/204) e 12,5% (27/216), respectivamente.

Weiss et al. (1997), relataram incidência de mastite clínica 9,4 vezes maior nos animais que apresentaram concentração de α -tocoferol circulante inferior ou igual a 3,0 $\mu\text{g/mL}$ e ainda 5,9 vezes a mais de chance de desenvolverem mastite nas vacas com concentração inferior a 2,5 $\mu\text{g/mL}$. Em estudo *in vitro*, Weiss et al. (1994) relataram maior habilidade fagocítica dos neutrófilos quando a concentração plasmática de α -tocoferol foi $\geq 3,4 \mu\text{g/mL}$ ao parto, sugerindo o papel importante da vitamina E na função imune durante o período de transição.

Desta forma, diante da importância das células de defesa, neutrófilos e linfócitos principalmente, no mecanismo de liberação e expulsão da placenta, e diante do impacto destes radicais livres sobre a saúde celular é fundamental a

preocupação com a nutrição destas vacas durante o parto, não só em termos de energia e proteína, mas também em concentração de micronutrientes uma vez que esta influencia diretamente no puerpério normal dos animais.

2.4.2 Balanço energético negativo

Com a proximidade do parto, aumenta-se a exigência das vacas uma vez que ocorre demanda maior de nutrientes para a lactogênese e paralelamente a isto as vacas passam por um período de queda na ingestão de matéria seca, acarretando um período de BEN. Alguns dos fatores que irão regular a mobilização de reservas corporais nas vacas são a glicemia e a insulinemia, de forma que os ácidos graxos não esterificados (AGNEs) possam ser utilizados como fontes de energia. Além disso, sugere-se que o balanço negativo de nutrientes no período de transição, leva a um efeito imunossupressivo pela maior mobilização de gorduras e maior concentração de AGNEs circulantes (Lacetera et al., 2004), o que predispõe ao maior risco de desenvolvimento de RMF (Gunnink, 1984), reduzindo a eficiência reprodutiva das vacas após o parto.

Alguns estudos têm mostrado efeitos da alta concentração de AGNEs e de corpos cetônicos na circulação após o parto sobre as células do ovócito e do sistema imune, sugerindo um possível efeito deletério sobre a fertilidade das vacas. Lacetera et al. (2004) expuseram células do sistema imune a concentrações de AGNEs semelhantes àsquelas encontradas em vacas de leite de alta produção no período após o parto (0.12 a 1 mM), in vitro, e observaram redução da função e viabilidade das mesmas. Quando a concentração de AGNES foi elevada a 2 mM, mais leucócitos sofreram necrose. LeBlanc et al. (2004) também encontraram correlação alta entre as concentrações de AGNEs e a incidência de retenção de placenta. As vacas com concentração sérica de AGNEs mais alta apresentaram 80% a mais de probabilidade de desenvolverem este quadro clínico. Resultados semelhantes foram encontrados por Galvão et al. (2010). Neste trabalho, as vacas que desenvolveram infecções uterinas no período após o parto, apresentaram maiores concentrações de AGNEs próximo ao parto em relação às vacas saudáveis. Ainda, segundo Huzzey et al. (2011), para cada 0,15 mM de aumento na concentração sérica de AGNEs dobra

a probabilidade das vacas desenvolverem mais de uma desordem metabólica após a parição.

Segundo Dubuc et al. (2010) a elevação de AGNEs no período pré-parto aumentou o risco de desenvolvimento de metrite. No entanto, o mesmo não foi observado com a elevação de AGNEs após a parição, sugerindo o efeito deletério deste metabólito sobre as células do sistema imune, tornando as vacas mais susceptíveis a adoecerem no período pós-parto. Desta forma, sugere-se que a elevação de AGNEs na corrente circulatória é uma possível causa da maior incidência de doenças no período pós-parto e não uma dos efeitos decorrentes das doenças.

Leroy et al. (2004) mediram a concentração de betahidroxibutirato (BHBA) no soro e no fluido folicular de vacas no período pós-parto e encontraram correlação alta entre estes dois compartimentos. Ou seja, após o parto aumentam as concentrações de corpos cetônicos na circulação e conseqüentemente no fluido folicular, sugerindo a pior qualidade destes ovócitos. O mesmo não foi observado com os AGNEs. Houve aumento na concentração sérica de AGNEs, no entanto, as concentrações no fluido folicular se mantiveram inalteradas, sugerindo que existe algum mecanismo para proteger as células foliculares do efeito tóxico dos AGNEs.

Através da mensuração da concentração de AGNEs na circulação, Ribeiro et al. (2011) relataram que vacas que apresentaram concentração de AGNEs $>0,7$ mM, ou seja, sob BEN intenso, apresentaram menor possibilidade de se tornarem cíclicas antes dos 50 d após o parto e ainda menor taxa de concepção ao primeiro serviço. Ospina et al. (2010), relataram resultados semelhantes em vacas confinadas. Neste estudo, foram relatadas taxas de concepção aos 70 d de lactação 16% menores nas vacas que apresentaram concentração de AGNEs superior a $0,7$ mEq/L no período pós-parto. Além disso, as vacas com concentrações de AGNEs acima de $0,27$ mEq/L antes do parto apresentaram 19% a menos de chance de se tornarem gestantes aos 70 d pós-parto, sugerindo um possível efeito deletério sobre as células do sistema imune e/ou do ovócito.

Segundo Wathes et al. (2007), primíparas apresentam maiores concentrações de AGNEs na corrente sanguínea na semana anterior ao parto e também no pós-parto imediato, sugerindo que este é um dos motivos para se observar maior

incidência de condição anovulatória nas primeiras em relação às vacas multíparas (Santos et al., 2009).

Estes resultados sugerem que o BEN mais intenso, medido pela concentração de AGNEs na circulação aumenta o risco das vacas desenvolverem distúrbios metabólicos e infecciosos neste período pelo efeito tóxico destes metabolitos sobre células do sistema imune e reforça ainda o papel importante destes componentes no processo de liberação e expulsão da placenta após o parto. E ainda, que a elevação destes metabolitos na corrente circulatória influencia negativamente a fertilidade das vacas após o parto, seja por efeito direto sobre as células do ovócito ou indireto por supressão do sistema imune, aumentando a incidência de desordens metabólicas. Apesar dos resultados de Leroy et al. (2004) não mostrarem aumento na concentração de AGNEs no fluido folicular com o aumento na concentração de AGNEs na corrente circulatória, o mesmo não foi observado ao se elevar a concentração de corpos cetônicos na circulação, reforçando a ideia de que vacas sob BEN mais intenso podem apresentar ovócitos de pior qualidade, reduzindo a fertilidade das vacas.

Não só através da dosagem destes metabolitos no sangue, mas também através da mensuração do ECC é possível medir a intensidade e a duração do BEN. Vacas que perdem mais condição corporal do parto à primeira inseminação apresentam menor probabilidade de estarem cíclicas aos 65 d de lactação, consequentemente menor chance de gestarem à primeira inseminação e maior possibilidade de perda de gestação (Santos et al., 2009). No mesmo estudo, as vacas que perdem mais de um ponto, menos de um ponto ou não perdem condição corporal, apresentam 41,3%, 25,4% e 19,1% de vacas em condição anovulatória aos 65 d de lactação. Ainda, as vacas em condição anovulatória apresentaram taxa de concepção 30 d após inseminação de 29% (419/1445) contra 41,1% (1925/4679). Aquelas com condição corporal inferior a 3,0 entre 3 e 3,5 ou maior que 3,75 no momento da IA apresentaram taxas de concepção de 33,6% (897/2667), 41,1% (1210/2945) e 46,3% (237/512), respectivamente.

Isto ocorre, provavelmente, porque o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal é modulado pelo status energético da vaca. Em condições de subnutrição há redução da capacidade da hipófise em secretar alta pulsatilidade do LH (Schillo, 1992). Esta

observação pode explicar o atraso no retorno à ciclicidade ovariana das vacas que apresentam BEN mais intenso. Uma das justificativas para este fato é a menor quantidade de glicose disponível para oxidação pelos neurônios hipotalâmicos e hipofisários (Schneider, 2004).

Além da baixa pulsatilidade de LH neste momento, devido à baixa insulinemia há menor expressão de receptores de GH nas células hepáticas (Butler et al., 2003), levando à menor produção de IGF-1 hepático, o que leva à menor responsividade dos folículos ao LH, menor crescimento dos mesmos e menor produção de hormônios esteroides (Butler et al., 2004). Este fato leva a atraso na primeira ovulação após o parto e pode comprometer a detecção de estro retardando o momento em que esta vaca irá gestar. Assim, à medida que o balanço energético vai sendo restabelecido, ocorre aumento na insulinemia e consequentemente restauração dos receptores de GH nas células hepáticas (Butler et al., 2003).

2.4.3 Cortisol

Peter e Bosu (1987) estudaram as mudanças hormonais que ocorrem durante os 15 d pré e pós-parto em animais que liberaram ou não a placenta nas primeiras 24 horas após o parto. Houve aumento nas concentrações circulantes de prostaglandina F_{2α} a partir de sete e dois d pré-parto, no grupo com e sem retenção de placenta, respectivamente, mantendo-se elevadas até aproximadamente 12 d pós-parto, em ambos os grupos. Também, foi observada diferença na concentração de cortisol. Vacas com retenção de placenta tiveram o pico que foi de cinco para 28 ng/ml, aproximadamente 6 d pré-parto, enquanto que vacas sem RMF elevaram a concentração do hormônio de aproximadamente 3 para 8 ng/ml 2 d pré-parto. Esta diferença é sugestiva que o estresse das vacas neste período eleva o risco de incidência desta afecção.

Em outro estudo, Huzzey et al. (2011), relatam probabilidade de 59% a mais de chance de vacas primíparas com concentração de cortisol superior a 22,2 nmol/L duas semanas pré-parto desenvolverem mais de um sintoma clínico após o parto. Nas múltiparas, concentrações plasmáticas de cortisol maiores que 34,1 nmol/L

aumentaram em 2,53 vezes a chance das vacas desenvolverem mais de uma doença ou morrerem até os 30 d de lactação.

Kehrli et al. (1989) estudaram alterações nas funções de leucócitos em vacas durante o período de transição e encontraram um pico de cortisol no momento do parto que coincide com a menor função de linfócitos e neutrófilos, sugerindo efeito imunossupressor do cortisol.

2.5 Consequências da Retenção de Placenta

2.5.1 Produção de leite

Segundo Dubuc et al. (2011), houve redução de aproximadamente 1.000 kg de leite na lactação corrigida para 305 d nas vacas que apresentaram retenção de placenta e/ou metrite após o parto. No entanto, endometrites clínica e subclínica não afetaram a produção de leite.

De acordo com Ospina et al. (2010) as vacas que apresentaram concentrações de AGNEs maiores que 0,33 mEq/L pré-parto e 0,72 mEq/L após o parto, produziram 683 e 647 kg de leite a menos na lactação (305 d), respectivamente, possivelmente pela maior incidência de doenças infecciosas e/ou metabólicas nas vacas com BEN mais intenso. Aquelas vacas com concentrações de BHBA acima de 10 mg/dL produziram 393 kg de leite a menos em 305 d. Os mesmos resultados não foram observados nas novilhas e nas primíparas.

Em estudo retrospectivo realizado no estado do Rio Grande do Sul, Leite et al. (2001) avaliaram registros de 350 vacas ao longo de 24 anos e encontraram redução de 381 kg de leite nas vacas que apresentaram distúcia ao parto em relação àquelas com partos normais, possivelmente pela maior incidência de RMF ou de infecções uterinas no período após o parto.

Goshen e Sphigel (2006) encontraram redução na produção de leite nas vacas que apresentaram tanto retenção de placenta quanto metrite em relação àquelas sem distúrbios. Novilhas e vacas que apresentaram retenção de placenta produziram, respectivamente, 412 e 537 kg de leite a menos quando comparadas a animais normais, enquanto as novilhas e vacas que apresentaram metrite

produziram 338 e 498 kg de leite a menos que os animais normais. No mesmo estudo, as vacas que apresentaram metrite e foram tratadas com clortetraciclina (i.u), produziram 656 kg de leite a mais que aquelas não tratadas.

Nobre et al. (2012), avaliaram o banco de dados de uma propriedade na região central do estado de Minas Gerais, contendo informações referentes a partos ocorridos de janeiro de 2008 a março de 2009. Não foram encontradas diferenças na produção de leite das vacas com ou sem retenção de placenta durante o estudo. Neste trabalho, todas as vacas que desenvolveram retenção de placenta foram tratadas com antibioticoterapia e hidratação oral, o que pode justificar a mesma produção de leite entre vacas saudáveis e vacas que adoeceram após o parto.

2.5.2 Eficiência reprodutiva

Dubuc et al. (2011a) observaram aumento de 18 d no tempo médio para a primeira concepção das vacas que se restabeleceram entre os dias 35 e 49 pós-parto, em relação àquelas que não tiveram nenhum caso de doença uterina. Resultados semelhantes foram encontrados por Han et al. (2005), que detectaram prolongamento no período entre o parto e o primeiro serviço nos animais que apresentaram retenção de placenta em relação àqueles que não retiveram os anexos fetais.

Segundo Yeon-kyung e Ill-Hwa (2005), vacas com ou sem retenção de placenta manifestaram estro 94 e 86 d após o parto respectivamente, de forma que as primeiras apresentaram período de serviço de 146 d contra 128 d das vacas que liberaram a placenta normalmente após a parição.

Goshen e Shpigel (2006) estudaram os impactos da retenção de placenta e da metrite puerperal no desempenho reprodutivo de vacas de leite. O estudo foi conduzido no período de abril a dezembro de 2001, em cinco rebanhos comerciais de Israel. Foi envolvido neste trabalho um total de 1416 vacas e 804 novilhas da raça Holandesa. As vacas com retenção de placenta, tratadas, não tratadas e aquelas sem distúrbio algum, apresentaram taxas de concepção de, respectivamente, 33,3%, 34,3% e 38,3%. As primíparas apresentaram taxa de concepção de 41,9%, 38,7% e 46,8% para as tratadas, as não tratadas e aquelas

sem distúrbios após o parto. Além disso, só foi observada diferença no período de serviço das múltiparas, de forma que as aquelas não tratadas apresentaram período de serviço médio de 165,5 d contra 136,2 d das vacas tratadas com clortetraciclina.

Segundo Galvão et al. (2009), tanto a metrite quanto a endometrite clínica e subclínica afetaram negativamente a fertilidade das vacas pós-parto. Estes resultados estão de acordo com aqueles encontrados por McDougall et al. (2001). Neste estudo, foram envolvidas 690 vacas que apresentaram fatores de risco associados ao aumento da incidência de metrite como retenção de placenta e gêmeos e ainda as vacas que apresentaram descargas vaginais purulentas aos 13 d pós-parto. Foram observadas menores taxas de concepção à primeira inseminação pós-parto e maior intervalo do parto à primeira concepção no grupo controle (não tratado). No entanto, o percentual de vacas não gestantes foi o mesmo em ambos os grupos ao final do período. Além disso, foi maior a taxa de descarte no grupo não tratado nos primeiros dias da lactação.

LeBlanc et al. (2002) avaliaram o impacto das endometrites sobre o desempenho reprodutivo dos animais. Os dados foram obtidos de 1865 vacas com histórico de distocia, retenção de placenta, gêmeos ou metrite de 27 rebanhos diferentes. As vacas que apresentaram endometrite clínica tiveram taxa de concepção 27% menor do que aquelas que não apresentaram endometrite (29,8% vs. 37,9%) e ainda as taxas de descarte por falhas reprodutivas foram maiores nas vacas que apresentaram endometrite clínica em relação àquelas saudáveis (6,7% vs. 3,8%).

3 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da aplicação de vitamina E no período pré-parto sobre a incidência de retenção de placenta em vacas leiteiras, sobre as concentrações de AGNEs e cortisol no periparto e ainda o seu efeito sobre o desempenho produtivo e reprodutivo após o parto. Além disso, associar a ocorrência de retenção de placenta às concentrações de AGNEs e cortisol no período peri-parto.

4 HIPÓTESES

- A suplementação com três aplicações de 1000 UI de vitamina E no período pré-parto, semanalmente a partir de 21 d da data prevista para o parto, reduz a incidência de retenção de placenta em vacas leiteiras e aumenta a eficiência produtiva e reprodutiva após a parição;
- Maiores concentrações de AGNEs antes do parto aumentam o risco de desenvolvimento de retenção de placenta em vacas leiteiras.
- Vacas que apresentam RMF possuem o cortisol circulante, na semana anterior ao parto, em concentrações mais altas que nas vacas que expulsam a placenta normalmente após o parto.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Delineamento experimental e tratamentos

O estudo foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado entre maio de 2012 e abril de 2013. De acordo com a data prevista para o parto, metade das novilhas e das vacas foi aleatorizada a receber três aplicações de 1.000 UI de DL-alfa tocoferol (Monovim E, Bravet) via i.m com base na numeração do brinco. As aplicações foram feitas semanalmente, em um total de 3.000 UI após três aplicações. Esta dose foi utilizada por ter sido relatada por aumentar a concentração de α -tocoferol sérica por aproximadamente 14 d (Erskine et al., 1997). O Grupo controle não recebeu nenhum tratamento. Do total de 173 novilhas aleatorizadas a receberem vitamina E, 151 receberam três aplicações, 14 receberam duas aplicações e 8 receberam quatro aplicações pré-parto. Entre as 276 vacas do grupo VitE, 248 receberam três aplicações, 21 receberam duas aplicações e 7 receberam quatro aplicações de vitamina E.

Semanalmente, foram geradas listas por meio do software de gerenciamento de rebanho Ideagri com a data prevista para o parto de cada animal. As vacas e novilhas foram então aleatorizadas a um dos tratamentos, 21 d antes da data prevista para a parição, baseando-se na gestação de 280 d. Os tratamentos foram feitos pela mesma pessoa, nos mesmos horários em mesmos dias da semana em cada fazenda.

As vacas que pariram com menos de sete ou mais de 28 dias em relação ao início dos tratamentos foram excluídas do estudo. Assim, as vacas foram alocadas a receberem suplementação com vitamina E injetável (VitE) ou permanecerem no grupo controle entre sete e 28 dias em relação à data do parto.

5.2 Animais e fazendas

Oitocentos e noventa fêmeas, 390 Holandesas (132 nulíparas e 258 vacas) e 500 mestiças Holandês x Gir (199 nulíparas e 301 vacas) em três fazendas na região sudeste do Brasil foram introduzidas no estudo entre maio de 2012 e abril de 2013.

A fazenda 1 se trata de um sistema de pastejo com aproximadamente 600 vacas mestiças em lactação, que têm acesso a pasto de Mombaça (*Panicum maximun cv. Mombaça*) e são suplementadas com silagem de milho, cana de açúcar e concentrado contendo, fubá de milho, farelo de soja, polpa cítrica, caroço de algodão, minerais e vitaminas. A fazenda 2 também é um sistema de pastejo que ordenha aproximadamente 610 vacas mestiças com acesso a pasto de Tifton 85 (*Cynodon spp.*) e são suplementadas com uma mistura de silagem de milho e concentrado, contendo fubá de milho, farelo de soja, polpa cítrica, caroço de algodão, minerais e vitaminas. A fazenda 3 é um sistema de confinamento em free-stall que ordenha aproximadamente 550 vacas da raça Holandês, alimentadas com dieta total, contendo silagem de milho, feno, fubá de milho, farelo de soja, caroço de algodão, minerais e vitaminas.

Nas três fazendas, as vacas no pré-parto permaneceram em áreas de pasto com acesso a água e sombra durante todo o dia. De outubro a março, foram manejadas como vacas a pasto, com suplementação diária de 2 kg de concentrado, contendo fubá de milho, farelo de soja, minerais e vitaminas. De abril a setembro, as vacas pré-parto foram alimentadas com dieta total composta de silagem de milho, fubá de milho, farelo de soja, minerais e vitaminas. Durante o pré-parto as vacas receberam 280 (Fazenda 1), 390 (Fazenda 2) e 480 (Fazenda 3) UI de vitamina E (DL- α -tocoferol) e aproximadamente 0,30 ppm de Se como parte do concentrado. Foi estimada uma IMS de 10 kg de pasto por dia durante o verão e suplementação com concentrado para atingir o requerimento das vacas.

5.3 Diagnóstico de retenção de placenta e natimorto

Nas três fazendas, as fêmeas no período pré-parto foram observadas quanto aos sinais de parto entre as 6:00 e as 18:00 h. A hora aproximada do parto foi estimada para cada animal durante o período de observação. Toda manhã, as vacas que pariram até as 18:00 h do dia anterior foram avaliadas quanto à presença da placenta e aquelas com as membranas fetais presentes foram consideradas com retenção de placenta. As vacas que pariram entre 18:00 h e a manhã seguinte foram avaliadas somente na próxima manhã. Desta forma, vacas diagnosticadas com retenção de placenta apresentaram a placenta retida por um período de mínimo de 12 horas após o parto. As vacas com gestação de pelo menos 255 d que resultou em nascimento de bezerros mortos ou vivos, mas que morreram nas primeiras horas após o parto foram considerados natimortos.

Todas as vacas com retenção de placenta foram tratadas com 10 mg/kg de peso corporal de oxitetraciclina via intravenosa (Reverin Plus, MSD Saúde animal, São Paulo, Brasil), 500 mL de propileno glicol diluído em 50 L de solução contendo água, NaCl, CaCl_2 e MgSO_4 . As vacas foram tratadas por três a cinco d de acordo com a avaliação clínica feita pelo sanitarista de cada fazenda.

5.4 Manejo reprodutivo para primeira IA

Cada fazenda teve um programa reprodutivo específico. Na fazenda 1, o período voluntário de espera foi de 40 d. As vacas foram observadas quanto aos sinais de estro baseado na detecção visual de aceitação de monta ao longo de todo o dia. As vacas detectadas em cio pela manhã foram inseminadas na tarde seguinte e aquelas detectadas em cio durante a tarde foram inseminadas na manhã seguinte. Toda semana, as vacas não detectadas em cio a partir de 60 DEL foram sincronizadas para serem inseminadas em tempo fixo, utilizando 2 mg de benzoato de estradiol (1 mg/mL benzoato de estradiol; Gonadiol, MSD Saúde Animal) e um dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR), contendo 1,9 g de progesterona (CIDR, Zoetis, São Paulo, Brasil) no D0 do protocolo. Sete d depois, as vacas receberam 0,5 mg de cloprostenol (0,25 mg/mL cloprostenol; Sincrocio, Ouro Fino Agronegócios, Cravinhos, Brasil). No dia 8,5, o CIDR foi removido e as vacas receberam outra dose de 0,5 mg cloprostenol e 1 mg de benzoato de estradiol. As vacas foram inseminadas em tempo fixo no dia 10 do protocolo.

Na fazenda 2, o período voluntário de espera foi de 45 d. As vacas foram observadas quanto aos sinais de estro baseado na detecção visual de aceitação de monta ao longo de todo o dia. As vacas detectadas em cio pela manhã foram inseminadas na tarde seguinte e aquelas detectadas em cio durante a tarde foram inseminadas na manhã seguinte, conforme descrito para a fazenda 1. Toda semana, as vacas não detectadas em cio a partir de 55 DEL foram sincronizadas para serem inseminadas em tempo fixo, utilizando 2 mg de benzoato de estradiol e CIDR, no D0 do protocolo. Sete d depois, as vacas receberam 0,5 mg de cloprostenol e no dia 8, o CIDR foi removido e as vacas receberam outra dose de 0,5 mg de cloprostenol e 1 mg de cipionato de estradiol (2 mg/mL; ECP, Zoetis). As vacas foram inseminadas em tempo fixo no dia 10 do protocolo.

Na fazenda 3, o período de espera voluntária foi de 60 dias. As vacas receberam 0,5 mg de cloprostenol aos 46 ± 3 e aos 60 ± 3 DEL. As vacas detectadas em cio após a segunda aplicação de prostaglandina foram inseminadas conforme descrito para fazendas 1 e 2. As vacas não observadas em estro após 14 d da segunda aplicação do cloprostenol foram avaliadas por ultrassom (Mindray 2200, Mindray, São Paulo, Brasil) equipado com probe linear transretal de 7,5 MHz e

as vacas que apresentavam corpo lúteo receberam outra dose de 0,5 mg de cloprostenol e foram novamente observadas quanto a sinais de estro. Vacas sem corpo lúteo ao ultrasson foram sincronizadas com 100 µg de GnRH (100 µg/mL gonadorelina; Fertagil, MSD Saúde Animal) no dia 0 do protocolo. Sete d depois, as vacas receberam 0,5 mg de cloprostenol. No dia 8, as vacas receberam cipionato de estradiol e foram inseminadas no dia 9,5, junto da aplicação de outra dose de GnRH.

5.5 Diagnósticos de gestação e resincronização de vacas não gestantes

Ao longo de todo o estudo, as vacas inseminadas foram observadas quanto aos sinais de estro e inseminadas conforme descrito anteriormente. Nas fazendas 1 e 3, diagnóstico de gestação foi feito semanalmente, enquanto na fazenda 2 foi feito a cada 14 d. Nas três fazendas, as vacas com pelo menos 28 d após uma inseminação foram avaliadas por ultrassonografia para diagnóstico de gestação. As vacas com vesícula embrionária foram consideradas gestantes. Nas fazendas 1 e 3 diagnóstico de gestação foi feito com 31 d em média enquanto na fazenda 2 foi feito com 35 d na média. Todas as vacas positivas foram reconfirmadas aos 62 ± 3 d por palpação retal do útero.

Nas fazendas 1 e 2 as vacas não gestantes tiveram o ciclo resincronizado de acordo com o protocolo descrito para cada fazenda no manejo da primeira inseminação após o parto. Na fazenda 3, as vacas não gestantes com presença de corpo lúteo receberam outra dose de cloprostenol e foram observadas quanto aos sinais de estro. Aquelas sem corpo lúteo foram resincronizadas utilizando o mesmo protocolo descrito para a primeira inseminação.

O desempenho reprodutivo foi avaliado até os 200 DEL nas três fazendas. As vacas foram consideradas gestantes ao final do estudo, baseado no diagnóstico feito aos 62 d após a inseminação. Considerando o período de espera voluntário da fazenda 1 (40 d), fazenda 2 (45 d) e fazenda 3 (60 d) e a duração média do ciclo estral de 21 d, cada vaca poderia permanecer no estudo por no máximo 7,6, 7,3 e 6,6 ciclos de 21 d. As vacas que permaneceram no estudo, mas não se tornaram gestantes até os 200 d, deixaram o estudo neste dia.

Para o cálculo da taxa de prenhez, percentual de vacas que se tornaram gestantes a cada intervalo de 21 d entre as vacas elegíveis e taxa de inseminação, percentual de vacas que foram inseminadas a cada intervalo de 21 d entre as aptas a serem inseminadas, as vacas se tornaram elegíveis ao fim do período de espera voluntário de cada fazenda até o dia de uma inseminação de que gerou prenhez ou até deixar o estudo.

5.6 Produção de leite

A produção de leite foi medida a cada 14 d nas fazendas 1 e 2 e diariamente na fazenda 3. Nas fazendas 1 e 2 a produção de leite foi medida utilizando medidas manuais (MM6, DeLaval, Campinas, Brasil) enquanto na fazenda 3 a produção foi medida utilizando medidores eletrônicos (Meatron MB, GEA Farm Technologies, Jaguariúna, Brasil). A produção total foi medida para os 60, 100 e 305 d de lactação. As vacas que foram vendidas ou morreram antes dos 60, 100 ou 305 d contribuíram com as medidas até o dia em que deixaram o estudo.

5.7 Colheita de sangue e ensaios

Colheitas de sangue foram feitas em grupos aleatórios de fêmeas em cada fazenda imediatamente antes de iniciarem os tratamentos, aos $19,2 \pm 4,3$ d antes do parto para estabelecer a concentração de α -tocoferol no soro e determinar se a prevalência de animais com concentração inadequada no pré-parto era alta, baseado em $3 \mu\text{g/mL}$ como limite mínimo para adequação (Weiss et al., 1997). Cento e quarenta e uma fêmeas (32 no grupo Controle e 32 no grupo VitE na fazenda 1; 16 no grupo Controle e 18 no grupo VitE na fazenda 2; 27 Controle e 16 no grupo VitE na fazenda 3) tiveram colheitas por venopunção da veia coccígea, utilizando tubos a vácuo, estéreis, sem anticoagulante e com gel separador de coágulo (Vacuplast, Collect line, Nanchang, China). As amostras do soro foram deixadas para coagular à temperatura ambiente e então colocadas em refrigerador em 30 minutos. Os tubos foram centrifugados após 6 horas e as amostras foram então armazenadas a -20°C até posteriores análises. Soro foi analisado para determinar a concentração de α -tocoferol pelo laboratório de análises Nanocore Biotecnologia (Campinas, Brasil) por HPLC. Uma única análise foi feita e o CV foi de 2,9%.

Também foram feitas colheitas de sangue como descrito acima de outro grupo de fêmeas em cada fazenda para determinação das concentrações de cortisol e AGNEs (36 no grupo Controle e 28 no grupo VitE na fazenda 1; 34 no grupo Controle e 34 no grupo VitE na fazenda 2; 15 no grupo Controle e 25 no grupo VitE na fazenda 3). As colheitas foram feitas semanalmente, sempre às oito horas, uma hora antes do fornecimento da dieta, começando três semanas antes do parto até 3 semanas após o parto. AGNEs foram determinados em todos os momentos de colheita de sangue e cortisol foi analisado nas duas semanas que antecedem o parto.

As concentrações de AGNEs foram determinadas por meio de kits comerciais RANDOX®⁵ (NEFA Kit, Randox, San Diego, Califórnia). Os coeficientes de variação inter e intra ensaio foram 5,95 e 2,46%. O cortisol sanguíneo foi determinado por RIA (Figura 1) através de Kits DIASORIN (DiaSorin, Dartford, Inglaterra), com coeficiente de variação intra ensaio de 1,39%.

Figura 1 - Dosagem de cortisol sérico por Radioimunoensaio

Abaixo, o modelo esquemático da metodologia empregada no estudo.

Figura 2 - Croqui da metodologia experimental. As vacas foram movidas a um piquete maternidade 30 ± 3 d antes da data prevista para o parto e então aleatorizadas a receberem 3 aplicações semanais de 1.000 UI de vitamina E (VitE), iniciando 21 ± 3 d antes do parto previsto ou nenhuma aplicação (Controle). CS: Colheita de sangue. VitE: Aplicação de vitamina E. RP: Diagnóstico de retenção de placenta.

5.8 Análise Estatística

Variáveis binárias foram analisadas por regressão logística utilizando o procedimento GLIMMIX do SAS (SAS Stat versão 9,3). Em todos os modelos foram incluídos efeitos de tratamento (Controle x VitE), paridade (nulíparas x vacas) e fazenda ($1 \times 2 \times 3$). As interações entre tratamento e paridade e entre tratamento e

fazenda foram incluídas quando $P < 0,05$. Para taxa de concepção e perdas de gestação, touro em cada fazenda e inseminador em cada fazenda também foram incluídos se $P < 0,05$. A razão de chance e o respectivo intervalo de confiança (95%) também foram calculados.

O intervalo do parto à primeira inseminação e do parto à prenhez foram analisados pelo modelo de risco proporcional do Cox, usando o PHREG do SAS com modelos que incluíram efeitos de tratamento, paridade, fazenda, interação entre tratamento e paridade e entre tratamento e fazenda. Interações com $P > 0,10$ foram removidas dos modelos finais. Vacas consideradas descarte antes do fim do período voluntário de espera em cada fazenda foram excluídas das análises. Vacas não gestantes que morreram ou foram vendidas antes dos 200 d de lactação deixaram o estudo no dia da venda ou morte. A taxa de probabilidade ajustada (AOR) e o respectivo intervalo de confiança (CCIR 95%) foram calculados para os dados categóricos dependentes do tempo. Proporcionalidade foi avaliada por meio das curvas de Kaplan-Meier usando o procedimento LIFETEST do SAS. A mediana e média de d para a prenhez foram criados pelo método Kaplan-Meier, utilizando o procedimento LIFETEST do SAS.

Variáveis contínuas foram testadas para a normalidade do resíduo. Quando resíduos não apresentaram distribuição normal, os dados foram transformados por logaritmo antes das análises. Concentração de AGNES, cortisol e α -tocoferol no soro e produção de leite foram analisados por ANOVA com o procedimento MIXED do SAS. Para respostas com medidas repetidas no tempo, os modelos incluíram efeitos fixos de tratamento, paridade, fazenda, semana em relação ao parto e interações entre tratamento e semana, entre tratamento e paridade e entre tratamento e fazenda e o efeito aleatório de vaca em cada tratamento. Para respostas com um único valor por vaca como produção de leite e concentração sérica de α -tocoferol, os modelos incluíram efeitos fixos de tratamento, paridade, fazenda e as interações entre tratamento e paridade e entre tratamento e fazenda.

Análises adicionais foram feitas para determinar se a concentração de α -tocoferol 3 semanas antes do parto é um fator de risco para retenção de placenta. Finalmente, análises foram feitas incluindo retenção de placenta no modelo para determinar possíveis associações entre retenção de placenta e o desempenho

reprodutivo após o parto. Os dados estão apresentados como a média dos quadrados mínimos, a menos que indicado de outra forma.

6 RESULTADOS

6.1 Concentração de α -tocoferol pré-parto

As fêmeas foram envolvidas no estudo aos 258 ± 3 d de gestação, no entanto, devido à variação na duração da gestação as vacas ou novilhas receberam o primeiro tratamento com uma média ($\pm$ DP) e mediana de dia pré-parto de $19,2 \pm 4,3$ e 21 d, respectivamente.

A concentração sérica de α -tocoferol 3 semanas pré-parto foi similar ($P = 0,87$) entre os grupos controle e VitE com média de $2,97 \pm 0,10$ $\mu\text{g/mL}$. A fazenda de origem não influenciou a concentração de α -tocoferol. Um total de 53,2% das fêmeas apresentaram concentração inadequada de α -tocoferol baseando na referência de 3 $\mu\text{g/mL}$ como limite mínimo sugerido por Weiss et al. (1997). Não houve diferença na proporção de animais com baixo α -tocoferol nos grupos controle e VitE (52,0 e 54,6%, respectivamente).

Foi observada queda na concentração de α -tocoferol ($P = 0,005$), de aproximadamente 0,07 $\mu\text{g/mL}$ para cada dia que se aproximava da data do parto (Figura 5A).

A probabilidade das fêmeas desenvolverem retenção de placenta diminuiu ($P = 0,01$), na medida em que α -tocoferol aumentou (Figura 5B). Para cada 1 $\mu\text{g/mL}$ de aumento na concentração sérica, a probabilidade das fêmeas apresentarem retenção de placenta diminuiu em 48% (AOR = 0,52; IC = 0,30 até 0,89). Fêmeas classificadas como tendo baixas (< 3 $\mu\text{g/mL}$) concentrações de α -tocoferol no soro tiveram 2,8 vezes mais ($P = 0,04$) probabilidade (95% IC = 1,03 até 7,52) de apresentarem retenção de placenta comparada a animais com adequada (≥ 3 $\mu\text{g/mL}$) concentração sérica (22,7 e 13,6%).

Figura 3 - Concentração de α -tocoferol (média e EP) no soro, de acordo com dias relativos ao parto quando as vacas foram envolvidas no estudo (A) e probabilidade de retenção de placenta de acordo com a concentração sérica de α -tocoferol aos $19,2 \pm 4,3$ d em relação ao parto (B). Na figura A, a concentração de α -tocoferol diminui ($P = 0,005$) na medida em que aproxima a data do parto. Na figura B, para cada 1 $\mu\text{g/mL}$ de aumento no α -tocoferol sérico reduziu ($P = 0,01$) a razão de chance das vacas terem retenção de placenta em 48% (AOR = 0,52; 95% IC = 0,30 a 0,89)

6.1 Concentração sérica de cortisol e AGNEs

A concentração sérica de cortisol no soro não diferiu entre os grupos duas semanas antes do parto (Figura 4A). A concentração sérica de cortisol aumentou ($P = 0,05$) nas vacas do grupo controle na semana anterior ao parto, mas não nas vacas do grupo VitE. Por isso, as concentrações de cortisol foram maiores ($P < 0,05$) na semana anterior ao parto nas vacas do grupo Controle em relação às vacas do grupo VitE. Além disso, vacas com concentração de cortisol mais alta na amostragem mais próxima à data do parto apresentaram maior probabilidade de desenvolverem retenção de placenta ($P = 0,05$). Para cada 1 ng/mL de aumento na concentração do cortisol, aumentou em 5% a razão de chance das vacas apresentarem retenção de placenta.

As vacas que receberam suplementação de vitamina E pré-parto apresentaram tendência ($P = 0,10$) a redução na concentração de AGNEs em relação ao grupo controle na semana anterior ao parto (figura 4B). Após o parto, a concentração de AGNEs foi menor ($P = 0,05$) no grupo VitE em relação ao controle ($0,63 \pm 0,04$ e $0,53 \pm 0,04$ mM) e esta diferença foi observada primeiramente na semana do parto. Independente do tratamento, vacas que tiveram retenção de

placenta apresentaram maior ($P=0,01$) concentração de AGNEs três semanas antes do parto do que vacas que não apresentaram retenção de placenta ($0,44 \pm 0,05$ e $0,30 \pm 0,04$ mM). Ainda, a concentração de AGNEs na última semana de gestação apresentou tendência ($P = 0,06$) a ser superior nas vacas com retenção de placenta em relação às vacas sadias ($0,53 \pm 0,03$ e $0,44 \pm 0,03$ mM).

Figura 4 - Concentrações de cortisol pré-parto (A) e ácidos graxos não esterificados (B) em vacas não suplementadas com vitamina E injetável (Controle; $n = 85$) ou três aplicações de 1.000 UI de vitamina E cada aos $19,2 \pm 4,3$, $12,9 \pm 3,3$ e $6,2 \pm 2,9$ d em relação ao parto (VitE, $n = 87$). Para cortisol sérico, letras diferentes denotam efeito de tratamento ($^{a,b}P < 0,05$). Para ácidos graxos não esterificados, *denota efeito de tratamento e § denota tendência a efeito de tratamento ($P < 0,10$)

6.2 Índices sanitários e produtivos

A incidência de retenção de placenta diminuiu ($P = 0,007$) no grupo VitE em relação ao controle. Também a incidência de natimortos foi reduzida ($P < 0,001$) para menos da metade quando as vacas foram suplementadas com vitamina E comparadas a vacas não suplementadas. A probabilidade das vacas morrerem nos primeiros 200 d de lactação apresentou tendência ($P = 0,07$) a ser 2,28 vezes maior no grupo Controle comparada ao grupo VitE (Tabela 2). Apesar das diferenças encontradas no status de saúde das vacas, não foram observadas diferenças na produção total de leite aos 60, 100 ou 305 d de lactação (Tabela 2).

Tabela 2 - Incidência de retenção de placenta, natimortos, mortalidade de vacas e produção total de leite aos 60, 100 e 305 DEL em vacas suplementadas ou não com três aplicações semanais de 1.000 UI cada a partir de $19,2 \pm 4,3$ dias antes do parto

Item	Tratamento ¹		AOR (95% IC) ²	P
	Controle	VitE		
Vacas	441	449	----	----
Natimortos	14,9	6,8	2,42 (1,44 a 4,07)	0,001
Retenção de placenta	20,1	13,5	1,68 (1,15 a 2,44)	0,007
Mortalidade até 200 DEL (%)	5,4	2,4	2,28 (0,92 a 5,65)	0,07
Produção de leite, kg ($\pm$ EP)				
60 DEL	1.398 $\pm$ 28	1.400 $\pm$ 28	----	0,96
100 DEL	2.425 $\pm$ 47	2.388 $\pm$ 46	----	0,46
305 DEL	6.478 $\pm$ 109	6.413 $\pm$ 108	----	0,59

¹Vacas foram aleatoriamente distribuídas entre o grupo controle (nenhuma aplicação de vitamina E) ou três aplicações pré-parto de 1.000 UI de vitamina E cada aos 19,2 $\pm$ 4,3, 12,9 $\pm$ 3,3 e 6,2 $\pm$ 2,9 d em relação à data do parto.

²AOR = adjusted odds ratio; IC = Intervalo de confiança. Vitamina E é a referência para comparação.

6.3 Desempenho reprodutivo

Das 890 vacas que iniciaram o estudo, 81,4% receberam pelo menos uma inseminação nos primeiros 200 d de lactação (Controle = 82,8%; VitE = 80,0%) e 18,6% não foram inseminadas por terem sido vendidas, morrido ou consideradas descarte. O intervalo do parto à primeira IA foi igual ($P = 0,12$) entre os grupos Controle e VitE (Figura 6), uma vez que a taxa de inseminação não foi alterada ($P = 0,28$) pelo tratamento (AOR= 1,08; 95% IC= 0,94 a 1,25). Não foram observadas interações entre tratamento e paridade ou entre tratamento e fazenda para intervalo à primeira inseminação.

A taxa de concepção à primeira IA não diferiu ($P = 0,30$) entre tratamentos no dia 31 após a inseminação (Tabela 3). No entanto, devido à menor ($P = 0,01$) perda de gestação para as vacas tratadas, elas tenderam ($P = 0,08$) a apresentar 6,6 pontos percentuais de aumento na taxa de concepção no dia 62 após a inseminação. Um total de 1591 inseminações foram feitas nos primeiros 200 d de lactação, 837 no grupo controle e 754 no grupo VitE. A taxa de concepção para todas as inseminações foi maior ($P < 0,02$) no grupo VitE em relação ao controle quando os diagnósticos de gestação foram feitos tanto aos 31 quanto aos 62 d após a inseminação. Assim como para a primeira IA, perda de gestação entre os d 31 e 62 após a IA foi maior ($P = 0,03$) para o grupo Controle em relação ao VitE (Tabela 3). As taxas de concepção foram influenciadas por fazenda e por paridade, mas não foram observadas interações entre tratamento e paridade ou entre tratamento e fazenda. No dia 62 após todas as inseminações, a taxa de concepção foi maior ($P = 0,04$) para as primíparas em relação às multíparas (33,4 e 27,6%).

A taxa de inseminação, calculada para cada período de 21 d foi similar ($P = 0,64$) entre tratamentos com média de 50,0% (tabela 4). Apesar disso, a taxa de prenhez, calculada para cada período de 21 d apresentou tendência de aumento ($P = 0,08$) no grupo VitE em relação ao Controle (Tabela 4). De fato, quando o tempo à prenhez foi avaliado pelo modelo de risco proporcional do Cox, as vacas que receberam vitamina E se tornaram gestantes mais rapidamente ($P = 0,03$) que a vacas do grupo Controle (AOR=1,22; 95% IC = 1,02 a 1,46), resultando em 11 d de redução na mediana de tempo à prenhez (Figura 7). Aos 200 DEL, 52,4 e 57,3% das vacas nos grupos Controle e VitE, respectivamente, estavam gestantes. Fazenda e paridade influenciaram na taxa de prenhez, mas não foram observadas interações. Vacas primíparas se tornaram gestante mais rápido ($P < 0,01$) que vacas múltiparas (AOR=1,31; 95% IC = 1,09 a 1,58).

Vacas sem retenção de placenta tenderam ($P = 0,09$) a se tornar gestantes mais rapidamente que as vacas com retenção de placenta (AOR = 1,24; 95% IC = 0,96 a 1,60), resultando em 27 d de redução na mediana de intervalo à prenhez (Figura 4). No entanto, retenção de placenta não afetou ($P = 0,66$) a taxa de concepção aos 31 d. Perdas de gestação entre 31 e 62 d de gestação tenderam ($P = 0,09$) a ser maiores para vacas que tiveram retenção de placenta em relação a vacas sem retenção de placenta (25 e 16,4%). Foi observada interação entre tratamento e retenção de placenta ($P = 0,04$) para taxa de prenhez calculada a cada período de 21 d. As vacas no grupo controle com retenção de placenta reduziram a taxa de prenhez de 17,9 para 13,1% enquanto que, vacas com e sem retenção de placenta no grupo VitE apresentaram taxa de prenhez de 20,4 e 19,1%, respectivamente.

Figura 5 - Curva de sobrevivência para primeira inseminação em vacas sem aplicação de vitamina E (Controle; n = 433) ou três aplicações pré-parto de 1.000 UI cada (VitE; n = 433).

Tabela 3 - Suplementação de vitamina E durante o pré-parto e desempenho reprodutivo de vacas leiteiras (média $\pm$ EP)

Item	Tratamento ¹		AOR (95% IC) ²	P
	Controle	VitE		
Vacas ³	362	344	----	----
Dias pós-parto à 1 ^a IA	64 $\pm$ 1.2	62 $\pm$ 1.3	----	0,10
1 ^a IA pós-parto				
Gestante d 32, %	38,1	42,1	0,852 (0,629 a 1,155)	0,30
Gestante d 60, %	30,1	36,7	0,758 (0,552 a 1,042)	0,08
Perda de gestação, %	20,5	12,5	2,302 (1,144 a 4,634)	0,01
Todas IAs até 200 DEL				
Gestante d 32, %	34,5	38,4	0,594 (0,372 a 0,949)	0,02
Gestante d 60, %	26,9	32,8	0,535 (0,325 a 0,880)	0,01
Perda de gestação, %	21,1	14,5	1,590 (1,023 a 2,471)	0,03

¹Vacas foram aleatoriamente distribuídas entre o grupo Controle (nenhuma aplicação de vitamina E) ou três aplicações de 1.000 UI de vitamina E pré-parto (VitE), aos 19,2 $\pm$ 4,3, 12,9 $\pm$ 3,3 e 6,2 $\pm$ 2,9 d em relação ao parto.

²AOR = adjusted odds ratio; IC = Intervalo de confiança. Vitamina E é a referência para comparação.

³Inclui apenas vacas que receberam pelo menos uma inseminação nos primeiros 200 d de lactação.

Tabela 4 - Suplementação de vitamina E pré-parto e eficiência reprodutiva de vacas leiteiras (média)

Item	Tratamento		AOR (95% IC)	P
	Controle	VitE		
Vacas ¹ , n	397	396		
Taxa de inseminação ² , %	49,1	50,7	0,97 (0,84 a 1,11)	0,24
Taxa de prenhez ³ , %	16,7	19,3	0,85 (0,70 a 1,03)	0,08

¹Número de vacas com pelo menos um ciclo de 21 d após o período de espera voluntário no estudo.

²Calculado como a proporção de vacas inseminadas a cada período de 21 d após o fim do PEV dentre todas as vacas elegíveis a se tornarem gestantes naquele intervalo.

³Calculado como a proporção de vacas gestantes a cada período de 21 d após o fim do PEV dentre todas as vacas elegíveis a se tornarem prenhes naquele intervalo.

Figura 6 - Curva de sobrevivência para intervalo à prenhez em vacas que não receberam nenhum tratamento (Controle; $n = 433$) ou três aplicações de 1.000 UI de vitamina E pré-parto (Vitamina E; $n = 433$). Vacas tratadas se tornaram gestantes mais cedo que o grupo controle, $P = 0,03$ (AOR = 1,22; 95% IC = 1,02 a 1,46). Aos 200 d pós-parto, 52,4 e 57,3% dos grupos controle e VitE estavam gestantes. A mediana e a média ($\pm$ EP) dos dias em aberto foram, respectivamente, 135 e $137,4 \pm 3,1$ para controle e 124 e $125,9 \pm 3,0$ para o grupo VitE.

7 DISCUSSÃO

A concentração de vitamina E das vacas durante as ultimas semanas de gestação pode ter importantes efeitos sobre os parâmetros de saúde e desempenho após o parto. No entanto, muitos produtores continuam a suplementar as vacas secas com quantidades insuficientes de vitamina E. As vacas pré-parto em nosso estudo receberam menos de 50% das recomendações de vitamina E sugeridas pelo NRC (2001) para vacas nesta fase. 10 kg de consumo de matéria seca de pasto devem prover aproximadamente 235 UI de vitamina E às vacas pré-parto, uma vez que gramíneas tropicais apresentam concentração aproximada de 23,5 mg/kg (Tifton-85) de vitamina E (Arizmendi et al., 2005). No mesmo estudo, ao avaliar a concentração de vitamina E em quatro forrageiras tropicais, foi observada pequena variação entre as espécies, entre 23 e 35 mg/kg. Estas concentrações são ainda insuficientes para atender às exigências das vacas no período pré-parto, uma vez que 53% das vacas envolvidas no estudo apresentaram carência de vitamina E, baseado nas recomendações de Weiss et al. (1997). Baixas concentrações de vitamina E no sangue têm sido associadas a maior risco de doenças no peri-parto, especialmente mastites e retenção de placenta (Miller e Brzezinska-Slebozinska, 1993; Weiss et al., 1997; Leblanc et al., 2004). Desta forma, era esperado que a suplementação com vitamina E durante as três últimas semanas de gestação reduziria a incidência de retenção de placenta e melhoraria o desempenho reprodutivo das vacas após o parto. De fato, a administração de 1.000 UI de DL- α -tocoferol em intervalos semanais, começando três semanas antes da data prevista para o parto reduziu a incidência de retenção de placenta e natimortos, aumentou a taxa de concepção à primeira IA e considerando todas as inseminações e reduziu o intervalo do parto à prenhez.

Existem diversas evidências descritas na literatura da importância de concentrações adequadas de α -tocoferol no sangue e o papel da suplementação com vitamina E no período de transição sob o status de saúde das vacas no peri-parto. Em primeiro lugar, baixas concentrações de α -tocoferol sérico têm sido associadas a maior incidência de retenção de placenta (LeBlanc et al., 2004; Qu et al., 2014). LeBlanc et al. (2004) observaram uma redução de 21% no risco das vacas desenvolverem retenção de placenta para cada aumento de 1 μ g/ml na concentração sérica de α -tocoferol pré-parto. Qu et al. (2014) demonstraram que vacas com retenção de placenta apresentavam consistentemente menor

concentração de α -tocoferol do que vacas sem retenção de placenta. Semelhantemente aos achados de LeBlanc et al. (2004) e Qu et al. (2014), foi observado que vacas com menor concentração de α -tocoferol sérico apresentaram maior risco ao desenvolvimento de retenção de placenta. Além disso, foi observada queda na concentração de α -tocoferol circulante na medida em que se aproximou a data do parto, o que é consistente com estudos prévios (Weiss et al., 1992; Goff et al., 2002), provavelmente pela queda na ingestão de matéria seca destas vacas e ainda pela transferência do α -tocoferol para o colostro (Goff et al., 2002).

Existem fortes evidências de que a suplementação com vitamina E pré-parto reduz a incidência de doenças peri-parto, particularmente em vacas com concentrações baixas de α -tocoferol circulante ou quando Se na dieta é um limitante. Uma única injeção de 680 UI de vitamina E e 50 mg de Se administrada em vacas alimentadas com 500 UI de vitamina E via dieta tendeu a reduzir a incidência de retenção de placenta de 10,1% para 3,1% (Aréchiga et al., 1994). No entanto, LeBlanc et al. (2002) não observaram benefícios de uma única aplicação de 3.000 UI de vitamina E 4 a 10 dias pré-parto. Os mesmos autores demonstraram que subgrupos de vacas com concentrações inferiores de α -tocoferol sérico apresentaram redução na incidência de retenção de placenta após o tratamento. Erskine et al. (1997) também mostraram que a administração de 3.000 UI de vitamina E 8 a 14 dias pré-parto reduziu a incidência de retenção de placenta de 12,5 para 6,4%. No presente estudo as vacas apresentaram carência de vitamina E, e a administração semanal de 1.000 UI de vitamina E reduziu a incidência de retenção de placenta de 20,1 para 13,5%. Apesar do benefício do tratamento ter reduzido a incidência de retenção de placenta, a incidência ainda foi superior à relatada para rebanhos norte americanos (7,4%; Chapinal et al., 2011).

Os mecanismos pelos quais a suplementação com vitamina E reduz a incidência de retenção de placenta ainda não foram completamente elucidados. Vitamina E é uma molécula lipídica, encontrada principalmente nas membranas celulares que inibem a peroxidação por reagir e neutralizar radicais peroxy lipídicos (Wagner et al., 1996). Quando vacas são suplementadas com vitamina E pré-parto, tecidos e células, incluindo leucócitos têm a concentração de vitamina E aumentada (Weiss et al., 1992), o que melhora a função das células polimorfo nucleares (Hogan et al., 1992). De fato, suplementação com vitamina E pré-parto não apenas aumenta a concentração de α -tocoferol sérica e celular (Weiss et al., 1992), mas também

aumenta antioxidantes de ação rápida (Miller e Brzezinska-Slebodzinska, 1993), sugerindo efeitos do tocoferol em múltiplos polos de antioxidantes celulares. A melhoria no status antioxidante de vacas periparto parece estar relacionada a maior imuno competência, a qual é fundamental para o processo de liberação da placenta imediatamente após o parto (Kimura et al., 2002). Além disso, muitos dos efeitos do α -tocoferol são independentes do efeito antioxidante e sim mediados por outras vias de sinalização celular (Azzi, 2007; McCary et al., 2012). Isto pode ser claramente demonstrado comparando-se α -tocoferol com γ -tocoferol, ambas isoformas da vitamina E têm efeito similar na proteção contra estresse oxidativo (Chung et al., 2010; Wagner et al., 2004) mas produzem diferenças dramáticas na expressão gênica durante a ativação de células T. De fato, α -tocoferol estimulou a expressão de genes que aumentaram a proliferação celular, enquanto γ -tocoferol inibiu a expressão de muitos desses genes permitindo a cito toxicidade de células T (Zingg et al., 2013). Aumento na função imune pelo α -tocoferol seja por efeito antioxidante ou por outras vias de sinalização celular parece ser de fato a base para o entendimento da menor incidência de retenção de placenta em vacas suplementadas com vitamina E pré-parto.

Após o parto, o sistema imune materno ataca imediatamente os tecidos fetais remanescentes e, em vacas, retenção de placenta esta associada a falhas nos mecanismos de imuno rejeição dos tecidos fetais pelo sistema imune materno. Substâncias químicas que atraem leucócitos, reconhecidas pelo sistema imune materno promovem a quimiotaxia de leucócitos para os tecidos cotiledonários (Gunnink, 1984a). De fato, inabilidade dos tecidos cotiledonários em atrair leucócitos tanto antes, durante e após o parto têm sido observada em vacas que desenvolvem retenção de placenta (Gunnink, 1984a; Gunnink, 1984b; Heuwieser e Grunert, 1987). Com a proximidade do parto, o complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe 1 é expresso na placenta, ativando a imuno rejeição dos tecidos placentários (Davies et al., 2004). Evidências de outros estudos avaliando MHC de classe 1 da mãe e do feto claramente indicam que a compatibilidade entre estas moléculas maternas e do feto levam a falha no processo de rejeição dos tecidos fetais pelo sistema imune materno (Benedictus et al., 2012). A inabilidade do sistema imune materno em reconhecer os antígenos fetais e rejeitar os tecidos placentários leva a um aumento no risco de retenção de placenta (Davies et al., 2004; Benedictus et al., 2012). Como parte da resposta imune materna contra o tecido placentário,

células polimorfo nucleares migram para os placentomas e liberam enzimas proteolíticas como metaloproteinases que facilitam a degradação do colágeno que une tecido fetais e maternos na placenta. Em vacas, a liberação da placenta está associada a colagenólise e proteólise (Gross et al., 1985), processos induzidos por células imunes. Administração de collagenase via artéria umbilical resulta na liberação da placenta em vacas (Eiler e Hopkins, 1993). Desta forma, o comprometimento da função das células polimorfo nucleares e outras células imunes (Kimura et al., 2002), o qual é frequentemente associado com concentrações inadequadas de α -tocoferol (Hogan et al., 1992), aumenta o risco de retenção de placenta pela resposta menos robusta do sistema imune materno contra os antígenos fetais placentários.

Outro fator de risco ao desenvolvimento de retenção de placenta é o aumento na concentração de cortisol nas semanas que antecedem o parto (Peter e Bosu, 1987; Wischral et al., 2001). É bem estabelecido que o aumento no cortisol fetal desencadeia o processo de partição (Shenavai et al., 2012). No entanto, apesar do cortisol aumentar próximo à data do parto, muitas vacas, particularmente vacas sem retenção de placenta, mostram pequenas mudanças na concentração circulante de cortisol durante o processo do parto (Peter e Bosu, 1987). Também se sabe que o aumento na concentração de corticosteroides suprime função de leucócitos em vacas (Roth et al., 1982). Assim, o aumento no cortisol circulante entre duas e uma semana antes do parto nas vacas do grupo controle é consistente com resultados prévios (Peter e Bosu, 1987; Wischral et al., 2001) e consistente com o link entre cortisol circulante e o risco ao desenvolvimento de retenção de placenta. Consistentemente com esta ideia, foi demonstrado que o tratamento com vitamina E injetável reduziu a elevação no cortisol sérico na semana anterior ao parto e a incidência de retenção de placenta. Outros também já mostraram que a combinação de vitamina E injetável e Se ou alimentação com vitamina E minimiza a elevação na concentração de cortisol sérico em vacas (Gupta et al., 2005) e em roedores (Watson e Petro, 1982). Dados em frangos de corte indicaram que a suplementação com vitamina E reduziu a concentração de corticosterona na glândula adrenal em resposta a injeções de ACTH (Taniguchi et al., 2001). Embora, não se saiba exatamente o efeito da vitamina E sob a liberação de cortisol pelas células da adrenal, sugere-se que as EROs podem afetar a esteroidogênese, através da inativação peroxidativa de enzimas esteroidogênicas (Miller e Brzezinska-

Slebodzinska, 1993). Estudos in vitro mostraram que quando os níveis de vitamina E nas células adrenais foram reduzidos, as enzimas 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase e 21-hydroxylase foram mais resistentes à inativação quando comparado às enzimas 17 α -hydroxylase e 17,20-lyase (Takayanagi et al., 1986). Isto poderia favorecer a produção de cortisol em detrimento à produção de esteroides C₁₉. Coletivamente estes dados indicam que imunossupressão próxima ao parto, a qual pode estar associada a elevações nas concentrações de cortisol ou baixo consumo de vitamina E, aumenta o risco de retenção de placenta. Assim, o mecanismo que explica a redução na incidência de retenção de placenta envolve a melhoria na função imune mediada por células e redução na concentração de cortisol próximo ao parto.

Interessantemente, vacas suplementadas com vitamina E apresentaram expressiva redução na incidência de natimortos. Similar ao nosso estudo, um extenso trabalho conduzido em 21 rebanhos na Suécia, reportou que a suplementação com vitamina E em vacas no pré-parto causou uma redução de 62% no risco de natimortos (Waller et al., 2007). Quantidades inadequadas de vitamina E podem aumentar o risco de peroxidação lipídica, além de deficiência de vitamina E e Se serem conhecidos como causadores de lesões no miocárdio, aumentando a mortalidade de bezerras (Murray et al., 2008). Em ratos, a administração de corticosteroides aumenta a mortalidade das crias, mas este efeito negativo foi revertido com o tratamento de vitaminas E e C (Niu et al., 2013). Hartfield et al. (2000) revisaram a literatura sobre sobrevivência de cordeiros e concluíram que a suplementação com vitamina E em ovelhas gestantes aumentou a sobrevivência neonatal e a saúde dos cordeiros. Um estudo recente investigou a concentração de micronutrientes no fígado de bezerros de corte no Canadá e encontrou que as deficiências mais comuns foram magnésio, vitamina A e vitamina E (Waldner e Blakley, 2014). Desta forma, deficiência de vitamina E pode aumentar a incidência de natimortos e a mortalidade neonatal em alguns rebanhos. Isto poderia ser o resultado da peroxidação lipídica e lesão de músculos, incluindo lesões de miocárdio. Além disso, deficiência de vitamina E poderia levar a alterações nas funções placentárias, aumentando a mortalidade fetal próximo ao parto. Esta possibilidade intrigante ainda precisa ser testada em experimentos futuros e poderia prover o link entre a redução na incidência de retenção de placenta e de natimortos em vacas suplementadas com vitamina E durante a gestação tardia.

A suplementação com vitamina E pré-parto aumentou o desempenho reprodutivo. O intervalo à prenhez foi reduzido e esse benefício foi resultado do aumento na taxa de concepção, primeiramente por uma redução nas perdas de gestação. Intervalo à primeira IA e taxa de inseminação não foram afetadas pelo tratamento, possivelmente pelos programas reprodutivos adotados em cada fazenda, no qual as vacas não detectadas em cio eram protocoladas para inseminação em tempo fixo. Portanto, a redução no intervalo à prenhez em vacas suplementadas com vitamina E foi resultado do aumento na taxa de concepção e redução na perda de gestação. Suplementação com vitamina E tem sido relatada por aumentar a eficiência reprodutiva em alguns estudos. Aréchiga et al. (1994) relataram aumento na eficiência reprodutiva em vacas suplementadas com vitamina E durante a gestação tardia. Aréchiga et al. (1998) reportaram redução no intervalo entre o parto e a prenhez de 14 dias e ainda aumento na taxa de concepção à segunda IA em vacas suplementadas com 500 mg de vitamina E e 50 mg de Se de forma injetável aos 30 dias pós-parto. A observação de que a suplementação após o parto com vitamina E aumentou a taxa de concepção apenas ao segundo serviço (Aréchiga et al., 1998), enquanto a suplementação pré-parto apresentou benefícios ao primeiro serviço (Aréchiga et al., 1994; presente estudo) sugere um efeito tardio da suplementação com vitamina E sobre a fertilidade. Esta possibilidade deve ainda ser testada em experimentos futuros para investigar este efeito tardio da vitamina E sobre a fertilidade.

Muitos mecanismos já foram propostos nos quais antioxidantes, incluindo a vitamina E poderiam aumentar a eficiência reprodutiva das vacas (Miller e Brzezinska-Slebodzinska, 1993), e eles estão geralmente associados à redução dos efeitos negativos das EROs, que podem interferir na esteroidogênese e no desenvolvimento embrionário. Um dos modelos usados para estudar os efeitos da vitamina E tem sido estresse térmico. Vacas sob estresse térmico apresentam maior estresse oxidativo (Bernabucci et al., 2002), uma vez que células expostas a altas temperaturas apresentam maior concentração de EROs e produtos de peroxidação lipídica (Wang et al., 2013). Apesar dos benefícios já bem caracterizados da vitamina E na redução do dano oxidativo à célula (Olcot e Emerson, 1937; Miller e Brzezinska-Slebodzinska, 1993; Wagner et al., 1996), os benefícios da suplementação estratégica para aumentar a eficiência reprodutiva em vacas sob estresse calórico tem sido inconsistentes. Ealy et al. (1994) não observaram

benefício da suplementação com vitamina E injetável sobre a taxa de concepção em vacas resfriadas ou não próximo à data da inseminação. Outra possibilidade seria o efeito da deficiência de vitamina E sobre a função uterina, afetando a vascularização e placentação normal nas vacas (Kasimanickam et al., 2012). Alternativamente, a vitamina E poderia ter efeitos sobre os folículos que desenvolvem durante a gestação tardia ou pós-parto imediato e potencialmente afetar a fertilidade destes ovócitos em desenvolvimento no futuro, semelhantemente ao modelo proposto por Leroy et al. (2008) em que o BEN afeta o desenvolvimento dos ovócitos no período de transição. Outra possibilidade do efeito positivo da vitamina E pode ser mediado por meio do efeito na saúde das vacas no pós-parto, uma vez que reduz a incidência de natimortos e retenção de placenta, dois fatores que atrasam o retorno à ciclicidade e reduzem as taxa de concepção (Santos et al., 2010). Vacas que apresentam problemas de parto, como retenção de placenta e natimortos apresentam maior risco ao desenvolvimento de metrite e descargas vaginais purulentas nas primeiras semanas após o parto (Dubuc et al., 2010). Estes problemas uterinos reduzem a taxa de concepção (Dubuc et al., 2010) e aumentam o risco de perdas de gestação (Santos et al., 2010), semelhantemente ao observado nas vacas do grupo controle no presente estudo. De fato, o impacto positivo da suplementação com vitamina E na taxa de prenhez foi semelhante em vacas que apresentaram ou não retenção de placenta.

A suplementação com vitamina E durante o período pré-parto não afetou a produção de leite na lactação subsequente, apesar de ter reduzido a incidência de natimortos e de retenção de placenta. Weiss et al. (1997) também não observaram diferença na produção de leite após a suplementação com vitamina E apesar de terem relatado redução na incidência de mastite.

8 CONCLUSÕES

Vacas leiteiras, recebendo menos de 50% das recomendações do NRC apresentaram concentrações séricas de α -tocoferol inferiores ao limite mínimo relatado na literatura como fatores de risco ao desenvolvimento de patologias após o parto. Além disso, a concentração de α -tocoferol sérico durante o período de estudo apresentou associação à ocorrência de retenção de placenta e ao subsequente desempenho reprodutivo das vacas. Suplementação com injeções de 1.000 UI de vitamina E nas três semanas anteriores ao parto, reduziu a incidência de retenção de placenta e de natimortos, além de aumentar o desempenho reprodutivo das vacas até os 200 d de lactação e ainda reduzir a taxa de mortalidade. O presente estudo confirma achados de estudos prévios em que vacas alimentadas com menos de 1.000 UI de vitamina E por dia durante as últimas semanas de gestação apresentam maior incidência de desordens no período de transição e ainda pior desempenho reprodutivo na lactação subsequente e que suplementação com vitamina E é eficaz na prevenção de retenção de placenta e melhora o desempenho reprodutivo de vacas leiteiras.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES

De fato, o fornecimento de vitamina E nas quantidades recomendadas pelo NRC, mesmo em situações em que as vacas têm livre acesso a áreas de pastagem é fundamental para prevenir a ocorrência de desordens metabólicas e/ou infecciosas no período de transição.

No presente estudo, a suplementação de vitamina E pré-parto reduziu a incidência de retenção de placenta e de natimortos e melhorou o desempenho reprodutivo das vacas. Este aumento na eficiência reprodutiva de vacas leiteiras é fundamental, especialmente no caso de vacas mestiças, uma vez que a persistência de lactação é menor. Reduzindo o intervalo à gestação das vacas se tem um maior número de animais em fases iniciais de lactação, com maior eficiência produtiva e maior retorno sobre o custo de alimentação e consequentemente menos animais em fases finais da lactação em que a eficiência produtiva e o retorno sobre o custo de alimentação é menor.

Desta forma, os resultados podem contribuir para o aumento da eficiência reprodutiva e consequentemente produtiva da pecuária leiteira nacional, contribuindo para a melhor rentabilidade de produtores de leite, que atuam em um cenário onde a margem de lucro é estreita e o mercado exige mais a cada ano.

REFERÊNCIAS

- ARÉCHIGA, C.F.; ORTÍZ, O.; HANSEN, P.J. Effect of prepartum injection of vitamin E and selenium on postpartum reproductive function of dairy cattle. **Theriogenology**, Philadelphia, PA, v.41, p.1251-1258, 1994.
- ARÉCHIGA, C.F.; VÁSQUEZ-FLORES, S.; ORTÍZ, O.; HERNANDEZ-CERÓN, J.; PORRAS, A.; MCDOWEL, L.R.; HANSEN, P.J. Effect of injection of β -carotene or vitamin E and selenium on fertility of lactating dairy cows. **Theriogenology** 50:65-76, 1998.
- ARIZMENDI, D.; MC DOWELL, L.; SINCLAIR, T.; MISLEVY, P.; MARTIN, F.; WILKINSON, N. A- Tocopherol and β -carotene concentrations in four tropical grasses as affected by increasing day length. Florida beef report 39-40, 2005.
- AZZI, A. Molecular mechanism of alpha-tocopherol action. **Free Radic. Biol. Med.** 43:16-21, 2007.
- BAINBRIDGE, D.R.J.; SARGENT, I.L.; ELLIS, S.A. Increased expression of major histocompatibility complex (MHC) class I transplantation antigens in bovine trophoblast cells before fusion with maternal cells. **Reproduction**, Southampton, UK, v. 122, p.907-913, 2001.
- BELL, M.J.; ROBERTS, D.J. The impact of uterine infection on a dairy cow's performance. **Theriogenology**, Philadelphia, PA, v.68, p.1074-1079, 2007.
- BENEDICTUS, L.; THOMAS, A.J.; JORRITSMA, R.; DAVIES, C. J.; KOETS, A.P. Two-way calf to dam major histocompatibility class I compatibility increases risk for retained placenta in cattle. **Am. J. Reprod. Immunol.** 67:224-230, 2012.
- BERNABUCCI, U.; RONCHI, B.; LACETERA, N.; NARDONE, A. Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season. **J. Dairy Sci.** 85:2173-2179, 2002.
- BUTLER, S.T.; MARR, A.L.; PELTON, S.H.; RADCLIFF, R.P.; LUCY, M.C.; BUTLER, W.R. Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A. **Journal of Endocrinology**, London, UK, v.176, p.205-217, 2003.
- BUTLER, S.T.; PELTON, S.H.; BUTLER, W.R. Insulin increases 17 beta-estradiol production by the dominant follicle of the first postpartum follicle wave in dairy cows. **Reproduction**, Southampton, UK, v.127, p.537-545, 2004.
- CAI, T.Q.; WESTON, P.G.; LUND, L.A.; BRODIE, B.; MCKENNA, D.J.; WAGNER, W.C. Association between neutrophil functions and periparturient disorders in cows. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.55 p.934-943, 1994.

CERRI, R.L.; SANTOS, J.E.P.; JUCHEM, S.O.; GALVAO, K.N.; CHEBEL, R.C. Timed artificial insemination with estradiol cypionate or insemination at estrus in high-producing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, IL, v. 87, p.3704–3715, 2004.

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

CHEEMA, A.H.; GILANI, S.H. Cardiac and myopathies in neonatal lambs: histological and histochemical studies. **Biology of Neonate**, Basel, v. 34, p.84-91, 1978

CHUNG, M. Y.; YEUNG, S.F.; PARK, H.J.; VOLEK, J.S.; BRUNO, R.S. Dietary α - and γ -tocopherol supplementation attenuates lipopolysaccharide-induced oxidative stress and inflammatory-related response in an obese mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. **J. Nutr. Biochem.** 21:1200-1206, 2010.

DAVIES, C.J.; HILL, J.R.; EDWARDS, J.L.; SCHRICK, F.N.; FISHER, P.; ELDRIDGE, J.A.; SCHLAFFER, D.H. Major histocompatibility antigen expression on the bovine placenta: its relationship to abnormal pregnancies and retained placenta. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.82/83, p.267–280, 2004.

DEBIER, C. Vitamin E during pre- and postnatal periods. **Vitamins and Hormones**, New York, v.76, p.357-373, 2007.

DUBOIS, P.R.; WILLIAMS, D.J. Increased incidence of retained placenta associated with heat stress in dairy cows. **Theriogenology**, Philadelphia, PA, v. 13, p.115-121, 1980.

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

DUBUC, J.; DUFFIELD, T.F.; LESLIE, K.E.; WALTON, J.S.; LEBLANC, S.J. Effects of postpartum uterine diseases on milk production and culling in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, IL, v.94, p.1339-1346, 2011.

DUBUC, J.; DUFFIELD, T.F.; LESLIE, K.E.; WALTON, J.S.; LEBLANC, S.J. Randomized clinical trial of antibiotic and prostaglandin treatments for uterine health and reproductive performance in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, IL, v.94 p.1325-1338, 2011a.

EALY, A. D.; ARÉCHIGA, C.F.; BRAY, D.R.; RISCO, C.A.; HANSEN, P.J. Effectiveness of short-term cooling and vitamin E for alleviation of infertility induced by heat stress in dairy cows. **J. Dairy Sci.** 77:3601-3607, 1994

EILER, H.; HOPKINS, F. M. Successful treatment of retained placenta with umbilical cord injections of collagenase in cows. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 203(Suppl. 3):436-443, 1993.

ERB, H.N. Interrelationships among production and clinical disease in dairy cattle: a review. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 28, p.326-329, 1987.

ERSKINE, R.J.; BARTLET, P.C.; HERDT, T.; GASTON, P. Effect of parenteral administration of vitamin E on health of periparturient dairy cows. **Journal of the American Veterinary Medical association**, Washington, DC, v.211, n.4, p.466-469, 1997.

FOLDI, J.M.; KULSCÁR, A.; PÉCSI, B.; HUYGHE, C.D.; SA, J.A.C.; LOHUIS, M. ; COX, P.; HUSZENCZA, G. Bacterial complications of postpartum uterine involution in cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, NL, v.96 p.265-281, 2006.

GALVÃO, K.F.; GRECO, L.F.; VILELA, J.M.; SÁ FILHO, M.F.; SANTOS, J.E.P. Effect of intrauterine infusion of ceftiofur on uterine health and fertility in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, IL, v.92, p.1532-1542, 2009.

GALVAO, K.N.; FLAMINIO, M.J.B.R.; BRITTIN, S.B.; SPER, R.; FRAGA, M.; CAIXETA, L.; RICCI, A.; GUARD, C.L.; BUTLER, W.R.; GILBERT, R.O. Association between uterine disease and indicators of neutrophil and systemic energy status in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, IL, v. 93, p.2926-2937, 2010.

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

GOSHEN, T.; SHIPEL, N.Y. Evaluation of intrauterine antibiotic treatment of clinical metritis and retained fetal membranes in dairy cows. **Theriogenology**, Philadelphia, PA, v. 66, p.2210–2218, 2006.

GRASSO, P.; SCHOLZ, R.W.; ERSKINE, R.J.; EBERHART, J. Phagocytosis, bactericidal activity, and oxidative metabolism of mammary neutrophils from dairy cows fed selenium-adequate and selenium-deficient diets. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 51, p.269, 1990.

Gross, T. S.; WILLIAMS, W.F.; MANSPEAKER, J.E.; RUSSEK, E. In vitro proteolytic activity of the late pregnant and peripartum bovine placenta. **J. Anim. Sci.** 61(Suppl. 1):391-392, 1985.

GROSS, T.S.; WILLIAMS, W.F. Bovine placental prostaglandin synthesis: principal cell synthesis as modulated by binucleate cell. **Biology of Reproduction**, Madison, WI, v.38, p. 1027-1034, 1988.

GRUNERT, E.; MORROW, D.A. Etiology of retained bovine placenta. **Theriogenology**, Philadelphia, PA, v.2, p. 237-242, 1986.

GUNNINK, J.W. Post-partum leucocytic activity and its relationship to caesarian section and retained placenta. **The Veterinary Quartely**, Kansas, v.6, p.55–57, 1984.

GUNNINK, J. W. Retained placenta and leucocytic activity. **Vet. Q.** 6(Suppl. 2): 49-51, 1984b.

GUPTA, S.; GUPTA, H.K.; SONI, J. Effect of vitamin E and selenium supplementation on concentrations of plasma cortisol and erythrocyte lipid peroxides and the incidence of retained fetal membranes in crossbred dairy cattle. **Theriogenology**, Philadelphia, PA, v.64, p.1273-1286.

HAN, Y.K.; KIM, I.H. Risk factors for retained placenta on the occurrence of postpartum diseases and subsequent reproductive performance in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, IL, v.6 p.53-59, 2005.

HARTFIELD, P. G.; DANIELS, J.T.; KOTT, R.W.; BURGESS, D.E.; EVANS, T.J. Role of supplemental vitamin E in lamb survival and production: A review. **J. Anim. Sci.** 77:1-9, 2000.

HEUWIESER, W.; GRUNERT, E. Significance of chemotactic activity for placental expulsion in cattle. **Theriogenology**, Philadelphia, PA, v.27, p.907-912, 1987.

HILL, J.R.; SCHLAFFER, D.H.; FISHER, P.J.; DAVIES, C.J. Abnormal expression of trophoblast major histocompatibility complex class I antigen is cloned bovine pregnancies is associated with a pronounced endometrial lymphocytic response. **Biology of Reproduction**, Madison, WI, v. 67, p.55-63, 2002.

HOFFMAN, B.; SCHULER, G. The bovine placenta: observation during the second half of gestation. **Domestic Animal Endocrinology**, Philadelphia, PA, v. 23, p.309-320, 2002.

HOGAN, J.S.; WEISS, W.P.; SMITH, K.L.; SCHOENBERGER, P.S. Bovine neutrophil responses to parenteral vitamin E. **Journal of Dairy Science**, Champaign, IL, v. 65, p.399, 1992.

HUZZEY, J.M.; NYDAM, D.V.; GRANT, R.J.; OVERTON, T.R. Associations of prepartum plasma cortisol, haptoglobin, fecal cortisol metabolites and nonesterified fatty acids with postpartum health status in Holstein dairy cow. **Journal of Dairy Science**, Champaign, IL, v. 94, p.5878-5889, 2011.

JOOSTON, I.; SANDERS, M.F.; HENSEN, E.J. Involvement of major histocompatibility complex class I compatibility between dam and calf in the aetiology of bovine retained placenta. **Animal Genetics**, Oxford, v.22, p.455-463, 1991.

KANKOFER, M. Antioxidative **defense mechanisms** against reactive oxygen species in bovine retained and not-retained placenta: activity of glutathione peroxidase, glutathione transferase, catalase and superoxide dismutase. **Placenta**, London, v.22, p.466-472, 2001.

KASIMANICKAM, R. K.; KASIMANICKAM, V.R.; HALDOSON, G.J.; TIBARY, A. Effect of tocopherol supplementation during last trimester of pregnancy on mRNA abundances of interleukins and angiogenesis in ovine placenta and uterus. **Reprod. Biol. Endocrinol.** 10:4, 2012.

KAY, R.M. Changes in milk production, fertility and calf mortality associated with retained placenta or the birth of twins. **Veterinary Record**, London, v.102, n.22, p. 477-479, 1978.

KEHRLI, M.E.; NONNECKE, B.J.; ROTH, J.A. Alterations in bovine PMN function during the periparturient period. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.50, p. 207-214, 1989.

KIMURA, K.; GOFF, J.P.; KEHRLI, M.E. Jr.; REINHARDT, T.A. Decreased neutrophil function as a cause of retained placenta in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, IL, v.85, p.544-550, 2002.

LACETERA, N.; SCALIA, D.; FRANCI, O.; BERNABUCCI, U.; RONCHI, B.; NARDONE, A. Short communication: Effects of non-esterified fatty acids on lymphocyte function in dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, Champaign IL, v.87, p.1012-1014, 2004.

LEBLANC, S.J.; DUFFIED, T.F.; LESLIE, K.E.; BATEMAN, K.G.; KEEFE, G.P.; WALTON, J.S.; JOHNSON, W.H. The effect of treatment of clinical endometrits on reproductive performance in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign IL, v.85 p.2237-2249, 2002.

LEBLANC, S.J.; HERDT, T.H.; SEYMOUR, W.M.; DUFFIELD, T.F.; LESLIE, K.E. Peripartum serum vitamin E, retinol, and beta-carotene in dairy cattle and their associations with disease. **Journal of Dairy Science**, Champaign, IL, v.87, p.609-619, 2004.

LEBLANC, S.J. Monitoring Metabolic Health of Dairy Cattle in the Transition Period. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v.56, p.29-35, 2010.

LEBLANC, S.J.; OSAWA, T.; DUBUC, J. Reproductive tract defense and disease in postpartum dairy cows. **Theriogenology**, Philadelphia, PA, v.76, p.1610-1618, 2011.

LEITE, G.S.; MORAES, J.C.F.; PIMENTEL, C.A. Eficiência produtiva e reprodutiva em vacas leiteiras. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31 p. 467-472, 2001.

LEWIS, G.S. Uterine health and disorders. **Journal of Dairy Science**, Champaign, IL, v.80 p.984-994, 1997.

LEROY, J.L.M.R.; VANHOLDER, T.; DELANGHE, J.R.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; BOLS, P.E.J.; DEWULF, J.; KRUIF, A. Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. **Theriogenology**, Philadelphia, PA, v.62, p.1131-1143, 2004.

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

MACE, D.L.; TUCHER, J.A.; BILLS, C.B.; FERRIARA, C.J. Reduction in incidence of birth of premature, weak and dead calves following sodium-selenite d-alpha-tocopheryl therapy in pregnant cows. **Bull Department of Agriculture State**, California, v.52, p.21-28, 1963

MACHLIN, L. J.; BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, Bethesda, MD, v. 1, p. 441, 1987.

MARTINEZ, N.; RISCO, C.A.; LIMA, F.S.; BISINOTTO, R.S.; GRECO, L.F.; RIBEIRO, E.S.; MAUNSELL, F.; GALVÃO, K.N. SANTOS, J.E.P. Evaluation of periparturient calcium status, energetic profile and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. **Journal of Dairy Science**, Champaign IL, v. 95, p. 7158-7172, 2012.

MCCARY, C. A.; YOON, Y.; PANAGABKO, C.; CHO, W.; ATKINSON, J. COOK-MILLS. J.M. Vitamin E isoforms directly bind PKC α and differentially regulate activation of PKC α . **Biochem. J.** 441:189-198, 2012.

MCDUGALL, S. Effect of intrauterine antibiotic treatment on reproductive performance of dairy cows following periparturient disease. **New Zealand Veterinary Journal**, Palmerston North, v.49, p.150–158, 2001.

MCNAUGHTON, A.P.; MURRAY, R.D. Structure and function of the bovine fetomaternal unit in relation to the causes of retained fetal membranes. **Veterinary Journal**, London, v. 165, p.615-622, 2009.

MEYER, C.L.; BERGER, P.J.; KOEHLER, K.J. Interactions among factors affecting stillbirths in Holstein cattle in the United States. **Journal of Dairy Science**, Champaign IL, v.83, p.2657-2663, 2000.

MILLER, J.K.; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E. Oxidative stress, antioxidants and animal function. **Journal of Dairy Science**, Champaign IL, v. 76, p.2812-2823, 1993.

MURRAY, R.D.; WILLIAMS, A.J.; SHELDON, I M. Field investigation of perinatal mortality in Friesian cattle associated with myocardial degeneration and necrosis. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 43, p.339-345, 2008.

NIU, Y.; HERRERA, E.A.; EVANS, R.D.; GIUSSANI, D.A. Antioxidant treatment improves neonatal survival and prevents impaired cardiac function at adulthood following neonatal glucocorticoid therapy. **J. Physiol.** 591: 5083-5093, 2013.

NOBRE, M.M.; COELHO, S.G.; HADDAD, J.P.A.; CAMPOS, E.F.; LANA, A.M. Q.; REIS, R.B.; SATURNINO, H.M. Avaliação da incidência e fatores de risco da retenção de placenta em vacas mestiças leiteiras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 64, p.101-107, 2012.

OLCOTT, H. S.; EMERSON, O.H. Antioxidant properties of tocopherols. **J. Am. Chem. Soc.** 59:1008-1009, 1937.

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

OVERTON, M.; FETROW, J. Economics of postpartum uterine health. In: DAIRY CATTLE REPRODUCTION COUNCIL, 2008, Omaha, Nebraska. **Proceedings...** Omaha, Nebraska, 2008. p. 39-43,

PETER, A.T. A review on morphology, components and defects from terminology and clinical perspectives. **Theriogenology**, Philadelphia, PA, v.80 p.693-705, 2013.

PETER, A.T.; BOSU, W.T.K. Peripartal endocrine changes associated with retained placenta in dairy cows. **Theriogenology**, Philadelphia, PA, v.28 p.383-394, 1987.

QU, Y.; FADDEN, A.N.; TRABER, M.G.;BOBE, G. Potential risk indicators of retained placenta and other diseases in multiparous cows. **J. Dairy Sci.** 97:4151-4165, 2014.

REIMERS, T.J.; ULLMAN, M.B.; HANSEL, W. Progesterone an prostanoid production by bovine binucleate trophoblastic cells. **Biology of Reproduction**, Madison, WI, v. 33, p. 1227-1236, 1985.

RIBEIRO, E.S.; LIMA, F.S.; AYRES, H.; GRECO, L.F.; BISINOTTO, R.S.; FAVORETO, M.; MARSOLA, R.S.; MONTEIRO, A.P.A.; THATCHER, W.W.; SANTOS, J.E.P. Prevalence of periparturient diseases and effects on fertility of seasonally calving grazing dairy cows supplemented with concentrates. **Journal of Dairy Science**, Champaign, IL, v. 94(E-suppl 1), p.63, 2011.

ROBERTS, R.M.; CROSS, J.C.; LEAMAN, D.W. Interferon as hormones of pregnancy. **Endocrine reviews**, Chevy Chase, MD, v. 13, p.432-452, 1992.

ROMANIUKOWA, K. Phagocytosis in the uterus. In: CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 10., 1984. **Proceedings...** Champaign-Urbana, IL: University of Illinois, 1984. p. 33–38.

ROTH, J. A.; KAEBERLE, M.L.;HSU, W.H. Effects of ACTH administration on bovine polymorphonuclear leukocyte function and lymphocyte blastogenesis. **Am. J. Vet. Res.** 43: 412-416, 1982.

SANTOS, J.E.P.; THATCHER, W.W.; CHEBEL, R.C.; CERRI, R L.A.; GALVAO, K N. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrous synchronization programs. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, NL, v. 82–83, p. 513–535, 2004.

SANTOS, J.E.P.; RUTIGLIANO, H.M.; SÁ FILHO, M.F. Risk factors for resumption of postpartum cyclicity and embryonic survival in lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, NL, v. 110, p.207-221, 2009.

SANTOS, J.E.P.; BISINOTTO, R.S.; RIBEIRO, E.S.; LIMA, F.S.; GRECO, L.F.; STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W. Applying nutrition and physiology to improve reproduction in dairy cattle. **Society for Reproduction and Fertility**, Southampton, UK, v. 67, p. 387-403, 2010.

SCHLAFFER, D.H.; FISHER, P.J.; DAVIES, C.J. The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and diseases. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, NL, v. 60, p.145-160, 2000.

SCHNEIDER, J.E. Energy balance and reproduction. **Physiology Behavior**, Elmsford, v.81, p.289-317, 2004.

SHELDON, I.M.; DOBSON, H. Postpartum uterine health in cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, NL, v.82-83 p.295-306, 2004.

SHELDON, I.M.; LEWIS, G.S.; LEBLANC, S.; GILBERT, R.O. Defining postpartum uterine disease in cattle. **Theriogenology**, Philadelphia PA, v.65 p.1516-1530, 2006.

SCHILLO, K.K. Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. **Journal of Animal Science**, Champaign IL, v. 70, p.1271-1282, 1992.

STEVENSON, J.S.; PURSLEY, J.R.; GARVERICK, H.A.; FRICKE, P.M.; KESLER, D.J.; OTTOBRE, J.S.; WILTHBANK, M.C. Treatment of cycling and noncycling lactating dairy cows with progesterone during ovsynch. **Journal of Dairy Science**, Champaign IL, v. 89, p.2567-2578, 2006.

TAKAYANAGI, R.; KATO, K.I.; IBAYASHI, H. Relative inactivation of steroidogenic enzyme activities of in vitro vitamin E-depleted human adrenal microsomes by lipid peroxidation. **Endocrinology** 119:464-469, 1986.

TANIGUCHI, N.; OHTSUKA, A.; HAYASHI, K. A high dose of vitamin E inhibits adrenal corticosterone synthesis in chicken treated with ACTH. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.** 47:40-46, 2001.

WAGNER, B. A.; BUETTNER, G.R. BURNS, C.P. Vitamin E slows the rate of free radical-mediated lipid peroxidation in cells. **Arch. Biochem. Biophys.** 334:261-267, 1996.

WAGNER, K. H.; KAMAL-ELDIN, A.; ELMDFIA, I. Gamma-tocopherol--an underestimated vitamin? *Ann. Nutr. Metab.* 48:169-188, 2004.

WALDNER, C.L.; BLAKLEY, B. Evaluating micronutrient concentrations in liver samples from abortions, stillbirths, and neonatal and postnatal losses in beef calves. *Journal Of Veterinary Diagnostic Investigation*, Columbia, v. 26, p.1-14, 2014.

WALLER, K. P.; HALLÉN SANDGREN, C.; EMANUELSON, U. JENSEN, S.K. Supplementation of RRR- α -tocopherol acetate to periparturient dairy cows in commercial herds with high mastitis incidence. **Journal of Dairy Science** 90:3460-3646, 2007.

WANG, Z.; CAI, F.; CHEN, X.; LUO, M.; HU, L.; LU, Y. The role of mitochondria-derived reactive oxygen species in hyperthermia-induced platelet apoptosis. **PLOS One**. 8(Suppl.9):1-14, 2013.

WATHES, D.C.; WOODING, F.B. An electron microscopic study of implantation in the cow. **American Journal of Anatomy**, New York, v.159, p.285-306, 1980.

WATHES, D.C.; CHENG, Z.; BOURNE, N.; TAYLOR, V.J.; COFFEY, M.P.; BROTHERSTONE, S. Differences between primiparous and multiparous dairy cows in the inter-relationships between metabolic traits, milk yield and body condition score in the periparturient period. **Domestic Animal Endocrinology**, Philadelphia, PA, v. 33, p. 203–225, 2007.

WATSON, R. R.; PETRO, T.M. Cellular immune response, corticosteroid levels and resistance to *LiFreria monocytogenes* and murine leukemia in mice fed a high vitamin E diet. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 393: 205-210, 1982.

WEISS, W.P.; HOGAN, J.S.; SMITH, K.L.; HOBLET, K.H. Relationships among selenium, vitamin E, and mammary gland health in commercial dairy herds. **Journal of Dairy Science**, Champaign, IL, v. 73, p.381, 1990.

WEISS, W.P.; HOGAN, J.S.; SMITH, K.L.; TODHUNTER, D.A.; WILLIAMS, S.N. Effect of supplementing periparturient cows with vitamin E on distribution of α -tocopherol in blood. **Journal of Dairy Science**, Champaign, IL, v. 75, p.3479, 1992.

WEISS, W.P.; HOGAN, J.S.; SMITH, K.L. Use of α -tocopherol concentrations in blood components to assess vitamin E status of dairy cows. **Agri-Practice**, Cluj-Napoca, v.15, n.7, p.5, 1994.

WEISS, W.P.; HOGAN, J.S.; TODHUNTER, D.A.; SMITH, K.L. Effect of Vitamin E Supplementation in Diets with a Low Concentration of Selenium on Mammary Gland Health of Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, IL, v. 80, p. 1728-1737, 1997.

WILLIAMS, W.F.; MARGOLIS, M.J.; MANSPEAKER, J.; DOUGLAS, L.W.; DAVIDSON, J.P. Peripartum changes in the bovine placenta related to fetal membrane retention. **Theriogenology**, Philadelphia, PA, v. 28, p.213-223, 1987.

WILLIAMS, E.J.; FISCHER, D.P.; NOAKES, D.E.; ENGLAND, G.C.W.; RYCROFT, A.; DOBSON, H.; SHELDON, I.M. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. **Theriogenology**, Philadelphia, PA, v.68, p.549-559, 2007.

WISCHRAL, A.; VERRESHI, I.T.N.; LIMA, S.B.; HAYASHI, L.F.; BARNABE, R.C. Pre-parturition profile of steroids and prostaglandin in cows with or without foetal membrane retention. **Anim. Reprod. Sci.** 67:181-188, 2001.

WOODING, F.B.P.; WATHES, D.C. Binucleate cell migration in the bovine placentome. **Journal of Reproduction And Fertility**, Cambridge, GB, v. 59, p.425-430,1980.

YEON-KYUNG, H.; ILL-HWA, K. Risk factors for retained placenta and the effect of retained placenta on the occurrence of postpartum diseases and subsequent reproductive performance in dairy cows. **Journal of Veterinary Science**, Seoul, Korea, v.6, p.53-59, 2005.

ZINNG, J. M.; HAN, S.N.; PANG, E.; MEYDANI, M.;MEYDANI, S.N.; AZZI, A. In vivo regulation of gene transcription by alpha- and gamma-tocopherol in murine T lymphocytes. **Arch. Biochem. Biophys.** 538:111-119, 2013.