

Universidade de São Paulo  
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos

CLAUDIA RIBEIRO DO VALLE

**Estudo da influência da suplementação de vitamina  
E nas atividades funcionais dos neutrófilos do leite  
de bovinos**

CLAUDIA RIBEIRO DO VALLE

**Estudo da influência da suplementação de  
vitamina E nas atividades funcionais dos  
neutrófilos do leite de bovinos**

Tese de Doutorado apresentada à  
Faculdade de Zootecnia e Engenharia  
de Alimentos da Universidade de São  
Paulo, como parte dos requisitos para  
a obtenção do Título de Doutor em  
Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e  
Produtividade Animal.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Elizabeth O. da  
Costa Freitas Guimarães

"Por isso eu pergunto  
A vocês no mundo  
Se é mais inteligente  
O livro ou a sabedoria

O mundo é uma escola  
A vida é o circo  
Amor palavra que liberta  
Já dizia o profeta"

Marisa Monte

Sem a sabedoria, a dedicação, a compreensão e o amor das  
pessoas, que de uma ou outra forma, participaram deste trabalho,  
este livro não existiria.

## Dedicatória

À minha querida Sofia, que não somente compreendeu, como incentivou, passando horas ao meu lado, enquanto eu trabalhava, ela brincava e por último disse: "Quando eu crescer, mãe, você me dá um livro deste?"

## Agradecimentos

Aos meus pais, Francisco de Salles E Rosa Maria, que mais uma vez, proporcionaram a execução de um projeto científico e de vida!

À Profª Drª Elizabeth Oliveira da Costa, minha orientadora, pelo grande apoio.

Ao Prof Dr. Marcelo de Cerqueira César, meu co-orientador, pelo apoio e pela confiança depositada.

Ao Reny, meu marido, que realizou com todo empenho o experimento de campo, viabilizando a sua execução, além do pontual apoio moral.

À Profª Drª Andréa Rentz Ribeiro, minha grande amiga e "professora", pela grande dedicação, comprometimento e cumplicidade.

À Poliana de Paula Brito, minha orientada e amiga, por tanto empenho e profissionalismo.

À Silvana Marina Piccoli Pugine pela grande amizade, dedicação e comprometimento com o experimento.

À Profª Drª Mariza Pires de Melo pela confiança, pelos ensinamentos e pelo grande incentivo.

Ao Nagama, em especial ao Dr. Felício Garino Júnior pelo grande apoio e pelas cepas bacterianas.

Ao Prof. Dr. Marcelo Landim Brísola pela execução das análises estatísticas.

Aos professores da PUC Minas - Poços de Caldas, Flávio Elston e Flávio Alvim Braga por todo apoio e colaboração.

Aos funcionários do Hospital Veterinário da PUC Minas-Poços de Caldas, Claudiney, Fatinha, Fernanda, Letícia, Lakshmi e Carlinhos pela disponibilidade e colaboração.

À Neuza Maria de Paula Brito por toda retaguarda nos dias infundáveis de experimento.

À Camila Boschini, à Patrícia Goldschmidt Lins, à Viviane Cerqueira Dantas por toda a amizade e colaboração.

À Conceição, secretária da Pós-Graduação, pela disponibilidade e paciência.

Aos funcionários da biblioteca da FZEA/USP, Iara, Marcelo, Patrícia, Bernadete, Maria e Cláudio pela grande colaboração e atenção dispensada.

Ao Prof. Dr. Flávio Meirelles por disponibilizar o microscópio e ao Nilton pela colaboração nas fotografias.

Ao Prof Dr. Marcus Antônio Zanetti pelas análises de selênio.

À Profª Drª Catarina Abdalla Gomide pelas análises bromatológicas.

Aos professores da Pós-Graduação da FZEA/USP, em especial ao Prof. Maia e ao Prof. Rogério, pela atenção e incentivo.

Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa, da PUC Minas e à Comissão de Pós-Graduação da FZEA/USP pelo apoio financeiro.

## RESUMO

VALLE, C.R. **Estudo da influência da suplementação de vitamina E nas atividades funcionais dos neutrófilos do leite de bovinos.** 2005. 82 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.

No início da lactação as vacas podem apresentar várias doenças metabólicas e infecciosas, como a mastite, devido às abruptas mudanças fisiológicas, entre elas a supressão da reposta imune, concomitante com a queda da ingestão de matéria seca e da concentração sérica de vitamina E. Com o objetivo de estudar a influência da suplementação de vitamina E nas atividades funcionais dos neutrófilos do leite de bovinos, catorze novilhas da raça holandesa foram divididas aleatoriamente em dois grupos, sendo um com sete animais não suplementados (controle) e outro com sete animais suplementados com 1000 UI/dia de vitamina E durante 30 dias antes do parto previsto e 10 dias após o mesmo. Na primeira semana após o parto foi colhido o leite dos quartos mamários CMT negativo, após estimulação da leucocitose com a infusão intramamária de solução de glicogênio de ostra a 0,1% e 0,5%, 36 e 12 horas respectivamente, antes da colheita do leite. As células foram isoladas, contadas e estimou-se a viabilidade das mesmas. Em seguida foram realizados os testes de fagocitose incubando-se zimosan opsonizado ( $2 \times 10^8$ /ml) com neutrófilos ( $2 \times 10^7$ /ml), contados no microscópio óptico. Suspensões na concentração de  $2 \times 10^8$ /ml de cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis*, *Escherichia coli* e *Prototheca zopfii* procedentes de casos de mastite clínica bovina foram incubados com neutrófilos ( $2 \times 10^7$ /ml). A solução foi plaqueada antes da incubação para fagocitose, após a fagocitose, após o tratamento com antibióticos e após a lise dos neutrófilos para a determinação dos patógenos destruídos. As análises estatísticas foram feitas através da ANOVA. A porcentagem de células que englobaram três ou mais partículas de zimosan opsonizado foi de 52% no grupo não suplementado e 66% no grupo suplementado ( $P < 0,05$ ). Não foram detectadas diferenças estatísticas para a porcentagem de fagocitose de microrganismos opsonizados, sendo 30,2% e 28,8% para o grupo controle e suplementado, respectivamente. A destruição intracelular de patógenos foi de 99%, não diferindo entre os grupos. Em seguida, determinou-se a produção de  $O_2^-$  e  $H_2O_2$ , sendo 1,6 e 3,0 nmol de  $O_2^-$  e 0,83 e 0,67  $\mu M$  de  $H_2O_2$  para o grupo controle e suplementado, respectivamente. A atividade enzimática no grupo controle e suplementado foi de 4,3 e 3,6  $\mu mol/min/mg$  proteína para a catalase, 43 e 49 nmol/min/mg de proteína para a glutatona redutase, 16,2 e 30 nmol/min/mg proteína para a glutatona peroxidase, 3,85 e 6,32 U/mg proteína para a superóxido dismutase e 0,67 e 0,29 U/mg proteína para a mieloperoxidase, sendo que não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos. A suplementação com vitamina E aumentou a habilidade fagocitária dos neutrófilos somente no ensaio com zimosan e não alterou a atividade enzimática assim como a produção de espécies reativas de oxigênio. O equilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio, importante para a destruição intracelular de patógenos, e os antioxidantes é extremamente complexo, não sendo afetado pela suplementação de um único agente antioxidante.

Palavras-chave: espécies reativas de oxigênio, fagocitose, neutrófilos, mastite, vitamina E.

## ABSTRACT

VALLE, C.R. **Study of influence vitamin E supplementation on milk neutrophil function in dairy cows.** 2005. 82 f. Ph.D. Thesis – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.

At the early lactation, lactating cows are more exposed to metabolic and infectious diseases as mastitis, due to the physiological modifications accomplished with diminishing of dry matter ingestion, immune response depressed and the vitamin E plasmatic concentration level reduction. Therefore, to study the influence of vitamin E supplementation on the function of milk neutrophils, fourteen primigravid holstein heifers were casually allocated in two groups: one was oral supplemented with vitamin E (1000UI/day) 30 days pre parturition and 10 days post parturition, the other group did not receive vitamin E supplementation (control group). During the first week post-parturition, milk was collected from negative CMT quarter after induction of leucocytosis with a intramammary infusion of oyster glycogen infusion (0,1% e 0,5%, 36 e 12 hours respectively). The cells were isolated from milk, counted and the viability was estimated. After these trials the assays: phagocytosis with opsonized zymosan and phagocytosis with microorganisms that cause mastitis were performed. zymosan opzonized particles ( $2 \times 10^8$ /mL) were incubated with neutrophils ( $2 \times 10^7$ /mL) and counted on the optic microscope. The microorganisms ( $2 \times 10^8$ /mL) *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis*, *Escherichia coli* and *Prototheca zopfii* were incubated with neutrophils ( $2.10^7$ /mL) from milk. Solution were spread plated pre phagocytosis assay, after phagocytosis, post treatment with antibiotics and after break of neutrophils. The results were analysed from the statistical ANOVA. For the phagocytosis assays, 52% of neutrophils from control group phagocytosed three or more zymosan particles, and in the supplemented group, 66% of the cells ( $P < 0,05$ ). For the microorganisms, did not have statistical difference and the results were 30.7% and 28.2% for the control and supplemented groups. The average of the pathogens intracellular kill was 99% in the both groups. In sequence the tests for production  $O_2^-$  and  $H_2O_2$ , enzymatic activity of catalase, superoxide dismutase, glutathione reductase, glutathione peroxidase and myeloperoxidase were made. It were no detected any statistical differences in respect to the production of  $O_2^-$  and  $H_2O_2$ . The production of  $O_2^-$  was 1,6 nmol and 3,0 nmol and the  $H_2O_2$  production was 0,83  $\mu$ M and 0,67  $\mu$ M for the groups control and supplemented. The control and supplemented group enzymatic activity results obtained were: catalase 4.3 and 3.6  $\mu$ mol/min/mg protein, glutathione reductase 43 and 49 nmol/min/mg protein, glutathione peroxidase 16.2 and 30 nmol/min/mg protein, superoxide dismutase 3.85 and 6.32 U/mg protein and myeloperoxidase 0,67 and 0,29 U/mg protein. In relation to these results it was not detected any statistical difference. Vitamin E supplementation increased zymosan phagocytosis and did not affect enzyme activities involved in the mechanisms of protection against oxygen reactive species and microorganism phagocytosis in the neutrophils. The vitamin E supplementation didn't change the complex balance among the reactions of antioxidants and oxygen reactive species. It can be concluded that due to the complexity of the mechanisms involved the supplementation with just one isolate antioxidant did not interfered with the defence neutrophil activities.

Key words: neutrophil, mastitis, oxygen reactive species, phagocytosis, vitamin E.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Avaliação da viabilidade dos neutrófilos no microscópio óptico em câmara de Neubauer, utilizando azul de trypan como corante: as células azuis foram consideradas mortas, (400x). Pirassununga, 2005..... 42
- Figura 2 - Ilustração da avaliação da capacidade fagocitária dos neutrófilos no microscópio óptico, utilizando a coloração com Panótico: foram contadas as células que englobaram três ou mais partículas de zimosan opsonizado, (1000x). Pirassununga, 2005 ..... 43
- Figura 3 - Porcentagem de fagocitose de zimosan opsonizado pelos neutrófilos do leite de novilhas da raça Holandesa, sendo sete não suplementadas (C= controle) e sete suplementadas com 1000 UI de vitamina E (Vit E) na ausência e na presença de PMA. Pirassununga, 2005 ..... 51
- Figura 4 - Porcentagem de fagocitose dos microrganismos opsonizados causadores de mastite pelos neutrófilos do leite de novilhas da raça Holandesa, sendo sete não suplementadas (C= controle) e sete suplementadas com 1000 UI de vitamina E (Vit E). Pirassununga, 2005 ..... 52
- Figura 5 - Neutrófilos fagocitando *Corynebacterium bovis*: à esquerda bastonetes Gram + sendo englobados; à direita pseudópodes contendo bactérias, (1000x). Pirassununga, 2005..... 54
- Figura 6 - Neutrófilos fagocitando *Staphylococcus aureus*: cocos Gram+ aderidos à célula e vacúolos fagocíticos, (1000x). Pirassununga, 2005..... 54
- Figura 7 - Neutrófilo com fagossomo contendo *Staphylococcus aureus*; coloração de Gram (1000x). Pirassununga, 2005..... 55
- Figura 8 - *Staphylococcus aureus* aderido ao neutrófilo; coloração de Gram, (1000x). Pirassununga, 2005..... 55
- Figura 9 - Neutrófilos fagocitando *Escherichia coli*: células lançando os pseudópodes e presença de bactérias Gram- aderidas às mesmas, (1000x). Pirassununga, 2005.. 55
- Figura 10 - Fagocitose de *Prototheca zopffi*: à esquerda neutrófilo englobando *Prototheca zopffi*; à direita adesão do neutrófilo à *Prototheca zopffi*, utilizando a coloração com Panótico, (1000x). Pirassununga, 2005..... 56
- Figura 11 - Neutrófilo apresentando vacúolo fagocítico e ao lado *Prototheca zopffi*; coloração com Panótico, (1000x). Pirassununga, 2005..... 56
- Figura 12 - *Prototheca zopffi* aderida ao neutrófilo; coloração com Panótico, (1000x). Pirassununga, 2005..... 56
- Figura 13 - Produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em µM pelos neutrófilos do leite de novilhas da raça Holandesa, sendo sete não suplementadas (C= controle) e sete suplementadas com 1000 UI de vitamina E (Vit E). Pirassununga, 2005 ..... 59



- Figura 14 - Atividade da superóxido dismutase (SOD;  $U\ mg^{-1}\times 10$ ) e da glutathiona peroxidase (GPX;  $nmol\ min^{-1}\ mg\ proteína^{-1}$ ) nos neutrófilos de novilhas da raça Holandesa do grupo controle (1a7) e suplementadas com 1000 UI de vitamina E (8 a 14). Pirassununga, 2005..... 62
- Figura 15 - Atividade da mieloperoxidase (MOP;  $U\ mg^{-1}\times 10$ ) e da glutathiona redutase (GR;  $nmol\ min^{-1}\ mg\ proteína^{-1}$ ) nos neutrófilos de novilhas da raça Holandesa do grupo controle (1a7) e suplementadas com 1000 UI de vitamina E (8 a 14). Pirassununga, 2005..... 62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição dos alimentos utilizados na formulação da dieta fornecida aos animais experimentais, na base da matéria seca. Pirassununga, 2005.....	39
Tabela 2 - Composição estimada da dieta fornecida aos animais durante o experimento.Pirassununga, 2005.....	40
Tabela 3 - Composição da mistura mineral fornecida aos animais. Pirassununga, 2005.....	40
Tabela 4 - Porcentagem de fagocitose de zimosan opsonizado pelos neutrófilos do leite de novilhas da raça Holandesa, sendo sete não suplementadas (controle) e sete suplementadas com 1000 UI de vitamina E (Vitamina E) na ausência e na presença de <i>phorbol myristate acetate</i> (PMA). Pirassununga, 2005.....	50
Tabela 5 - Porcentagem de fagocitose dos microrganismos opsonizados causadores de mastite pelos neutrófilos do leite de novilhas da raça Holandesa, sendo sete não suplementadas (controle) e sete suplementadas com 1000 UI de vitamina E (Vitamina E). Pirassununga, 2005.....	52
Tabela 6 - Porcentagem de fagocitose de todos os microrganismos, pelos neutrófilos do leite de novilhas da raça Holandesa, sendo sete não suplementadas (1 a 7) e sete suplementadas com 1000 UI de vitamina E (8 a 14), apresentados por animal. Pirassununga, 2005.....	53
Tabela 7 - Porcentagem de destruição dos microrganismos opsonizados causadores de mastite pelos neutrófilos do leite de novilhas da raça Holandesa, sendo sete não suplementadas (controle) e sete suplementadas com 1000 UI de vitamina E (Vitamina E). Pirassununga, 2005.....	57
Tabela 8 - Porcentagem média de destruição intracelular de todos os microrganismos opsonizados estudados, pelos neutrófilos do leite de novilhas da raça Holandesa, sendo sete não suplementadas (1 a 7) e sete suplementadas com 1000 UI de vitamina E (8 a 14) apresentados por animal. Pirassununga, 2005.....	58
Tabela 9 - Produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em µM pelos neutrófilos do leite de novilhas da raça Holandesa, sendo sete não suplementadas (controle) e sete suplementadas com 1000 UI de vitamina E (Vitamina E) na ausência e na presença de <i>phorbol myristate acetate</i> (PMA). Pirassununga, 2005.....	59
Tabela 10 - Atividade média da catalase, da glutathiona redutase, da glutathiona peroxidase, da superóxido dismutase e da mieloperoxidase nos neutrófilos do leite de novilhas da raça Holandesa, sendo sete não suplementadas (controle) e sete suplementadas com 1000 UI de vitamina E (Vitamina E).Pirassununga, 2005....	60

- Tabela 11 - Atividade das enzimas que apresentaram correlação estatisticamente significativa, sendo positiva entre a glutathione peroxidase (GPX) e a superóxido dismutase (SOD) e negativa entre a glutathione reductase (GR) e a mieloperoxidase (MOP) nos neutrófilos do leite de novilhas da raça Holandesa não suplementadas (1 a 7) e suplementadas com 1000 UI de vitamina E (8-14). Pirassununga, 2005..... 61
- Tabela 12 - Concentração sérica de selênio de novilhas da raça Holandesa, sendo sete não suplementadas (controle) e sete suplementadas com 1000 UI de vitamina E (Vitamina E) no pré e pós-parto. Pirassununga, 2005..... 63

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	17
2.1 Mastite .....	17
2.2 Resposta imune .....	19
2.3 Destruição de patógenos pelo mecanismo dependente de oxigênio .....	21
2.4 Vitamina E e selênio .....	22
2.5 Requerimentos de vitamina E e selênio .....	30
2.6 Fontes alimentares de vitamina E .....	32
2.7 Absorção e excreção da vitamina E .....	33
2.8 Hipervitaminose .....	34
2.9. Determinação de concentrações de selênio e vitamina E .....	35
3 OBJETIVOS .....	38
3.1 Objetivo geral .....	38
3.2 Objetivos específicos .....	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	39
4.1 Formação dos grupos experimentais e alimentação dos animais .....	39
4.2 Exame microbiológico do leite .....	41
4.3 Obtenção dos neutrófilos e avaliação da viabilidade .....	41
4.4 Avaliação da capacidade fagocitária dos neutrófilos utilizando zimosan opsonizado .....	42
4.5 Avaliação da capacidade fagocitária dos neutrófilos e destruição intracelular de patógenos utilizando microrganismos opsonizados .....	43
4.6 Produção de superóxidos.....	45
4.7 Produção de peróxido de hidrogênio .....	46
4.8 Determinação da atividade enzimática .....	46
4.8.1 Determinação da atividade da glutathione peroxidase .....	46

4.8.2 Determinação da atividade da glutathione redutase .....	47
4.8.3 Determinação da atividade da catalase .....	47
4.8.4 Determinação da atividade da superóxido dismutase .....	47
4.8.5 Determinação da atividade da mieloperoxidase .....	47
4.9 Determinação da concentração de proteína nas amostras .....	48
4.10 Análise de selênio .....	48
4.11 Análises estatísticas .....	48
4.12 Fluxograma do experimento .....	49
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>50</b>
5.1 Avaliação da viabilidade .....	50
5.2 Avaliação da capacidade fagocitária dos neutrófilos utilizando zimosan opsonizado .....	50
5.3 Avaliação da capacidade fagocitária dos neutrófilos utilizando microrganismos causadores de mastite .....	51
5.4 Avaliação da capacidade de destruição intracelular de patógenos pelos neutrófilos .....	57
5.5 Produção de superóxido .....	58
5.6 Produção de peróxido de hidrogênio .....	58
5.7 Avaliação da atividade enzimática .....	59
5.8 Concentração sérica de selênio .....	63
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>70</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>71</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A prevenção e o tratamento da mastite são preocupações primárias da indústria leiteira. As práticas como a higiene na ordenha, a redução da exposição aos patógenos ambientais e o tratamento de vacas secas com antibióticos são medidas que têm reduzido a ocorrência da doença (SORDILLO; SHAFER-WEAVER; DeROSA,1997), mas não o suficiente para diminuir o impacto econômico da mesma (POLITIS et al., 1996), sendo considerada, por muitos autores, a doença de maior importância econômica nos rebanhos (HEMINGWAY, 1999).

As perdas na produção, o custo com os tratamentos e o descarte prematuro de vacas são problemas sérios enfrentados pelos criadores, além das penalidades impostas pelos laticínios com relação ao leite com alta contagem de células somáticas (COSTA et al, 1999; HEMINGWAY, 1999).

Nos levantamentos feitos em rebanhos leiteiros de São Paulo e Minas Gerais, 72 % das vacas apresentaram mastite subclínica em pelo menos um quarto e a taxa de quartos afetados foi de 46 %. A porcentagem de animais com mastite clínica foi de 17,45 % (COSTA et al., 1995a). Considerando que a mastite subclínica reduz de 3 a 46 % a produção de leite no quarto afetado, pode-se perceber que estes rebanhos estão perdendo, em média, cerca de 12 % da produção de leite em decorrência da mastite. Os prejuízos por mastite subclínica em propriedades, nestas mesmas regiões, corresponderam em média a US\$ 317,00 por vaca/ano e US\$ 21000,00 por propriedade/ano (COSTA et al., 1999).

Como o uso de antibióticos para combater as infecções intramamárias é associado à possibilidade de desenvolver resistência e à contaminação dos alimentos com resíduos dos mesmos (COSTA, 1998), as pesquisas têm-se concentrado em estratégias alternativas para controlar a doença e minimizar a necessidade de utilizar a antibioticoterapia como tratamento.

Um dos meios de diminuir o impacto da mastite na indústria leiteira é através do aumento da habilidade natural da vaca de resistir às infecções. A defesa da glândula mamária contra os patógenos causadores de mastite é mediada por diversos fatores anatômicos, celulares e solúveis. A eficiência destes mecanismos de defesa, após a penetração do patógeno pelo esfíncter do teto, determinará a resistência da glândula às novas infecções intramamárias. Existem certos períodos na lactação em que as defesas não operam adequadamente, deixando a vaca mais susceptível à mastite. As estratégias auxiliares para melhorar a resposta imune da glândula mamária durante

estes períodos de imuno depressão podem exercer grande impacto na habilidade da vaca em resistir às infecções (COSTA, 1998; SORDILLO; SHAFER-WEAVER; DeROSA,1997).

Durante o metabolismo são produzidos diversas espécies reativas de oxigênio como os radicais livres, superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical peroxil ( $ROO^{\cdot}$ ), radical hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ) e outros oxidantes não radicais como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio singlete ( $^1O_2$ ). Os efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio (lipoperoxidação, danos ao DNA e destruição de proteínas) são referidos como causadores de câncer, doenças inflamatórias, arteriosclerose e envelhecimento (NOCKELS, 1996). Os efeitos indiretos são devidos ao consumo competitivo de energia, aumentando a utilização de glicose e interferindo em funções metabólicas importantes (MILLER; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA; MADSEN,1993).

Além disto, células fagocitárias como neutrófilos e macrófagos produzem espécies reativas de oxigênio nas reações respiratórias, que são usadas para destruir os microrganismos fagocitados (NOCKELS, 1996), porém o acúmulo de peróxidos de hidrogênio nos polimorfonucleares é associado à redução da destruição intracelular de patógenos (MILLER; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA; MADSEN,1993; SMITH; HOGAN; WEISS,1997).

A deficiência de substâncias protetoras naturais ou a exposição excessiva aos estímulos produtores de oxidantes podem resultar em estresse oxidativo. O envolvimento do estresse oxidativo na etiologia de certas doenças em vacas leiteiras é sugerido pela constatação da redução da retenção de placenta e da mastite quando a vitamina E e o selênio são suplementados na dieta. A vitamina E é essencial para o crescimento, a reprodução, a prevenção de várias doenças e a proteção da integridade dos tecidos (MILLER; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA; MADSEN,1993; Mc DOWELL et al., 1996; SMITH; HOGAN; WEISS,1997).

No início da lactação, as vacas leiteiras podem apresentar muitas doenças infecciosas e metabólicas devido, provavelmente, às abruptas mudanças fisiológicas e de manejo que ocorrem no período de transição. Um evento crítico que acontece no período peri-parto é a significativa supressão da resposta imune (MALLARD et al.,1998).

A imunossupressão periparto é multifatorial, sendo associada com mudanças endócrinas e com a acentuada queda de ingestão de matéria seca que ocorre nesta época (GOFF; HORST,

1997). A diminuição da fagocitose e da destruição intracelular de patógenos ocorre paralelamente com a diminuição da ingestão de matéria seca e da concentração de vitamina E circulante. Estudos como o Weiss et al. (1990) mostraram que a suplementação com vitamina E no período seco e no início da lactação evita a queda na concentração sanguínea da mesma, mas não necessariamente, diminui a incidência de doenças (ALLISON; LAVEN, 2000).

A literatura tem apresentado resultados controversos em relação à suplementação com vitamina E. Portanto, são necessários estudos mais detalhados para avaliar a resposta à suplementação, como, diferenças desta quanto aos patógenos causadores de infecções. Valle et al. (2000a) observaram maior porcentagem de infecções intramamárias, em vacas que receberam uma suplementação diária com 3000 UI de vitamina E, provavelmente, devido à menor produção de espécies reativas de oxigênio, inibindo assim um dos principais mecanismos de destruição de patógenos, a explosão respiratória.

No trabalho de Valle (2000) foram observadas diferenças na resposta à suplementação com vitamina E entre os grupos experimentais em três rebanhos examinados. Na propriedade onde os animais suplementados apresentaram redução na ocorrência de mastite clínica havia predominância de infecções por *Corynebacterium* sp, sendo que nas demais, onde predominaram outros microrganismos (*Staphylococcus* sp, *Streptococcus* sp), não foram detectadas diferenças entre os grupos suplementados e não suplementados. Estes resultados indicam uma possível interferência da suplementação de vitamina E nas mastites por tal microrganismo, diminuindo os sinais clínicos das mesmas.

*Staphylococcus* sp, *Streptococcus* sp e *Corynebacterium* sp, agentes de mastites contagiosas, têm sido os principais microrganismos isolados dos casos mastites clínicas e subclínicas em rebanhos dos estados de São Paulo e Minas Gerais, considerou-se relevante avaliar *in vitro* a atividade dos neutrófilos desafiados com estes microrganismos, assim como a habilidade fagocitária, a destruição de patógenos e a produção de espécies reativas de oxigênio. Para esclarecer possíveis alterações nas atividades do neutrófilos expostos aos agentes ambientais, foram incluídos no protocolo experimental *Escherichia coli* e *Prototheca zopfii*.

Desta forma buscar-se-ia possíveis explicações para os fenômenos observados *in vivo*, nos estudos de Valle (2000) e Valle et al. (2000a), bem como, para os contraditórios resultados



obtidos por diversos autores que estudaram a suplementação de vitamina E como estratégia auxiliar no controle de mastite bovina.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Mastite

A mastite, processo inflamatório da glândula mamária, pode ter várias causas, sendo que a infecciosa é a mais freqüente, geralmente causada por bactérias. Os fungos e as algas também podem estar envolvidos na sua etiologia (BRAMLEY; DODD, 1984; COSTA et al., 1994a). Em trabalho de revisão sobre a etiologia da mastite, Watts (1988) levantou 137 espécies diferentes de microrganismos causadores da mesma.

Nos estados de São Paulo e Minas Gerais predominam as mastites causadas por *Staphylococcus* sp, *Streptococcus* sp e *Corynebacterium* sp (BALDASSI, et al., 1991; BENITES et al., 2001; COSTA, 1998; COSTA et al., 1986, 1994b, 2000, 2001; LANGONI et al., 1991, 1998; NADER FILHO et al., 1985), sendo também estes os principais agentes etiológicos da mastite clínica nestes mesmos estados (COSTA et al., 1995b, 2001, BENITES et al., 2001).

Em relação aos patógenos causadores da mastite, é comum a distinção em dois grupos, os agentes contagiosos e os ambientais. Os agentes contagiosos necessitam do animal para a sobrevivência, multiplicando-se no interior da glândula mamária, no canal do teto ou sobre a pele e são transmitidos, principalmente, durante a ordenha. Os principais agentes contagiosos são: *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativo, *Corynebacterium bovis*. Os agentes ambientais são oportunistas e estão presentes no ambiente em que o animal vive, sendo que a infecção pode ocorrer tanto no período entre ordenhas quanto durante a ordenha. Dentre estes, os principais são: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, espécies de *Citrobacter*, *Serratia* e *Proteus*, *Streptococcus uberis*, *S. dysgalactiae*, *S. faecalis*, *S. faecium* e outros *Streptococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*, Actinomicetales (*Actinomyces pyogenes*, *Nocardia asteroides* e *N. brasiliensis*), leveduras, fungos micelianos, e algas (*Prototheca zopfii*) (BENITES et al., 1999, 2000; BRAMLEY; DODD, 1984; COSTA et al., 1996; LANGONI et al., 1992; MCDONALD, 1984; SANDHOLM; KAARTINEN; PYÖRÄLÄ, 1990; RADOSTITS et al., 2002; RIBEIRO et al., 2001; SMITH; TODHUNTER; SCHONBERGER, 1985).

A infecção de uma glândula sadia geralmente com a entrada do microrganismo pelo canal do teto, ocasionando a infecção intramamária. A infecção pode ocorrer também por via sistêmica

como, por exemplo, em doenças como a tuberculose, brucelose, leptospirose, salmonelose e listeriose (COSTA, 1998).

Várias ocorrências facilitam a penetração do ducto do teto pelos patógenos da mastite. Um trauma pode afetar a integridade do canal do teto levando à infecção. O equipamento de ordenha mal regulado pode influenciar nas taxas de infecção devido às flutuações de vácuo e pulsação inadequada, promovendo a entrada de organismos patogênicos no interior do teto, facilitando a passagem de patógenos de uma vaca para outra, exacerbando qualquer tipo de lesão, causando hiperqueratose ou edema (SHEPHERD, 1996).

A interrupção da lactação também contribui para a instalação dos microrganismos. Na glândula mamária ativa, o fluxo de saída do leite dificulta a colonização dos microrganismos, eliminando-os mecanicamente. As alterações fisiológicas que ocorrem durante o período seco podem facilitar a ocorrência de infecções (BRAMLEY; DODD, 1984). Evidências clínicas e experimentais sugerem que as mudanças ocorridas durante o período seco aumentam a susceptibilidade do úbere às novas infecções (SMITH; TODHUNTER.; SCHONBERGER, 1985; SORDILLO; NICKERSON, 1988).

A susceptibilidade da glândula à infecção é maior no início e no final do período seco. Entre os fatores que interferem no aumento da susceptibilidade destaca-se o aumento da população bacteriana na extremidade distal do teto, sendo que os procedimentos de limpeza e anti-sepsia não são mais realizados. As modificações histológicas do canal do teto também contribuem para o aumento da susceptibilidade (NICKERSON, 1989). Entre os mecanismos de resistência da glândula durante o processo de involução destacam-se o aumento na concentração de células fagocíticas, de linfócitos, de imunoglobulinas e de lactoferrina, porém, estes eventos podem ocorrer lentamente deixando a glândula exposta à infecção. A fagocitose pelos neutrófilos parece ser inibida nas secreções da glândula em involução e os linfócitos apresentam-se, neste período, menos sensíveis aos estímulos antigênicos. Além disso, no pré-parto, a concentração de células somáticas e de lactoferrina diminuem acentuadamente. Neste período, a glândula torna-se edemaciada e aumenta o volume de secreção. Alguns trabalhos demonstram a capacidade de vários patógenos causadores de mastite de sobreviver e crescer *in vitro* em secreções coletadas nas diferentes épocas do período seco (EBERHART, 1986; NICKERSON, 1989).

As infecções estabelecidas durante o período seco são as principais causas de mastites clínicas nas primeiras semanas da lactação subsequente (EBERHART, 1992; PANKEY; DRECHSLER, 1993; SORDILLO; NICKERSON, 1988).

## **2.2 Resposta imune**

A glândula mamária é um órgão complexo que propicia à descendência do animal a alimentação e a resistência às doenças. Com a seleção genética e os avanços tecnológicos, a produção de leite supera a necessidade do recém-nascido, sendo o excedente a base da indústria leiteira. Os fatores associados à produção intensiva podem afetar profundamente a imunidade da glândula mamária e a habilidade do hospedeiro de resistir à mastite (SORDILLO; SHAFER-WEAVER; DeROSA, 1997).

Os mecanismos de defesa podem ser separados em duas categorias distintas: imunidade inata e imunidade adaptativa. A imunidade inata, também conhecida como imunidade inespecífica, é a defesa predominante nos primeiros estágios da infecção. Esta resposta está presente ou é ativada rapidamente no local da infecção por numerosos estímulos, entretanto, eles não aumentam por exposição repetida à mesma injúria. A resposta inata é mediada pela barreira física do canal do teto, por macrófagos, por neutrófilos e por fatores solúveis. Inversamente, a resposta imune adaptativa ou específica, reconhece determinado patógeno facilitando a sua eliminação seletiva. O reconhecimento de fatores patogênicos é mediado por anticorpos, por macrófagos e por linfócitos. Devido à “memória” de certos linfócitos, a resposta imune específica pode ser ampliada por exposições repetidas aos patógenos (SORDILLO; SHAFER-WEAVER; DeROSA, 1997).

A mastite ocorre quando o agente patogênico penetra na glândula mamária pelo canal do teto. Por esta razão, este é considerado a primeira linha de defesa contra invasores. O esfíncter do teto contém músculos que ficam contraídos entre ordenhas impedindo a penetração de agentes. O canal do teto é revestido com queratina, sendo a mesma crucial para a manutenção da função de barreira. A remoção da queratina aumenta a susceptibilidade à invasão e à colonização bacteriana. Na camada de queratina, têm sido identificados agentes antimicrobianos. Os ácidos graxos esterificados e os não esterificados presentes na queratina como o ác. mirístico, o ác. palmitoleico e o ác. linoleico são bacteriostáticos. Adicionalmente, as proteínas catiônicas presentes no canal do teto ligam-se eletrostaticamente aos patógenos, alterando a estrutura da

parede celular, aumentando a susceptibilidade destes à pressão osmótica, levando-os a lise e morte (SORDILLO; SHAFER-WEAVER; DeROSA, 1997).

A atividade dos leucócitos existentes ou recentemente recrutados nos estágios iniciais da patogênese, exerce um papel importante no estabelecimento de novas infecções. A contagem de células somáticas no leite consiste em diferentes tipos celulares, incluindo neutrófilos, macrófagos, linfócitos e uma pequena porcentagem de células epiteliais. Na glândula mamária em lactação e saudável, a contagem total de células somáticas está em torno de  $5 \times 10^4$  a  $10 \times 10^4$ /ml de leite. Durante uma nova infecção, o total pode aumentar para  $> 10^6$ /ml de leite em poucas horas (THIERS, 1999).

Vários estudos têm demonstrado que a severidade e a duração da mastite está estreitamente ligada à prontidão da resposta migratória dos leucócitos e à atividade bactericida das células no local da infecção. Algumas bactérias produzem metabólitos, toxinas ou componentes da parede celular para colonizarem e se multiplicarem na glândula mamária. Estes fatores bacterianos servem indiretamente como quimiotáteis para os leucócitos. Se as células migram rapidamente da corrente sanguínea para a glândula mamária, eliminando o estímulo inflamatório decorrente da invasão bacteriana, o recrutamento de leucócitos cessa e a contagem de células somáticas retorna às concentrações normais. Caso as bactérias sobrevivam a esta resposta imediata, continua a inflamação e a migração celular em direção ao lúmen alveolar (CAPUCO; PAAPE; NICKERSON, 1986). A prolongada diapedese dos leucócitos causa danos ao parênquima mamário, diminuindo a produção leiteira (SORDILLO; NICKERSON, 1988).

Os neutrófilos são as células predominantes nos tecidos mamários e nas secreções mamárias nos estágios inflamatórios iniciais e podem constituir  $>90\%$  do total dos leucócitos da glândula mamária (SORDILLO; NICKERSON; AKERS, 1989; THIERS, 1999). Estas células migram para a glândula mamária em resposta aos vários mediadores inflamatórios como citocinas, complemento e leucotrienos. Uma vez no sítio da infecção, fagocitam e destroem as bactérias. Os neutrófilos exercem seus efeitos bactericidas através dos mecanismos de destruição dependentes de oxigênio, como a explosão respiratória, gerando a partir do ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio, o radical hidroxil e o oxigênio singlete; e o sistema peróxido de hidrogênio-mieloperoxidase halogenato, formando oxidantes tóxicos hipoalóides (PEAKMAN; VERGANI, 1999; TIZARD, 2002).

Durante a fagocitose, as bactérias podem ser expostas também aos diversos reativos independentes de oxigênio, como peroxidase, lisozima, hidrolases e lactoferrina. Em adição, os neutrófilos possuem pequenos peptídeos antibacterianos, capazes de destruir um grande número de agentes causadores de mastite (PEAKMAN; VERGANI, 1999; SORDILLO; NICKERSON; AKERS, 1989).

Os macrófagos são as células predominantes no leite e nos tecidos mamários saudáveis de vacas leiteiras. Estas células fagocitam bactérias, células debilitadas e componentes lácteos acumulados. A taxa de fagocitose dos macrófagos pode melhorar substancialmente na presença de anticorpos específicos que opsonizam patógenos. Devido à ingestão indiscriminada de gorduras, caseína e outros componentes do leite, os neutrófilos e macrófagos da glândula mamária são menos efetivos na fagocitose comparados aos leucócitos sanguíneos (SORDILLO; NICKERSON, 1988).

### **2.3 Destruição de patógenos pelo mecanismo dependente de oxigênio**

Inúmeros componentes microbianos promovem a quimiotaxia dos fagócitos para o local da infecção, como por exemplo, endotoxinas que ativam a via alternativa do complemento liberando C5a e C3a e formil peptídeos, além de moléculas derivadas da lesão tecidual como fibrinopeptídeo B, quimiocinas e leucotrieno B<sub>4</sub> (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1999). O passo seguinte para a fagocitose é a adesão do microrganismo à célula fagocitária, sendo que esta não ocorre espontaneamente, pois ambos possuem cargas negativas. A carga negativa da bactéria é neutralizada através da opsonização, que consiste na ligação do componente C3b do complemento e do anticorpo (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1999; TIZARD, 2002).

Alguns microrganismos desenvolveram maneiras de sobreviver no ambiente intracelular, aderindo-se a estruturas superficiais, evitando muitas vezes a ativação das vias microbicidas (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1999).

Após a internalização do patógeno, são ativados os mecanismos de destruição como: o mecanismo dependente de oxigênio, reativos intermediários do nitrogênio, proteínas catiônicas semelhantes às do antibiótico e outros.

Os neutrófilos, estimulados pela adesão dos patógenos opsonizados, aumentam o consumo de oxigênio, cerca de 10 a 20 vezes (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). No mecanismo dependente de oxigênio, desencadeiam-se uma série de reações enzimáticas, iniciada pela ativação da NADPH oxidase, formando ânion superóxido a partir do oxigênio ( $\text{NADPH} + 2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{NADPH oxidase}} \text{NADP}^+ + \text{H}^+ + 2\text{O}_2^-$ ). Em seguida ocorre a geração de peróxido de hidrogênio, reação catalisada pela superóxido dismutase ( $\text{O}_2^- + \text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \xrightarrow{\text{Superóxido dismutase}} \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ ) ou pela dismutação não enzimática. O sistema microbicida do peróxido de hidrogênio-mieloperoxidase halogenato ocorre através da seguinte reação:  $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{Cl}^- + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{mieloperoxidase}} \text{H}_2\text{O} + \text{Cl}_2 + \text{OH}^-$ , sendo estes produtos extremamente tóxicos para os patógenos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; PEAKMAN; VERGANI, 1999).

Porém, para a proteção do organismo contra o acúmulo das espécies reativas de oxigênio, as células desenvolveram sistemas antioxidantes como: glutathione redutase;  $\alpha$  - tocoferol; superóxido dismutases; catalase e glutathione peroxidase (MICHIELS et al., 1994; MILLER; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA; MADSEN, 1993). Existem duas superóxido dismutases nas células eucarióticas, uma citosólica: Cobre, Zinco superóxido dismutase (Cu, Zn – SOD) e outra mitocondrial: manganês superóxido dismutase (Mn-SOD) (FRIDOVICH, 1997). A glutathione peroxidase reduz peróxido de hidrogênio a água através da oxidação de duas moléculas de glutathione reduzida (GSH) em sua forma oxidada (GSSG) (PAGLIA; VALENTINE, 1967). A GSH é regenerada pela glutathione redutase (CARLBERG; MANNERVIK, 1985). A catalase também converte peróxido de hidrogênio a água e oxigênio, porém, a glutathione peroxidase tem maior afinidade por peróxido de hidrogênio do que a catalase, sugerindo ser a principal via de degradação do peróxido de hidrogênio em condições normais (MICHIELS et al., 1994).

## 2.4 Vitamina E e selênio

Alguns estudos têm avaliado a influência da vitamina E durante as duas ou três semanas que precedem ou sucedem o parto, uma vez que este período é crítico pela supressão da resposta imune de certas células, aumentando conseqüentemente a susceptibilidade à mastite (HOGAN; WEISS; SMITH, 1993; WEISS, 1998).

A vitamina E parece ser especialmente importante para a saúde da glândula mamária durante o período periparto. As concentrações plasmáticas de  $\alpha$ -tocoferol começam a cair do

sétimo ao décimo dia antes do parto e permanecem baixas durante três a cinco dias após o mesmo, aumentando a partir deste período. Quando as concentrações plasmáticas de  $\alpha$ -tocoferol são mantidas durante o período periparto, por injeções de  $\alpha$ -tocoferol, a lise intracelular de patógenos pelos neutrófilos sangüíneos é ampliada (HOGAN et al.,1990).

A função metabólica do selênio está intimamente ligada à vitamina E. Ambos protegem as membranas biológicas da degeneração oxidativa. A vitamina E e a glutathione peroxidase (enzima que contém selênio) fazem parte do sistema antioxidante presente nas células, atuando em locais diferentes. A glutathione peroxidase atua no citosol e a vitamina E é parte integrante das membranas lipídicas (Mc DOWELL et al.,1996).

Smith et al. (1984) comparando com o grupo controle (não suplementado), administraram uma injeção com 0,1 mg Se/kg de peso vivo, 21 dias antes do parto, e suplementaram com uma dose diária de 0,74 g de vitamina E por vaca, durante o período seco. Estes autores observaram um decréscimo de 37% na incidência de mastite clínica em animais que receberam apenas vitamina E. A injeção de selênio provocou uma pequena redução (12 %) da mastite clínica no grupo suplementado. Não houve evidência de interação entre os dois suplementos em relação à ocorrência de mastite clínica. Quanto à duração desta, os resultados apresentaram 44% de redução para a suplementação com vitamina E, 46% para a suplementação com selênio e 62% para vitamina E + selênio comparados ao controle, indicando uma possível interação entre ambos.

Weiss et al. (1990) estudando a suplementação de selênio e de vitamina E em vacas no período periparto, concluíram que os animais alimentados com uma dieta com aproximadamente 0,3 ppm de Se e 110 UI / kg de MS (matéria seca) de vitamina E, durante o período seco, e recebendo uma injeção de 50 mg de Se e 300 UI de vitamina E, 21 dias antes da data prevista para o parto, mantiveram uma adequada atividade da glutathione peroxidase assim como adequadas concentrações plasmática e sanguínea de Se. Continuando a alimentação com dieta similar em vitamina E e Se no início da lactação, estes padrões adequados foram mantidos. Na suplementação com altas quantidades de vitamina E, durante o período seco, a queda nas concentrações plasmáticas de  $\alpha$ -tocoferol no período periparto foi reduzida, mas não eliminada. Com o progresso da lactação e com o aumento da ingestão de matéria seca, a concentração plasmática de  $\alpha$ -tocoferol não foi diferente entre animais suplementados e não suplementados. A



suplementação de curta duração com vitamina E aumentou a concentração plasmática de  $\alpha$ -tocoferol em níveis acima da concentração de animais suplementados por longos períodos, sugerindo que, após um período de suplementação insuficiente, a absorção da vitamina pode ser superior.

Hogan et al. (1990) estudaram os efeitos da suplementação de vitamina E (600 UI/dia) e de selênio (0,3 ppm na dieta) durante o período seco e os primeiros 21 dias de lactação, combinada com uma injeção de 50 mg de selenito de sódio e 680 UI de acetato de  $\alpha$ -tocoferol aos 21 dias pós-parto, para vacas leiteiras cujos neutrófilos foram desafiados *in vitro*. Estes autores observaram que a vitamina E aumentou a lise intracelular de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* por ação dos neutrófilos. O selênio aumentou somente a lise de *Staphylococcus aureus*. Não foram detectadas interações significativas entre os suplementos. A habilidade fagocitária dos neutrófilos tanto para *Staphylococcus aureus* quanto para *Escherichia coli* foi independente da suplementação. Hogan et al. (1992) também observaram maior destruição intracelular de patógenos nos neutrófilos de animais que receberam duas injeções de 3000 UI de vitamina E (10 e 5 dias antes do parto), sendo que a porcentagem de fagocitose não modificou entre os grupos. Nos animais que receberam suplementação oral de 1040 UI de vitamina E no período seco, não foram detectadas diferenças quanto à destruição de patógenos e à porcentagem de fagocitose quando comparados aos animais não suplementados.

Ndiweni et al.(1991) investigaram nove rebanhos com incidência de mastite superior a 30% e nove rebanhos com incidência de mastite inferior a 30% durante doze meses e não encontraram diferenças entre os rebanhos na contagem de células somáticas (CCS), na atividade da glutathiona peroxidase e na concentração plasmática de vitamina E. Os autores não encontraram correlação entre CCS e concentração plasmática de vitamina E. Erskine et al. (1987) também não encontraram diferenças nas concentrações séricas de vitamina E entre dois grupos compostos por 16 rebanhos leiteiros, sendo um com CCS aproximada de  $150 \times 10^3$ /ml e outro com CCS de  $700 \times 10^3$ /ml. Entretanto, Barnouin e Chassagne (1998) investigando 139 rebanhos franceses, detectaram que rebanhos com alta incidência de mastite clínica nos primeiros 60 dias de lactação apresentaram baixas porcentagens de vacas suplementadas com vitaminas ADE no período seco e altas porcentagens de partos no inverno.

Batra, Hidiroglou e Smith (1992) avaliaram a incidência de mastite em 224 vacas submetidas ou não à suplementação de vitamina E durante o período seco e os três primeiros meses de lactação. O grupo suplementado recebeu 1000 UI no pré-parto e 500 UI no período em lactação. As concentrações sanguíneas de vitamina E foram maiores para o grupo suplementado. Não houve diferença significativa entre os grupos em: porcentagem de quartos CMT positivo, número de casos de mastite clínica e porcentagem de vacas infectadas com mastite clínica. Quanto aos patógenos, *Staphylococcus aureus* foi isolado em 31,6 % e 39,1 % das amostras dos grupos controle e suplementado respectivamente. Este foi o microrganismo isolado com maior frequência, seguido por coliformes, isolados em 26,3 % no grupo controle e 18,8 % no suplementado. Outros *Streptococcus*, que não *Streptococcus agalactiae* foram isolados somente nos animais suplementados em 4,4 % das amostras. Dos quartos CMT positivo, não foram isolados os microrganismos em 38,1 % do controle e 37,7 % do grupo suplementado. Amostras compostas de leite dos quartos foram colhidas nos 56<sup>o</sup>, 112<sup>o</sup>, 168<sup>o</sup>, 224<sup>o</sup> e 280<sup>o</sup> dias de lactação para contagem de células somáticas sendo que, as vacas do grupo suplementado apresentaram menor CCS somente no 112<sup>o</sup> dia comparadas ao grupo controle.

Investigando a atividade da glutatona peroxidase, as concentrações de vitamina E, de vitamina A e de  $\beta$ -caroteno no soro, a contagem de células somáticas, as infecções bacterianas no úbere e a incidência de mastite clínica, Jukola et al. (1996) concluíram que, com o aumento do selênio no soro, a incidência de todas as infecções diminuíram (-17,7 %) incluindo infecções por *Staphylococcus aureus* (- 31,7 %) e por *Corynebacterium* sp (-70,6 %). Não foram detectadas associações entre as diferentes infecções e a contagem de células somáticas com as concentrações séricas de vitamina E, de vitamina A ou de  $\beta$ -caroteno. A baixa concentração sérica de selênio não aumentou a incidência de mastite clínica. As concentrações de selênio no sangue de 200  $\mu$ g/L foram consideradas suficientes para otimizar a saúde da glândula mamária.

Ndiweni e Finch (1996) avaliaram a ação *in vitro* da vitamina E em polimorfonucleares neutrófilos bovinos e observaram que as altas concentrações desta causaram a agregação das células, mas não afetaram a viabilidade das mesmas. A migração casualizada de polimorfonucleares (PMN) expostos a baixas concentrações da vitamina foi aumentada e esta apresentou efeito estimulatório maior do que o selenito, entretanto, doses excessivas apresentaram pouco efeito. A quimiotaxia foi aumentada após a suplementação com baixas

concentrações de vitamina E. A vitamina E aumentou significativamente a fagocitose de *S. aureus* opsonizados por PMN de bovinos. Em contraste, Hogan et al. (1990) relataram que a suplementação *in vivo* de vitamina E não exerceu efeito na capacidade fagocitária *in vitro* dos mesmos. No estudo de Ndiweni e Finch (1996) foi observado que a suplementação com selenito apresentou um efeito levemente inibitório. No mesmo trabalho, verificou-se que, quando *S. aureus* foi incubado por 2 horas com estes antioxidantes, na ausência de PMN, não houve influência na viabilidade deste microrganismo, demonstrando, portanto, não haver ação antibacteriana direta. Foi também observado pelos mesmos autores que os PMN expostos à vitamina E e ao selênio produziram quantidades de superóxido levemente superiores àquelas dos PMN não tratadas, portanto, provavelmente apresentaram maior capacidade de lise de microrganismos fagocitados. Por outro lado, as concentrações muito altas apresentaram efeito inibitório na produção de superóxidos. Neste estudo foram verificados os efeitos da suplementação combinada dos dois elementos e não foi evidenciado qualquer efeito sinérgico.

Politis et al. (1995) verificaram que os neutrófilos sanguíneos de vacas recebendo uma suplementação de 3000 UI de vitamina E, durante quatro semanas antes do parto e oito semanas após o parto, combinada com uma injeção de 5000 UI de vitamina, uma semana antes do parto, produziram duas vezes mais ânion superóxido, comparados com os neutrófilos dos animais não suplementados. Entretanto, Politis et al. (1996), utilizando o mesmo protocolo, não observaram diferenças na produção de superóxido ou fatores quimiotáticos por macrófagos da glândula mamária. A suplementação de vitamina E evitou a redução das concentrações sanguíneas da mesma e a supressão periparto da quimiotaxia dos neutrófilos sanguíneos. Com relação à produção de interleucina-1 e ao complexo maior de histocompatibilidade II, somente foram detectadas diferenças nos neutrófilos isolados do sangue, sendo 15 e 35% maior, respectivamente, no grupo suplementado. Nos macrófagos isolados da glândula mamária não foram observadas diferenças entre os grupos (POLITIS et al., 1995). Dulin, Paape e Nikerson (1988) observaram também que a porcentagem de fagocitose foi 9,6% menor nos neutrófilos isolados de glândulas mamárias em lactação comparada com a de neutrófilos sanguíneos e concluíram que a ingestão de glóbulos de gordura e caseína interfere nas atividades funcionais dos neutrófilos isolados do leite.

Segundo Weiss et al. (1997), vacas que receberam uma dieta com 1000 UI/dia de vitamina E durante o período seco e 500 UI/dia durante os primeiros 30 dias de lactação,

apresentaram uma diminuição de 30% da mastite clínica nos primeiros 7 dias de lactação frente às vacas que receberam 100 UI/dia nestes mesmos períodos. A redução da mastite clínica foi de 88% no mesmo período em vacas que receberam 1000 UI/dia durante o período seco até 15 dias antes do parto, 4000 UI/dia nas duas semanas que antecederam o parto e 2000 UI/dia nos 30 dias após o parto. A prevalência de mastite clínica causada por *Staphylococcus* sp foi de 6,8% (controle), 0 e 1,3% para doses crescentes da vitamina. A porcentagem de quartos com novas infecções no parto foi 11,8% menor para as vacas que receberam altas doses de vitamina E. Segundo estes mesmos autores, as concentrações plasmáticas mínimas de 3µg/ml  $\alpha$ -tocoferol são necessárias no periparto quando o selênio é marginal e, para tanto, é necessário suplementar com vitamina E acima de 1000 UI/dia quando volumosos conservados são componentes da dieta.

No estudo de Valle et al.(2000b), a ocorrência de mastite clínica na primeira semana de lactação reduziu em 70% nos grupos suplementados com doses diárias de 1000 UI e 3000 UI no pré e no pós-parto comparados ao grupo não suplementado.

Com relação à incidência de mastite clínica durante 30 dias pós-parto, Erskine et al. (1997) não observaram efeito quando uma única injeção de 3000 UI de vitamina E foi administrada por via sistêmica, aproximadamente duas semanas antes do parto. Leblanc et al. (2002) estudando o efeito da vitamina E (3000 UI subcutânea, uma semana antes do parto) na saúde de vacas leiteiras no período de transição não encontraram diferenças na incidência de retenção de placenta, metrite, mastite, cetose, torção de abomaso e laminite entre os grupos experimentais.

Suplementando diariamente por via oral as vacas leiteiras no pré-parto e durante toda a lactação, Zanetti et al. (1998) observaram que a incidência de mastite subclínica diagnosticada através do exame CMT foi de 56,25% para o grupo não suplementado, 37,5% para o grupo suplementado com 5mg de selênio, 56,25% para o grupo suplementado com 500 UI de vitamina E e 62,5% para o grupo que recebeu 5mg de selênio + 500 UI de vitamina E. Neste estudo, detectou-se uma redução significativa na incidência de mastite subclínica apenas para os animais que receberam 5mg de selênio, não sendo verificadas diferenças com a suplementação de vitamina E, provavelmente pelo fato de que os animais, por terem tido acesso a forragens verdes, não apresentavam deficiência deste nutriente. Costa et al. (1997) não detectaram diferenças na ocorrência de mastite clínica ou subclínica e de infecções intramamárias durante a lactação em

vacas que receberam uma aplicação intramuscular de 0,1mg/kg de selenito de sódio aproximadamente 20 dias antes do parto e atribuíram estes resultados à inexistência de deficiência do mineral nos animais experimentais.

Valle et al. (2000a) observaram uma redução na ocorrência de mastite clínica durante a lactação nos grupos suplementados diariamente com 1000 UI e 3000 UI de vitamina E, no pré e no pós-parto, quando comparados ao grupo controle. Não foram encontradas diferenças estatísticas quanto à ocorrência de mastite subclínica entre os três grupos. A ocorrência de infecções intramamárias foi maior no grupo suplementado com 3000 UI do que nos demais, sendo que no grupo suplementado com 1000 UI foi maior do que no grupo não suplementado.

Schukken et al. (1999) avaliaram os fatores que poderiam determinar a permanência da infecção intramamária em glândulas desafiadas com *Staphylococcus aureus*, entre eles, os níveis sanguíneos de vitamina E e não encontraram diferenças significativas destes com o estabelecimento da infecção. No estudo de Paes et al. (2001), avaliando-se a resposta ao desafio com *Staphylococcus aureus* em cabras que receberam 2000 UI de vitamina E intramuscular no dia do parto e sete dias após o mesmo, observou-se que a suplementação resultou em menor CCS e menor número de microrganismos recuperados no leite. Concordando com estes resultados, Baldi et al. (2000) observaram menor CCS no leite de vacas recebendo 2000 UI de vitamina E por 14 dias antes do parto e 7 dias após o parto comparando com animais recebendo 1000 UI.

Paschoal, Zanetti e Cunha (2003) verificaram uma redução de 72% na incidência de mastite clínica durante as oito primeiras semanas de lactação, nos animais do grupo suplementado com vitamina E (1000UI) e selênio (5mg) durante 30 dias antes do parto previsto, de 51,3% nos animais suplementados com vitamina E, e de 23% com a suplementação de selênio quando comparados aos animais do grupo controle. Com relação à redução da contagem de células somáticas, somente o grupo suplementado com selênio apresentou diferença significativa neste mesmo período (PASCHOAL, 2002).

Katamoto et al. (1998) investigaram a influência do tratamento por via intramuscular com vitamina E (2,72 UI/kg) e selênio (0,1mg/kg), em duas aplicações com intervalo de oito dias, na atividade dos neutrófilos, através da redução do *nitroblue tetrazolium* (NBT), em cabras submetidas ao estresse térmico. Os autores concluíram que o estresse deprime a atividade dos neutrófilos, diminuindo a redução do NBT. Quanto ao tratamento, não foram detectadas

diferenças estatísticas entre os grupos, apesar da observação de maior redução do NBT nos neutrófilos estimulados do grupo suplementado. Já Lopes et al. (2003), ao injetar cabras com duas doses de 2000 UI de vitamina E, no dia do parto e sete dias após o mesmo, e induzindo mastite por *Staphylococcus aureus*, observaram que os neutrófilos estimulados aumentaram a capacidade de reduzir o NBT, sendo esta capacidade menor no grupo suplementado. Neste trabalho foi observado que o processo inflamatório foi mais intenso no grupo não suplementado, onde a CCS foi maior.

Quanto aos efeitos no processo inflamatório, Rocksén et al. (2003), investigando a migração dos neutrófilos no tecido pulmonar de ratos, aerolizado com endotoxina, verificaram que a suplementação com vitamina E reduziu o número de neutrófilos nos alvéolos pulmonares e o edema pulmonar. Schock et al. (2004) observaram que neutrófilos de ratos deficientes em vitamina E apresentaram maior atividade da NADPH oxidase, aumentando a produção de superóxidos. Segundo Azzi, Ricciarelli e Zingg (2002), o  $\alpha$ -tocoferol inibe a atividade da proteína quinase C em várias células, inibindo conseqüentemente a agregação de plaquetas, a produção de óxido nítrico nas células endoteliais e a produção de superóxido pelos neutrófilos e macrófagos. Wu, Hayek e Meydani (2001) demonstraram que a vitamina E reduziu a produção de PGE<sub>2</sub> devido ao decréscimo da atividade da cicloxigenase. Kahl & Elsasser (2004) verificaram que a vitamina E atenuou os efeitos da injeção de endotoxina em novilhas, diminuindo a atividade plasmática da xantina oxidase e a conseqüente produção de ânion superóxido e ácido úrico.

Tauler et al. (2002) avaliaram a suplementação de agentes antioxidantes (vitamina E, vitamina C e  $\beta$ -caroteno) na dieta de atletas quanto à atividade enzimática nos neutrófilos e observaram um aumento da razão da glutathiona reduzida/glutathiona oxidada (GSH/GSSG) e diferenças na atividade da catalase, superóxido dismutase, glutathiona peroxidase e glutathiona redutase sendo 45%, 35%, 47% e 51% respectivamente maior no grupo suplementado. Katamoto et al. (1998) também observaram uma tendência de maior atividade da glutathiona peroxidase com a suplementação de vitamina E em cabras sob estresse térmico, porém sem significância estatística.

Hogan et al. (1993) testou o efeito da vitamina E como adjuvante em vacinas contra *Escherichia coli*. A vitamina E somente aumentou a concentração de IgM no soro mas não

exerceu efeito no título de IgM no leite. A mistura de vitamina E + adjuvante incompleto de Freud resultou em aumentos nos títulos de IgM no leite e no soro comparados com os títulos do adjuvante de Freud utilizado sozinho. A mistura da vitamina E + adjuvante de Freud propiciou uma maior persistência nos títulos de IgM e apresentou um efeito sinérgico ao reduzir a severidade dos sinais clínicos sistêmicos da doença.

Comparando as concentrações de  $\alpha$ -tocoferol no leite, no plasma e nos neutrófilos do leite e do plasma de vacas com mastite clínica aguda com vacas sem mastite, Barret et al. (1997) observaram que, a inflamação intramamária aguda causada por infusão de lipopolissacarídeo ou *E. coli* resultou em aumento da concentração de  $\alpha$ -tocoferol no leite dos quartos desafiados, mas não afetou a concentração plasmática. As concentrações de  $\alpha$ -tocoferol nos neutrófilos do leite e do sangue não diferiram entre os tratamentos. Aproximadamente 25% e < 10% do  $\alpha$ -tocoferol do leite de glândulas com mastite clínica e glândulas sadias, respectivamente, foram associados com neutrófilos. Em estudo similar, Hogan et al. (1996) observaram que as concentrações de  $\alpha$ -tocoferol no leite foram 60% maiores 24 e 48 horas após o desafio com *E. coli* e não detectaram alterações nas concentrações plasmáticas. As concentrações de  $\alpha$ -tocoferol no leite foram correlacionadas positivamente com as contagens de células somáticas em todas as amostragens. Durante a fase aguda da mastite, a concentração de gordura caiu, sendo que esta é a fonte primária de  $\alpha$ -tocoferol, enquanto a concentração de  $\alpha$ -tocoferol aumentou, indicando que este estava associado aos neutrófilos.

## **2.5 Requerimento de vitamina E e selênio**

A literatura sugere que o requerimento de selênio para a maioria das espécies de produção está entre 0,05 e 0,3 mg / kg de matéria seca ingerida. Esta variação ocorre tanto como resultado de diferentes fatores que podem influenciar o requerimento de um animal, como pela diversidade das opiniões quanto ao critério usado para estabelecer as necessidades. Os fatores como as fontes de selênio, a biodisponibilidade, a suplementação de vitamina E, as concentrações de antagonistas (enxofre, ferro e cobre) na dieta e os métodos usados para a análise do mineral no animal podem influenciar a determinação do requerimento de selênio (GERLOFF, 1992; McDOWELL et al., 1996). Várias informações obtidas na literatura sugerem, que para atender a

demanda em vacas leiteiras, a suplementação de selênio deve ser em torno de 6mg/animal/dia (GERLOFF, 1992).

Os requerimentos de vitamina E e de selênio são dependentes das concentrações dos mesmos na dieta. A vitamina E reduz o requerimento de selênio mantendo o mineral na forma ativa, por prevenir a destruição das membranas lipídicas e inibir a produção de peróxidos, reduzindo assim a quantidade de glutathione peroxidase necessária à destruição dos mesmos. O selênio é conhecido por poupar a vitamina E preservando a integridade do pâncreas, o qual é responsável pela digestão normal das gorduras, melhorando a absorção da mesma; reduzindo a quantidade de vitamina E requerida para manter a integridade das membranas lipídicas via glutathione peroxidase (McDOWELL, 1989).

Os fatores de importância primária que podem ter influência na suplementação de vitamina E e de selênio incluem: (1) selênio e ou vitamina E deficientes nos volumosos e concentrados; (2) pastagens excessivamente secas; (3) alimentação em confinamento onde estes nutrientes não são fornecidos ou somente forragens de baixa qualidade são oferecidas; (4) dietas com predominância de ingredientes que contêm baixos níveis de  $\alpha$ -tocoferol e com baixa atividade; (5) dietas com ingredientes que aumentam os requerimentos de selênio (metais pesados, aflatoxinas) e vitamina E (gorduras insaturadas, água rica em nitratos); (6) métodos de colheita, de secagem, de estocagem e de conservação dos alimentos que resultam em destruição dos nutrientes; (7) aceleradas taxas de ganho, de produção e de eficiência alimentar com aumento da demanda metabólica; (8) a produção intensificada que pode aumentar indiretamente a necessidade destes nutrientes pelo elevado nível de estresse, o qual aumenta a susceptibilidade às doenças (Mc DOWELL, 1989).

Baseando-se em dados disponíveis, o programa de suplementação de vitamina E sugere, principalmente, a utilização da administração oral e parenteral. Para a proteção continuada contra uma possível deficiência de todo o rebanho é essencial uma adequada suplementação da vitamina na dieta.

Weiss (1998), revisando trabalhos publicados sobre as necessidades de vitamina E, concluiu que o requerimento é desconhecido, porém os dados sugerem que a suplementação de



1000UI /dia antes do parto e 500 UI/dia após o parto pode ser justificada para promover a saúde dos animais.

Visando a redução da mastite clínica, Hogan, Weiss e Smith (1993) recomendaram a suplementação com 1000UI/dia de vitamina E durante a lactação. McDowel et al.(1996) também sugeriram uma suplementação similar, entre 500 a 1200UI para vacas em lactação e 1000UI para vacas secas.

Estas pesquisas baseiam-se no estresse oxidativo a que são submetidas as vacas leiteiras, considerando a alimentação com produtos conservados e ricos em gordura; o período de transição, onde a ingestão de matéria seca é minimizada; a produção de leite que mobiliza considerável quantidade de gordura; o balanço energético negativo que ocorre no pós-parto, onde o catabolismo aumenta, resultando na produção espécies reativas de oxigênio (ALLISON; LAVEN, 2000); além das concentrações sanguíneas reduzidas de substâncias antioxidantes no período periparto, como a vitamina E e A (MEGLIA et al, 2001).

A edição do NRC 1989 (National Research Council) recomenda 150 UI/dia para vacas secas e 300 UI/dia para vacas em lactação. Na edição atual (NRC, 2001) a recomendação é de 1000UI/dia no pré-parto e 500 UI/ dia na lactação, devido às evidências encontradas nos trabalhos publicados nos últimos anos, porém, há carência de estudos para definir a dosagem correta (GRUMMER, 2001).

## **2.6 Fontes alimentares de vitamina E**

Oito formas de vitamina E são encontradas na natureza: quatro tocoferóis ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ) e quatro tocotrienóis ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ). As diferenças entre  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  são devidas à localização dos grupos metil no anel. A diferença entre tocoferol e tocotrienol é devida à insaturação no final de um lado da cadeia (Mc DOWELL, 1989).

A vitamina E é abundante na maioria dos grãos de cereais, particularmente no germe e nos subprodutos contendo germe. Existe uma larga variação no conteúdo de vitamina de um alimento em particular, com muitos alimentos variando o valor de seu conteúdo de três a dez vezes. Um exemplo é o leite de vaca que apresenta cinco variações estacionais em seu conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol. As forragens verdes, incluindo os fenos de boa qualidade, são excelentes fontes,

sendo a alfafa especialmente rica. A concentração de tocoferol por unidade de matéria seca em forragens frescas é entre cinco a dez vezes maior do que na maioria dos cereais e seus subprodutos (Mc DOWELL et al., 1996).

O conteúdo de vitamina E na forragem é afetado pelo estágio de maturação no momento da colheita e pelo tempo do corte até a desidratação. As perdas na estocagem podem atingir 50% em um mês. Têm sido observadas perdas de 54-73% na alfafa estocada a 33°C durante 12 semanas e de 5-33% na desidratação comercial da mesma. As dietas de rebanhos confinados são sempre dependentes de forragens ensiladas como fonte de volumoso, sendo que estas contêm somente de um quinto a um sexto da quantidade de vitamina E presente nas forragens frescas (Mc DOWELL et al., 1996). O aumento da participação de volumosos estocados na dieta dos animais aumenta a probabilidade de ocorrer deficiência de vitamina E (HOGAN; WEISS; SMITH, 1993; Mc DOWELL et al., 1996; SMITH; HOGAN; WEISS, 1997).

Como a estabilidade de todos os tocoferóis que ocorrem na natureza é frágil, há substanciais perdas da atividade da vitamina E em alimentos processados e estocados. As fontes de vitamina E nos alimentos são deterioradas sob condições que promovem a oxidação dos mesmos (calor, oxigênio, umidade, gorduras oxidadas e minerais). Para concentrados, a oxidação aumenta após a moagem, a mistura com minerais, a adição de gorduras e a peletização. Quando os alimentos são peletizados, a destruição de vitaminas A e E pode ocorrer caso a dieta não contenha antioxidantes suficientes para prevenir suas aceleradas oxidações sob condições de umidade e de altas temperaturas (Mc DOWELL et al., 1996).

## **2.7 Absorção e excreção da vitamina E**

A absorção da vitamina E está ligada à digestão de gorduras e é facilitada pela bile e pela lipase pancreática. Sua absorção depende da solubilização micelar, assim, falhas na função pancreática ou na produção biliar resultam em má absorção (NRC, 1987). A maior parte da vitamina E é absorvida na forma de álcool. Os ésteres são hidrolisados nas paredes intestinais e o álcool livre passa pelas paredes intestinais para a corrente linfática e daí para a circulação geral, permitindo assim sua atuação como antioxidante (Mc DOWELL, 1989).

Estudos indicam que a vitamina E é bem menos absorvida ou retida no organismo quando comparada à vitamina A. A vitamina E, recuperada nas fezes, segundo estudo de dosagens, variou entre 65% a 80% em humanos, ratos e galinhas e 25% em frangos. Não é conhecida a quantidade da vitamina fecal que não é absorvida e que é excreção biliar. A bile tem concentração de tocoferol similar à do sangue (Mc DOWELL, 1989).

A vitamina E é aderida principalmente às lipoproteínas. Os tocoferóis passam através das membranas placentárias em quantidades insuficientes, mas estão concentrados no colostro (Mc DOWELL et al.,1996).

A vitamina E é estocada em todos os tecidos corporais, principalmente no fígado, porém, este contém somente uma fração da reserva corporal total se comparado à reserva hepática da vitamina A que chega a 95%. Pequenas quantidades de vitamina E podem persistir no corpo por longos períodos, sendo que as reservas são exauridas rapidamente por ácidos graxos poliinsaturados nos tecidos. A taxa de excreção é proporcional à ingestão destes. A maior rota de excreção da vitamina absorvida é a bile, onde aparece na forma livre (Mc DOWELL, 1989).

## **2.8 Hipervitaminose**

A vitamina E é conhecida por ser a menos tóxica das vitaminas. Entretanto, vários estudos têm demonstrado efeitos adversos com a utilização de doses extremas em ratos, frangos e humanos. Estudos com frangos indicaram que níveis de 1000 UI / kg de dieta por períodos prolongados não causaram efeitos deletérios. Em ratos, o nível máximo tolerável é, provavelmente, cerca de 2500 UI / kg. Na ausência de dados experimentais para hipervitaminose em outras espécies, o máximo tolerável pode ser referido somente por extrapolação dos estudos feitos com ratos e frangos. Um presumível nível máximo de segurança de cerca de 75 UI / kg de peso corporal por dia é sugerido como guia para as formulações de dieta. Como os requerimentos para a maioria das espécies variam de 5 a 50 UI / kg de dieta (ou 2 a 4 UI / kg de peso vivo), as ingestões 20 vezes maiores do que o nível nutricional adequado podem ser bem toleradas (NRC, 1987).

Excessos moderados de vitamina E são de pequena importância, mas a alta dosagem pode induzir perturbações gastrintestinais, interferência com a absorção de vitaminas A e K e predisposição às enterites. A deficiência de vitamina A causa um comprometimento da imunidade, aumentando a susceptibilidade às infecções, podendo inclusive aumentar a mortalidade (COTRAN et al., 1994).

## **2.9 Determinação de concentrações de selênio e vitamina E**

A confirmação de baixa concentração de selênio e de vitamina E nos animais é obtida quando as doenças específicas de deficiência são associadas à falta destes nutrientes. Do mesmo modo, lesões aparentes e exames histopatológicos evidenciam deficiências de selênio e ou de vitamina E.

Lesões musculares resultantes de deficiência de vitamina E e ou de selênio causam perdas de conteúdo intercelular para o sangue. Assim, níveis elevados de enzimas específicas no sangue servem como diagnóstico auxiliar na detecção de degeneração tecidual. As concentrações séricas de transaminase oxaloacético-glutâmica, de aspartato aminotransferase, de desidrogenase láctica, de creatina fosfoquinase e de desidrogenase málica indicam lesões musculares. Os testes enzimáticos são muito sensíveis e as elevações de enzimas ativas no soro são detectadas antes de aparecerem alterações patológicas ou sinais clínicos (Mc DOWELL et al., 1996).

A concentração tecidual baixa da enzima selênio dependente, glutathione peroxidase, é relativamente, um bom indicador deste elemento. A glutathione peroxidase no plasma e no fígado diminui ou aumenta rapidamente nos estados de depleção e repleção de selênio, sendo assim, as concentrações desta enzima servem como um indicador sensível de selênio na dieta. As dosagens de glutathione peroxidase têm sido sugeridas para a avaliação de selênio em bovinos, porém, como a enzima apresenta-se em pequenas quantidades e com baixa estabilidade, o uso desta técnica é limitado (VAN SAUN, 1990).

O estado nutricional com respeito à vitamina E é comumente estimado na concentração plasmática. Existe alta correlação entre os níveis plasmáticos e os hepáticos de  $\alpha$ -tocoferol e também entre as quantidades deste na dieta e as concentrações plasmáticas. As concentrações no

plasma de 0,5-1  $\mu\text{g/ml}$  são consideradas baixas para a maioria das espécies, sendo que menor que 0,5  $\mu\text{g/ml}$  é considerado deficiência. O uso de concentrações plasmáticas como indicador do estado de vitamina E de um animal deve ser interpretado criticamente, segundo a especificidade de cada caso. A análise deste parâmetro é difundida pela facilidade de obtenção de amostras e devido ao fato de que a vitamina E não é estocada em quantidades apreciáveis no organismo. Entretanto, a concentração de  $\alpha$ -tocoferol no plasma reflete, principalmente, a ingestão recente deste nutriente, sendo assim, tem limitado valor no diagnóstico de deficiência (Mc DOWELL et al., 1996). Níveis graduados de vitamina E foram administrados a ovinos (NJERU et al., 1994) e bovinos (NJERU et al., 1995) com o intuito de analisar os métodos de avaliação de vitamina E no animal. As concentrações séricas de  $\alpha$ -tocoferol mostraram ser um bom indicativo do “status” de vitamina E no organismo.

Existe um grande debate em torno de qual deva ser o teste ideal para predizer o “status” de selênio ou a presença potencial de deficiência. Se o animal é mantido sob constante ingestão do elemento por período de meses, todos os testes apresentam acurácia igual. Entretanto, se o animal recebe diferentes níveis de suplementação, a interpretação pode diferir dependendo do método utilizado.

O selênio plasmático ou sérico é considerado um bom indicador do elemento no organismo, sendo considerado crítico para bovinos quando as concentrações são menores do que 0,03-0,04  $\mu\text{g/ml}$  (Mc DOWELL et al., 1996). Valores abaixo de 0,04  $\mu\text{g/ml}$  são considerados inadequados e acima de 0,07  $\mu\text{g/ml}$  adequados (GERLOFF, 1992).

Miller et al. (1995) examinaram amostras sorológicas de vacas distribuídas em 50 rebanhos durante o período de um ano e encontraram valores médios de 2,55  $\mu\text{g/ml}$  para vitamina E e 78,12  $\text{ng/ml}$  para selênio. As concentrações de selênio e de vitamina E foram significativamente maiores no verão comparadas às concentrações no outono e no inverno.

Com dietas variando a concentração de selênio entre 0,1 a 0,12 ppm por kg de matéria seca, Batra, Hidiroglou e Smith (1992) encontraram concentrações plasmáticas do mineral de 35 e 35,6  $\text{ng/ml}$  em vacas secas, 26,8 e 27  $\text{ng/ml}$  em vacas em lactação, para animais suplementados ou não suplementados com vitamina E respectivamente.

Weiss et al. (1997), alimentando vacas com dietas contendo 0,1 ppm de selênio e diferentes níveis de vitamina E, encontraram concentrações do selênio de 0,1 $\mu$ g/ml no sangue e 0,05 $\mu$ g/ml no plasma.

Estudando os efeitos da vitamina E e do selênio em vacas leiteiras, Zanetti et al. (1998) encontraram um aumento significativo no dia do parto para os níveis séricos de selênio de dois grupos de vacas suplementadas com 5 mg do mineral, durante 30 dias antes do parto, comparadas aos grupos não suplementados, sendo 0,057 e 0,068  $\mu$ g/ml e 0,029 e 0,028  $\mu$ g/ml respectivamente. Paschoal, Zanetti e Cunha (2003) encontraram níveis séricos superiores, antes da suplementação, sendo 0,051, 0,049 e 0,051  $\mu$ g/ml para os grupos controle, selênio e selênio + vitamina E e após a suplementação, no momento do parto, 0,071, 0,081 e 0,083  $\mu$ g/ml respectivamente. A dieta basal, neste experimento continha 0,52 mg/ kg de matéria seca de selênio, justificando assim a maior concentração sérica do elemento.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a influência da suplementação de vitamina E, por via oral, nos períodos pré e pós-parto, a novilhas leiteiras alimentadas basicamente com silagem de milho e concentrados, nas atividades funcionais dos neutrófilos recuperados do leite na primeira semana após o parto.

#### 3.2 Objetivos específicos

Avaliar se a vitamina E é capaz de aumentar a resistência das vacas após o parto, investigando a influência da suplementação nas atividades dos neutrófilos, como:

- capacidade fagocitária de *Sacharomyces cerevisiae*;
- capacidade fagocitária de microrganismos causadores de mastite: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis*, *Escherichia coli* e *Prototheca zopfii*;
- destruição intracelular dos patógenos acima descritos;
- produção de superóxidos;
- produção de peróxido de hidrogênio;
- atividade das seguintes enzimas: glutationa peroxidase, glutationa redutase, catalase, superóxido dismutase e mieloperoxidase.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Formação dos grupos experimentais e alimentação dos animais

Para a execução do experimento, 17 novilhas da raça Holandesa foram divididas aleatoriamente em dois grupos, sendo um com 9 animais não suplementados (controle) e outro com 8 animais suplementados com 1000 UI de vitamina E durante 30 dias antes do parto previsto e 10 dias após o parto.

A vitamina E<sup>1</sup> foi fornecida em pacotes de papel (15cm x 8cm), administrados via oral aos animais suplementados (VALLE, 2000).

A dieta fornecida aos animais compôs-se basicamente por silagem de milho, concentrado e mistura mineral, sendo balanceada de acordo com as recomendações do Nacional Research Council – NRC 2001, para o pré-parto e para a lactação (tabelas 1 e 2). Os animais foram mantidos em regime de confinamento com livre acesso a um piquete para descanso.

A composição da mistura mineral comercial<sup>2</sup> utilizada na formulação da dieta está apresentada na Tabela 3.

**Tabela 1** – Composição dos alimentos utilizados na formulação da dieta fornecida aos animais experimentais, na base da matéria seca. Pirassununga, 2005.

	MS (%)	PB (%)	FB (%)	EE (%)	MM (%)	ENN(%)	Ca (%)	P (%)	Se (ppm)
Silagem de milho	23,67	6,41	27,24	2,61	5,00	58,74	0,11	0,1	0,046
Concentrado	90,26	22,49	5,46	3,46	6,3	62,29	1,2	0,48	0,14

Análises das silagens de milho e dos concentrados foram feitas no Laboratório de Nutrição do Depto. de Zootecnia da Faculdade de Zootecnia e Eng<sup>a</sup>. de Alimentos da USP.

MS = matéria seca; PB = proteína bruta; FB = fibra bruta; EE = extrato etéreo; MM = matéria mineral; Ca = cálcio; P = fósforo; Se = selênio. Obs: valores de Ca e P foram estimados.

<sup>1</sup> M.Cassab Comércio e Indústria Ltda.

<sup>2</sup> Cooperativa Regional de Cafeicultores em Guaxupé Ltda. (Cooxupé)



**Tabela 2-** Composição estimada da dieta fornecida aos animais durante o experimento. Pirassununga, 2005.

	IMS (kg)	Composição da dieta (% MS)		PB (%)	NDT (%)	EL <sub>lac</sub> (Mcal/kg)	FB (%)	EE (%)	Ca (%)	P (%)	Se (ppm)
		Conc.	Vol.								
PRÉ-PARTO	10,0	30	70	11,23	66,63	1,52	20,7	2,87	0,51	0,27	0,29
PÓS-PARTO	11-13	50	50	14,8	68,72	1,6	15,9	3,05	0,75	0,35	0,31

IMS= ingestão de matéria seca; MS = matéria seca; conc. = concentrado; vol. = volumoso; PB = proteína bruta; FB = fibra bruta; EE = extrato etéreo; MM = matéria mineral; Ca = cálcio; P = fósforo; Se = selênio.

**Tabela 3-** Composição da mistura mineral fornecida aos animais. Pirassununga, 2005.

<b>Níveis de garantia por kg do produto</b>	
Cálcio (Ca)	106,057 g
Fósforo (P)	83,001 g
Enxofre (S)	26,000 g
Magnésio (Mg)	16,500 g
Sódio (Na)	171,505 g
Cobre (Cu)	2700,000 mg
Cobalto (Co)	140,040 mg
Zinco (Zn)	4600,460 mg
Iodo (I)	188,800 mg
Selênio (Se)	31,950 mg
Flúor (F) máx.	0,830 g

## 4.2 Exame microbiológico do leite

O exame microbiológico foi realizado com o objetivo de detectar a presença de infecção na glândula mamária. As amostras de leite foram colhidas após o parto, assepticamente, de todos os quartos mamários, após realização dos testes de tamis e CMT (California Mastitis Test”–SCHALM; NOORLANDER, 1957). As técnicas microbiológicas para a identificação das bactérias foram empregadas conforme descrito por Murray et al. (1999). As bactérias isoladas foram classificadas de acordo com Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology (KRIEG & HOLT, 1994).

## 4.3 Obtenção dos neutrófilos e avaliação da viabilidade

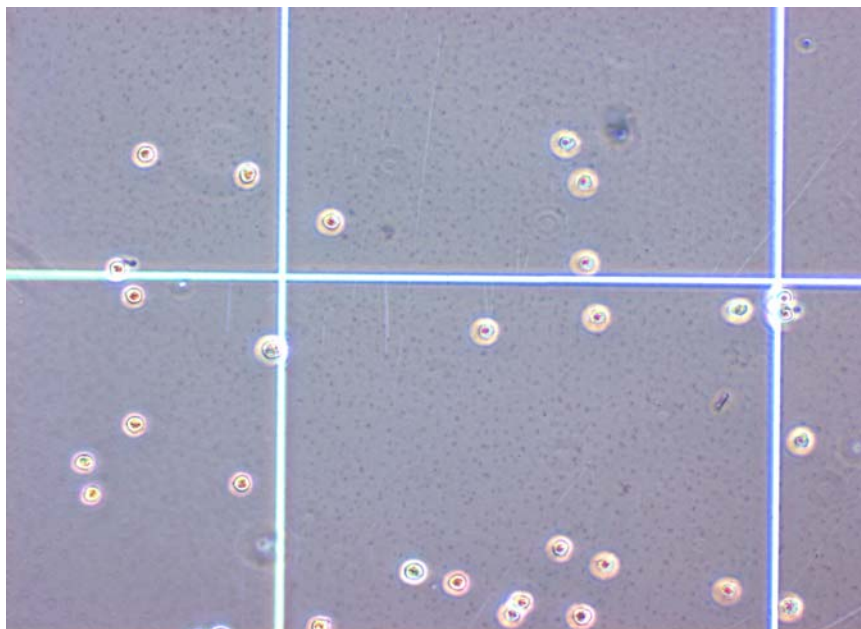
Entre o terceiro e oitavo dia após o parto foi colhido o leite para o exame das atividades funcionais dos neutrófilos. A leucocitose foi estimulada em dois quartos mamários, CMT e microbiologicamente negativos, com a infusão intramamária de 40 ml de solução de glicogênio de ostra a 0,1% e 0,5%, 36 horas e 12 horas respectivamente, antes da colheita do leite (WEBER; PETERHANS; WYLER, 1983). O leite, colhido em recipientes de plástico estéreis, foi centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células foram lavadas três vezes em tampão salina fosfato (tampão fosfato 10mM, pH 7,4, NaCl 136mM, KCl 2,7mM; PBS) mantidas em seguida no gelo (GRASSO et al., 1990).

Para avaliar a viabilidade, os neutrófilos foram diluídos em PBS e misturados em igual volume de azul de trypan a 0,04 % diluído em solução salina. As células foram contadas e classificadas no microscópio óptico utilizando a câmara de Neubauer, sendo consideradas mortas as que ficaram azuis, como ilustra a Figura 1 (ABSOLOM, 1986).

Para a identificação morfológica das células, foram feitos esfregaços corados com Panótico rápido<sup>3</sup>, visualizados no microscópio óptico.

---

<sup>3</sup> Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda.



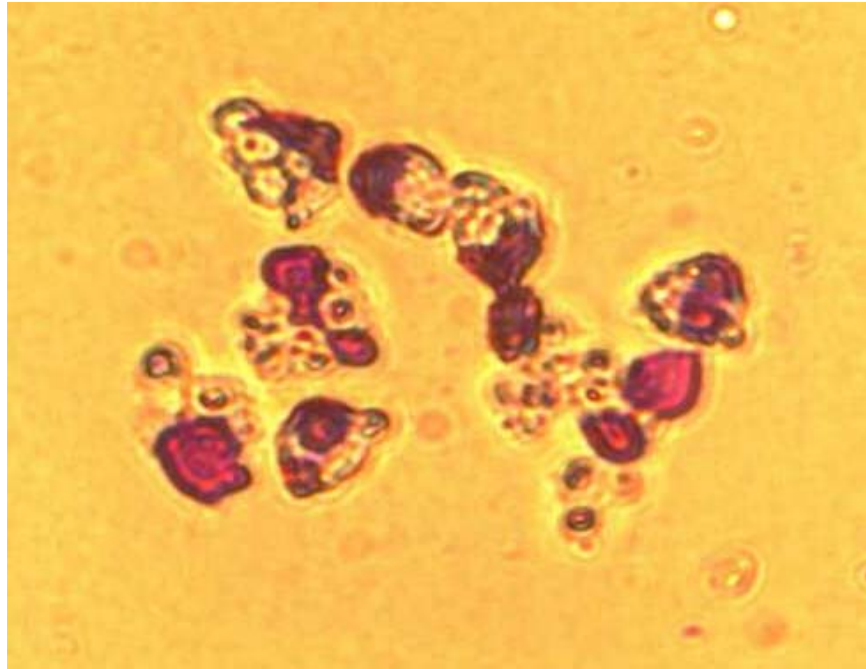
**Figura 1** – Avaliação da viabilidade dos neutrófilos no microscópio ótico em câmara de Neubauer, utilizando azul de trypan como corante: as células azuis foram consideradas mortas, (400x).

#### **4.4 Avaliação da capacidade fagocitária dos neutrófilos utilizando zimosan opsonizado.**

A capacidade fagocitária dos neutrófilos foi avaliada através da porcentagem de células que englobaram três ou mais partículas de zimosan opsonizado (Figura 2), contados na câmara de Neubauer através de microscópio ótico, utilizando como corante uma solução de cristal de violeta a 1% diluído em ácido acético (ABSOLOM, 1986).

As partículas de zimosan (*Sacharomyces cerevisiae* - 14mg/ml de PBS) foram opsonizadas com 1ml de soro de vacas saudáveis durante 20 minutos a 37 °C (ABSOLOM, 1986).

No ensaio da fagocitose, os neutrófilos ( $2 \times 10^6$  células/ml) foram suspensos em 1 ml de PBS contendo 2% de soro albumina livre de ácidos graxos, glicose 5mM e zimosan opsonizado ( $\cong 2 \times 10^7$  partículas/ml), com e sem a presença de *phorbol myristate acetate* (PMA) 200 nM, incubados em seguida, por 30 minutos a 37°C. Antes da contagem, a suspensão foi mantida no gelo por 10 minutos (ABSOLOM, 1986).



**Figura 2** – Ilustração da avaliação da capacidade fagocitária dos neutrófilos no microscópio ótico, utilizando a coloração com Panótico: foram contadas as células que englobaram três ou mais partículas de zimosan opsonizado, (1000x).

#### **4.5 Avaliação da capacidade fagocitária dos neutrófilos e lise intracelular de patógenos utilizando microrganismos opsonizados.**

Foram selecionadas duas cepas de cada microrganismo, recuperadas de casos de mastite clínica, diagnosticado em vacas criadas em fazendas comerciais. Os microrganismos utilizados foram *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis*, *Escherichia coli* identificados segundo Murray et al (1999) e *Prototheca zopfii* segundo Camargo e Fischman (1979); Melville (1995) e Pore (1985).

Para a realização do ensaio, os microrganismos foram opsonizados com soro bovino pré-aquecido a 56°C por 30 minutos. Cada cepa foi diluída para a obtenção da concentração aproximada de  $8 \times 10^8$  células/ml, utilizando a escala de McFarland como parâmetro. Em seguida, os microrganismos foram misturados com igual volume de soro pré-tratado termicamente e incubados por 20 minutos a 37°C. As cepas opsonizadas foram conservadas a -20°C por período máximo de 15 dias (ABSOLOM, 1986).

No ensaio da fagocitose, os neutrófilos ( $\cong 2 \times 10^6$  células/ml) foram suspensos em 1ml de PBS contendo 2% de soro albumina livre de ácidos graxos, glicose 5mM e microrganismo opsonizado ( $\cong 2 \times 10^7$  células/ml). Antes de serem incubadas por 30 minutos a 37°C, efetuou-se o plaqueamento das suspensões em duas diluições ( $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  em duplicatas).

As suspensões contendo cepas de *Streptococcus agalactiae* e *Corynebacterium bovis* foram plaqueadas em ágar sangue<sup>4</sup>, as cepas de *Staphylococcus aureus* em ágar Manitol<sup>5</sup>, as cepas de *Escherichia coli* em ágar MacConkey<sup>6</sup> e as cepas de *Prototheca zopfii* em ágar Sabouraud dextrose<sup>7</sup>.

Após o período de incubação, as suspensões foram mantidas no gelo por 10 minutos, sendo plaqueadas novamente nas mesmas diluições.

Em seguida, as suspensões foram tratadas com produto comercial<sup>8</sup> a base de penicilina 1000 UI/ml e estreptomicina 2,5 mg/ml para a destruição das bactérias que não foram fagocitadas pelos neutrófilos, incubadas por 30 minutos a 37°C e plaqueadas nas diluições  $10^0$  e  $10^{-1}$ , em duplicatas.

Para a retirada dos antibióticos, os neutrófilos foram lavados três vezes em PBS. Em seguida, foram ressuspensos em água destilada e submetidos a três ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 37°C para a destruição de suas membranas e liberação do conteúdo intracelular. Novamente efetuou-se o plaqueamento das suspensões.

As placas foram incubadas a 37°C em aerobiose por um período de 24 horas em relação a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Escherichia coli* e 48 horas em relação a *Corynebacterium bovis* e *Prototheca zopfii*. As unidades formadoras de colônia foram contadas por estimativa nas placas em que a quantidade excedeu 300 UFC.

O quadro a seguir demonstra os plaqueamentos efetuados durante o experimento.

---

<sup>4</sup> Blood agar base – Difco – Detroit - USA

<sup>5</sup> Manitol salt ágar – Difco – Detroit – USA

<sup>6</sup> MacConkey agar – Difco – Detroit - USA

<sup>7</sup> Sabouraud dextrose – Difco – Detroit – USA

<sup>8</sup> AGROVET ® PS – NOVARTIS Saúde Animal Ltda

**Quadro 1** - Metodologia sumarizada do ensaio de fagocitose e destruição intracelular de patógenos, utilizando suspensões de neutrófilos com *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis*, *Escherichia coli* e *Prototheca zopfii*. Pirassununga, 2005.

Tratamento	Plaqueamento	Finalidade
	<u>1 – tempo zero</u>	
Neutrófilos $2 \times 10^7$ /ml Microorganismos $2 \times 10^8$ /ml Soro albumina 2% Glicose 5mM PBS - completar para 1ml	Retirar 100 $\mu$ l e diluir em 9,9 ml - $10^{-2}$ (diluição 1) Retirar 1 ml da diluição 1 e diluir em 9 ml - $10^{-3}$	Estimar quantidade total de microrganismos no início do ensaio.
	<u>2- Pós- fagocitose</u>	
Volume restante 900 $\mu$ l. Incubar por 30 minutos a 37°C. Colocar no gelo por 10 minutos.	Retirar 100 $\mu$ l e diluir em 9,9 ml - $10^{-2}$ (diluição 1). Retirar 1 ml da diluição 1 e diluir em 9 ml - $10^{-3}$	Avaliar a porcentagem de fagocitose.
	<u>3- Pós-tratamento</u>	
Volume restante 800 $\mu$ l.. Tratar com solução de estreptomicina + penicilina (800 $\mu$ l) Incubar por 30 minutos a 37°C. Colocar no gelo por 10 minutos.	Retirar 100 $\mu$ l e plaquear diretamente - $10^0$ Retirar 100 $\mu$ l e diluir em 900 $\mu$ l e plaquear - $10^{-1}$	Destruir os microrganismos não fagocitados.
	<u>4- Pós- lise dos neutrófilos</u>	
Volume restante 1400 $\mu$ l. Centrifugar e lavar 3 vezes com PBS. Ressuspender em 700 $\mu$ l de água destilada. Congelar e descongelar 3 vezes.	Retirar 100 $\mu$ l e plaquear diretamente - $10^0$ Retirar 100 $\mu$ l e diluir em 900 $\mu$ l e plaquear - $10^{-1}$	Quantificar os microrganismos sobreviventes dentro dos neutrófilos.

bs.: o mesmo procedimento foi efetuado com todas as cepas sem a presença de neutrófilos.

Foram conduzidas durante o experimento, soluções com cada cepa microbiana sem a presença de neutrófilos e solução de neutrófilos sem a presença de microrganismos, sendo que estas passaram por todos os procedimentos acima descritos.

Os cálculos da porcentagem de fagocitose e da porcentagem de destruição de patógenos foram feitos da seguinte forma:

$$\% \text{ de fagocitose} = \frac{(\text{UFC antes da fagocitose} - \text{UFC após a fagocitose})}{\text{UFC antes da fagocitose}} \times 100$$

$$\% \text{ de destruição de patógenos} = \{1 - [\text{UFC após a lise celular} / (\text{UFC antes da fagocitose} - \text{UFC após a fagocitose})]\} \times 100$$

#### 4.6 Produção de superóxidos

A produção de superóxidos ( $O_2^-$ ) foi mensurada no espectrofotômetro (570nm) verificando a inibição da redução do citocromo c pela superóxido dismutase (MARKERT; ANDREWS; BABIOR, 1984). As células ( $2 \times 10^7$ /ml) foram incubadas por 1h a 37 °C com: 1)

citocromo c 0.2%; 2) com citocromo c 0,2% e PMA 200nM e 3) com citocromo c 0,2%, PMA 200nM e superóxido dismutase 3000UI/ml. A reação foi paralisada colocando os tubos no gelo. A produção de  $O_2^-$  foi calculada pela diferença das absorbâncias (3-2), representando a inibição da redução do citocromo c pelo ânion superóxido na presença da superóxido dismutase, sendo o valor multiplicado por 47,7 e expresso em nmol.

#### **4.7 Produção de peróxido de hidrogênio**

A produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) foi mensurada a 620nm, pelo método do vermelho de fenol, onde o mesmo é oxidado na presença de  $H_2O_2$  e peroxidase (PICK; MIZEL, 1981). As células foram incubadas por 45 minutos a 37 °C com peroxidase 0,19%, vermelho de fenol 0,1%, glicose 0,1%, com e sem a presença de PMA 200nM. Após a incubação, a reação foi paralisada com 10  $\mu$ l NaOH 1N. A produção de  $H_2O_2$  foi determinada utilizando a equação da curva padrão, preparada em cada experimento e expressa em  $\mu$  M.

#### **4.8 Determinação da atividade enzimática**

Amostras de células suspensas em PBS foram congeladas a - 176°C para posterior determinação da atividade enzimática. Para tanto, as mesmas foram descongeladas, centrifugadas e o sobrenadante foi utilizado nos ensaios.

##### **4.8.1 Determinação da atividade da glutathiona peroxidase (GPX)**

A atividade da GPX foi determinada utilizando cumene hidroperóxido 1,2mM como substrato (PAGLIA; VALENTINE, 1967). Adicionou-se em duas cubetas 934  $\mu$ l de tampão fosfato de potássio 100mM, pH 7,0 com EDTA 3mM; 1 $\mu$ l de glutathiona redutase; 5 $\mu$ l de NADPH 20mM em tampão tris HCl 10mM, pH 7,0; 20  $\mu$ l de GSH 100mM e 10 $\mu$ l de azida de sódio 100Mm. Em uma das cubetas, acrescentou-se 10 $\mu$ l de água deionizada, e na outra, 10 $\mu$ l da amostra, misturou-se, incubando por 5 minutos a 30°C. Em seguida, adicionou-se 10 $\mu$ l da solução de cumene hidroperóxido. A leitura foi efetuada a 340 nm por 3 minutos. A atividade enzimática foi expressa em nmoles de NADPH oxidado por minuto por mg de proteína utilizando-se o coeficiente de extinção molar de  $6,22 \times 10^6$ .

#### **4.8.2 Determinação da atividade glutaciona redutase (GR)**

A atividade da glutaciona redutase foi avaliada pela mensuração da velocidade de oxidação do NADPH com a concomitante redução da glutaciona oxidada (CARLBERG; MANNERVICK, 1985). Em uma cubeta adicionou-se: 500µl de tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 7,0 contendo EDTA 2mM; 5 µl de NADPH 20mM em tampão tris HCl 10mM pH 7,0; 50µl de GSSG 20mM; 10µl de amostra e água deionizada para completar o volume de 1ml. A leitura foi realizada a 340 nm por 3 minutos a 25°C. A atividade da glutaciona redutase foi expressa em nmoles de NADPH oxidado por minuto por mg de proteína.

#### **4.8.3 Determinação da atividade da catalase (CAT)**

A atividade da catalase foi determinada medindo-se a redução da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240 nm (BEERS; SIZER, 1952). Para o ensaio, utilizaram-se 990µl de tampão fosfato de potássio com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10mM e 10µl da amostra sendo a leitura efetuada durante 4 minutos. Os resultados foram expressos em nmoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduzida por minuto por mg de proteína, utilizando-se o coeficiente de extinção molar da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 43,6M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

#### **4.8.4 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)**

A atividade da superóxido dismutase foi determinada com base na sua ação inibitória da oxidação do *nitro blue tetrazolium* (NBT) dependente de superóxido, pelo sistema xantina – xantina oxidase, gerador de O<sub>2</sub><sup>-</sup> (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971). Adicionou-se em uma cubeta 870µl de tampão fosfato de sódio e potássio 53 mM pH 7,8; 10µl de xantina 0,05 mM; 10µl de EDTA 0,1mM; 10µl de NBT; 10µl da amostra e 90µl de xantina oxidase. Simultaneamente, preparou-se outra cubeta, sem a adição da amostra, como branco. A leitura foi efetuada a 550nm por 3 minutos a 25°C. A porcentagem de inibição da oxidação do NBT foi calculada subtraindo-se a leitura da amostra da leitura do branco, dividindo-se pela leitura do branco. Considerou-se que uma unidade da enzima corresponde a 50% de inibição.

#### **4.8.5 Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)**

A atividade da MPO foi mensurada de acordo com Hillegass et al. (1990), verificando a oxidação da *o*-dianisidina na presença de peróxido de hidrogênio. Acrescentou-se 20µl da



amostra em tampão fosfato de potássio 50mM, pH 6,0, contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,003% e dicloridrato de *o*-dianisidina a 0,025%. Uma unidade da enzima foi definida como a quantidade de MPO que causa a mudança na absorvância de 1,0 min<sup>-1</sup> a 460 nm a 25°C.

#### **4.9 Determinação da concentração de proteína nas amostras**

A concentração de proteína da amostras foi determinada espectrofotometricamente pelo método descrito por Bradford (1976), usando soro albumina bovina para a construção da curva padrão.

#### **4.10 Análise de Selênio**

As amostras do concentrado e de silagem de milho fornecidos aos animais foram remetidas ao laboratório<sup>9</sup>, assim como as amostras de soro para análise de selênio.

Para cada animal foram analisadas duas amostras de soro (uma colhida 30 dias antes do parto previsto e uma na véspera da colheita de leite para o experimento). O selênio foi determinado pelo método de fluorimetria (OLSON; PALMER; CARY, 1975). A análise deste foi realizada para certificar se a dieta continha o elemento nos níveis necessários à manutenção da saúde dos animais e se os níveis séricos estavam dentro dos padrões recomendados na literatura.

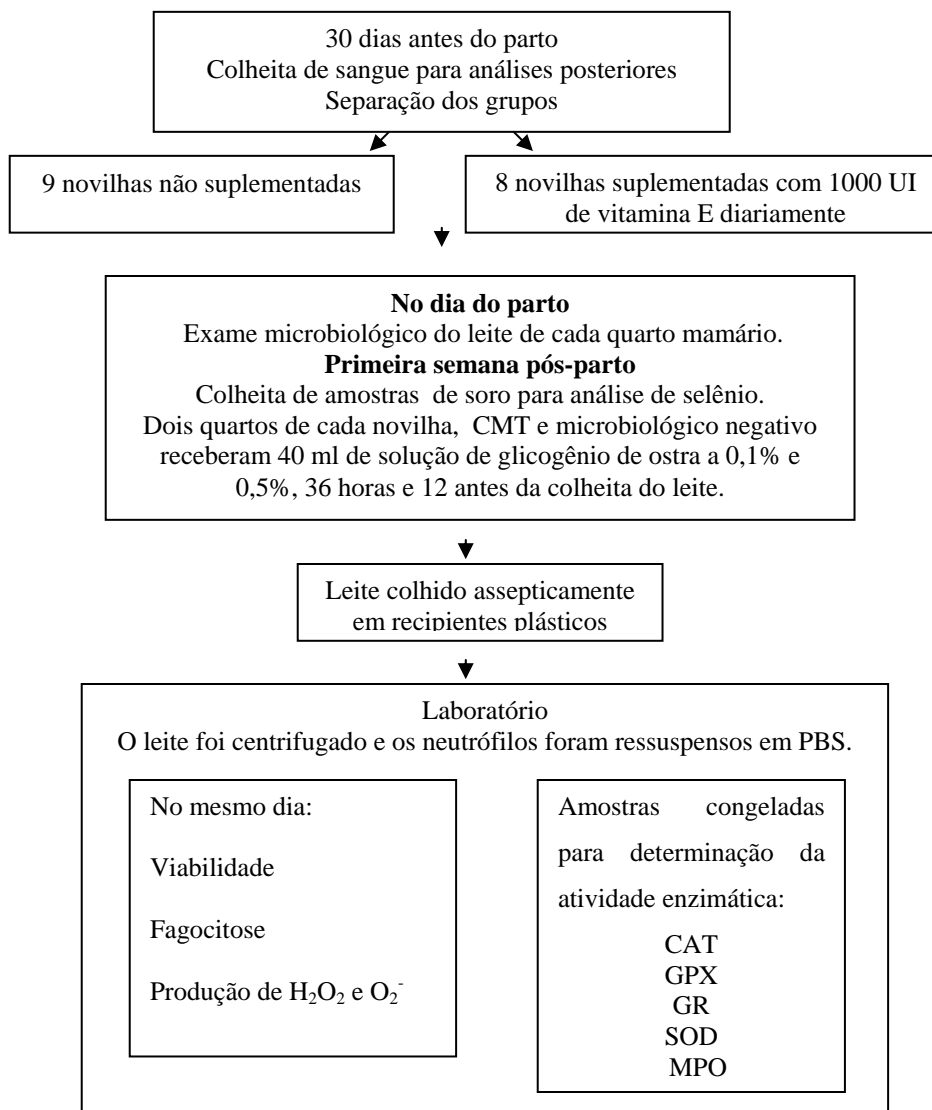
#### **4.11 Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram feitas através da análise de variância (ANOVA), teste T para as análises pareadas e coeficiente de correlação, utilizando o programa GRAPHPAD INSTAT (1990-1993).

---

<sup>9</sup> Laboratório de Minerais do Depto. de Zootecnia da Faculdade de Zootecnia e Eng<sup>a</sup>. de Alimentos da USP

#### 4. 12 Fluxograma do experimento



## 5 RESULTADOS

Os resultados obtidos são referentes aos experimentos realizados com sete animais do grupo controle e sete do grupo suplementado, pois três animais foram excluídos do experimento, sendo dois por abortamento e um por apresentar mastite no pós-parto.

### 5.1 Avaliação da viabilidade

A viabilidade dos neutrófilos dos animais do grupo controle e do grupo suplementado foi de 89,78% e de 92,4% respectivamente, não apresentando diferença estatística entre os tratamentos.

### 5.2 Avaliação da capacidade fagocitária dos neutrófilos utilizando zimosan opsonizado.

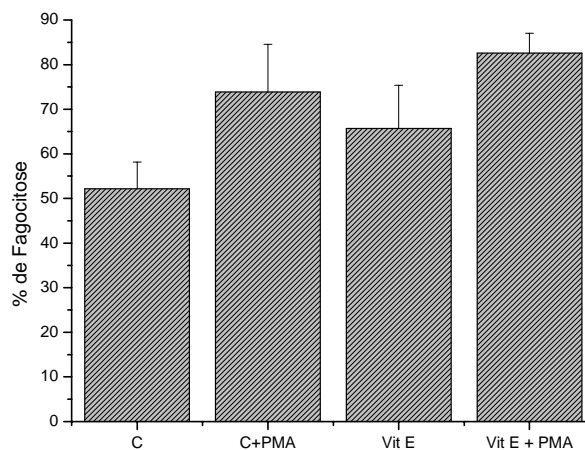
A porcentagem de fagocitose de zimosan opsonizado pelos neutrófilos dos animais suplementados foi maior ( $P < 0,05$ ) quando comparada com o grupo controle, sendo 65,68% e 52,13% respectivamente. Não foram detectadas diferenças estatísticas quanto à capacidade fagocitária dos neutrófilos entre os dois grupos experimentais com a presença de PMA, sendo 73,88% para o grupo controle e 82,59% para o grupo suplementado. Sob o estímulo do PMA, os neutrófilos do grupo controle apresentaram maior capacidade fagocitária ( $P < 0,05$ ), o mesmo ocorrendo com os neutrófilos do grupo suplementado (Tabela 4, Figura 3).

**Tabela 4** – Porcentagem de fagocitose de zimosan opsonizado pelos neutrófilos do leite de novilhas da raça Holandesa, sendo sete não suplementadas (controle) e sete suplementadas com 1000 UI de vitamina E (Vitamina E) na ausência e na presença de *phorbol myristate acetate* (PMA). Pirassununga, 2005.

	Controle (%)	Vitamina E (%)
Sem PMA	52,13 ( $\pm 6,0$ ) <sup>aA</sup>	65,68 ( $\pm 9,7$ ) <sup>bA</sup>
Com PMA	73,88 ( $\pm 10,7$ ) <sup>B</sup>	82,59 ( $\pm 4,5$ ) <sup>B</sup>

Letras diferentes (a,b) ressaltam diferenças estatísticas para  $P < 0.05$ , ANOVA, entre o grupo controle e o grupo suplementado.

Letras diferentes (A,B) ressaltam diferenças estatísticas para  $P < 0.05$ , teste T, dentro do mesmo tratamento, com ou sem a presença de PMA.



**Figura 3:** Porcentagem de fagocitose de zimosan opsonizado pelos neutrófilos do leite de novilhas da raça Holandesa, sendo sete não suplementadas (C=controle) e sete suplementadas com 1000 UI de vitamina E (VitE) na ausência e na presença de PMA. Pirassununga, 2005.

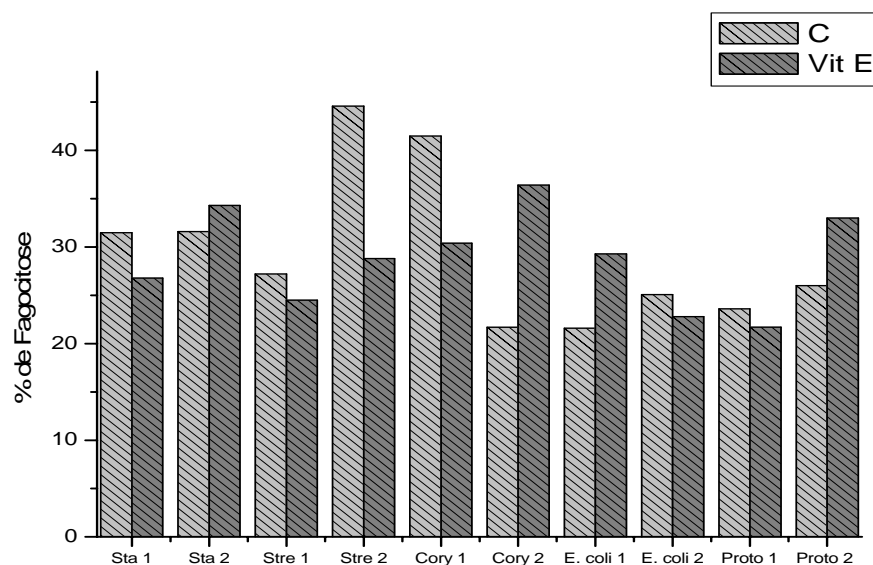
### **5.3 Avaliação da capacidade fagocitária dos neutrófilos utilizando microrganismos causadores de mastite.**

Não foram detectadas diferenças estatísticas comparando-se os grupos em relação à porcentagem da fagocitose de todos os microrganismos estudados considerados em conjunto, 30,2% para grupo controle e 28,8% para o grupo suplementado com vitamina E (Tabela 5).

Com relação a cada cepa, considerada individualmente, também não foram detectadas diferenças estatísticas comparando-se o grupo controle com o grupo suplementado (Figura 4, Tabela5).

**Tabela 5** - Porcentagem de fagocitose dos microrganismos opsonizados causadores de mastite pelos neutrófilos do leite de novilhas da raça Holandesa, sendo sete não suplementadas (controle) e sete suplementadas com 1000 UI de vitamina E (Vitamina E). Pirassununga, 2005.

	Controle %	Vitamina E %
<b>Staphylococcus aureus 1</b>	31,5 (±18,5)	26,8(±13,5)
<i>Staphylococcus aureus 2</i>	31,6(±13,2)	34,3(±15,1)
<i>Streptococcus agalactiae 1</i>	27,2(±11,5)	24,5(±9,7)
<i>Streptococcus agalactiae 2</i>	44,6(±18,7)	28,8(±19,2)
<i>Corynebacterium bovis 1</i>	41,5(±21,5)	30,4(±21,9)
<i>Corynebacterium bovis 2</i>	21,7(±11,9)	36,4(±25,1)
<i>Escherichia coli 1</i>	21,6(±18,6)	29,28(±13,5)
<i>Escherichia coli 2</i>	25,1(±12,3)	22,8(±8,9)
<i>Prototheca zopfii 1</i>	23,6 (±16,2)	21,7(±13,7)
<i>Prototheca zopfii 2</i>	26(±13,8)	33(±22,8)
Total (média)	30,2(±16,7)	28,8(±16,4)



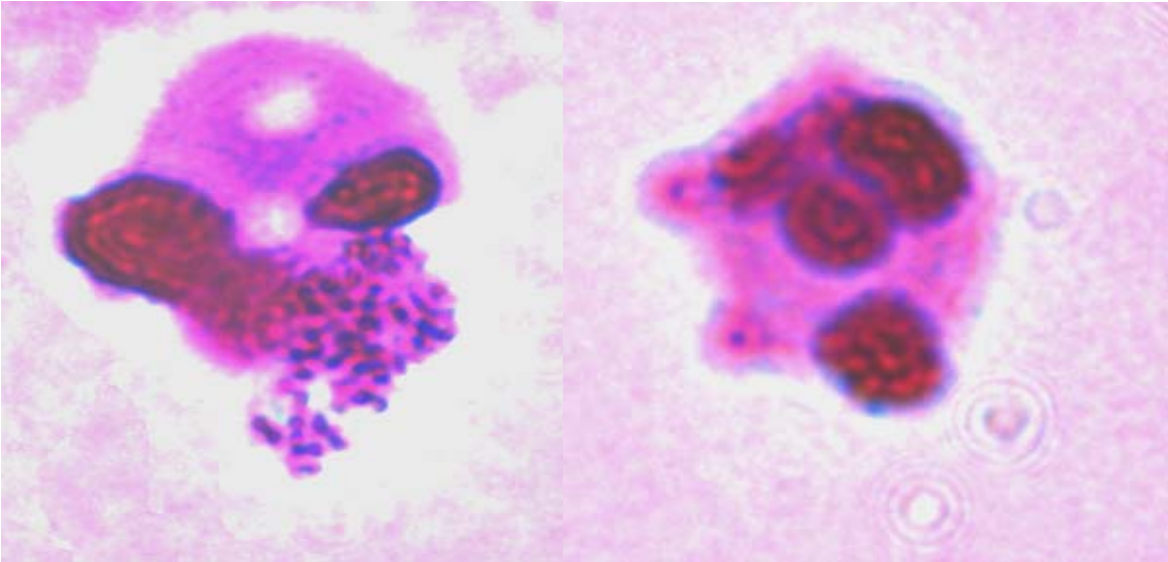
**Figura 4** - Porcentagem de fagocitose dos microrganismos opsonizados causadores de mastite pelos neutrófilos do leite de novilhas da raça Holandesa, sendo sete do grupo controle (C) e sete suplementadas com 1000 UI de vitamina E (Vit E). Pirassununga, 2005.

Com relação à resposta individual, considerando a porcentagem de fagocitose por animal, também não foram detectadas diferenças estatísticas entre os mesmos (Tabela 6).

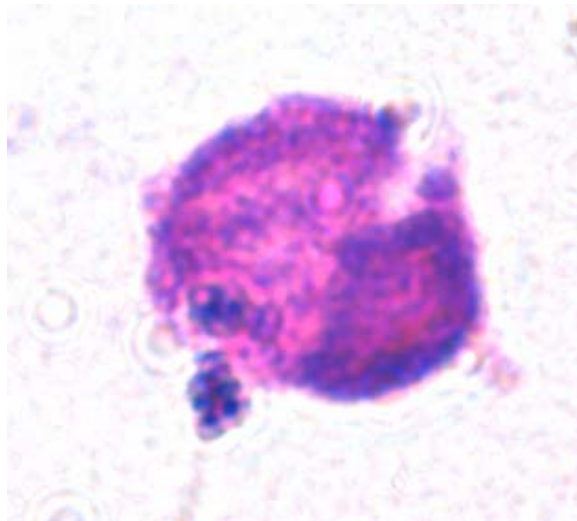
**Tabela 6** – Porcentagem de fagocitose de todos os microrganismos, pelos neutrófilos do leite de novilhas da raça Holandesa, sendo sete não suplementadas (1 a 7) e sete suplementadas com 1000 UI de vitamina E (8 a 14), apresentados por animal. Pirassununga, 2005.

Grupo	Fagocitose (% média por animal)						
	Animais						
	1	2	3	4	5	6	7
Controle	30,3 (±12,4)	33,5(±20,3)	41,3(±16,9)	39,4(±10,3)	29(±11,8)	15,4(±12,3)	25,8(±19,0)
	8	9	10	11	12	13	14
Vitamina E	28,5(±12,9)	36,2(±13,8)	23,6(±11,4)	35(±28,1)	26,7(±15,8)	25,8(±12,8)	22(±11,9)

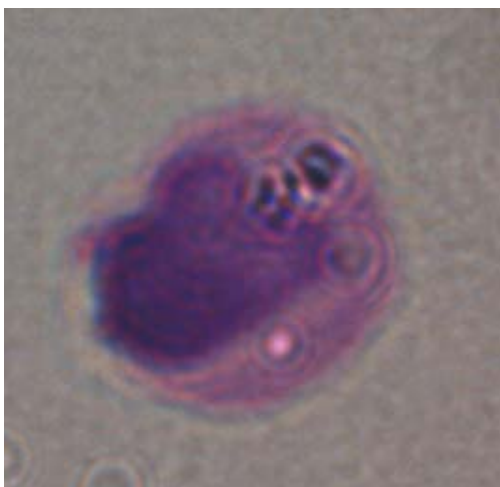
As figuras a seguir ilustram a fagocitose dos microrganismos efetuada pelos neutrófilos recuperados do leite dos animais experimentais.



**Figura 5-** Neutrófilos fagocitando *Corynebacterium bovis*: à esquerda bastonetes Gram + sendo englobados; à direita pseudópodes contendo bactérias (1000x). Pirassununga, 2005.



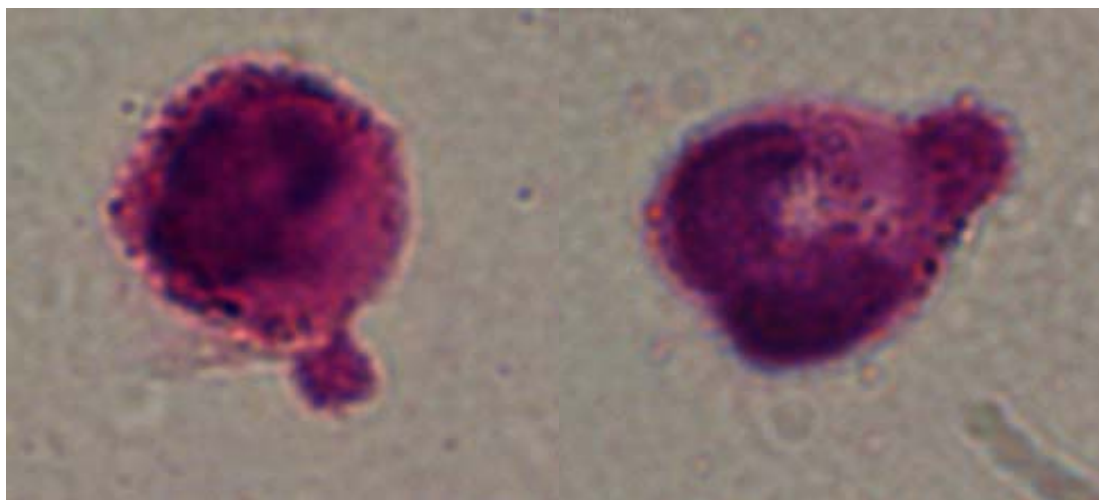
**Figura 6** – Neutrófilos fagocitando *Staphylococcus aureus*: cocos Gram + aderidos à célula e vacúolos fagocíticos (1000x). Pirassununga, 2005.



**Figura 7** – Neutrófilo com fagossomo contendo *Staphylococcus aureus*; coloração de Gram (1000x). Pirassununga, 2005.

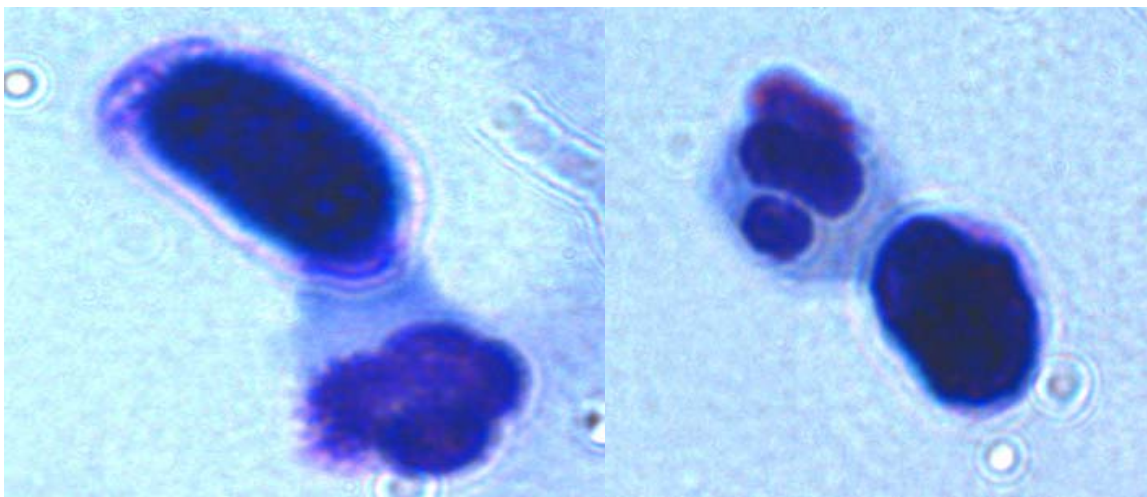


**Figura 8** – *Staphylococcus aureus* aderidos ao neutrófilo; coloração de Gram (1000x). Pirassununga, 2005.

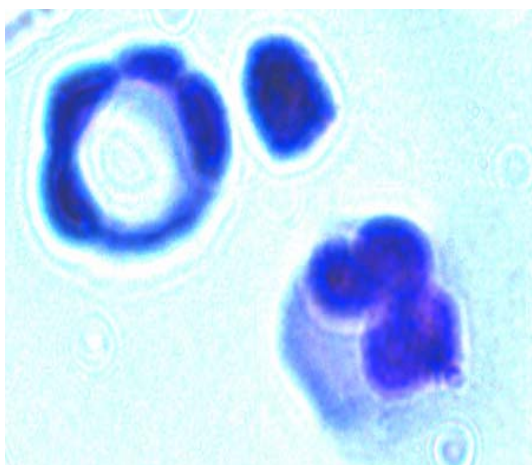


**Figura 9** – Neutrófilos fagocitando *Escherichia coli*: células lançando os pseudópodes e presença de bactérias Gram – aderidas às mesmas (1000x). Pirassununga, 2005.





**Figura 10** - Fagocitose de *Prototheca zopfii*: à esquerda neutrófilo englobando *Prototheca zopfii*; à direita adesão do neutrófilo à *Prototheca zopfii*, utilizando a coloração com Panótico (1000x). Pirassununga, 2005.



**Figura 11** - Neutrófilo apresentando vacúolo fagocítico e *Prototheca zopfii* ao lado; coloração com Panótico (1000x). Pirassununga, 2005.



**Figura 12** - *Prototheca zopfii* aderida ao neutrófilo; coloração com Panótico (1000x). Pirassununga, 2005.

### 5.3 Avaliação da capacidade de destruição intracelular de patógenos pelos neutrófilos recuperados do leite.

Não foram detectadas diferenças estatísticas quanto à capacidade de destruição de patógenos pelos neutrófilos do leite entre os grupos controle e suplementado, em relação a cada cepa de microrganismo (Tabela 7). A porcentagem média de destruição de patógenos pelos neutrófilos do grupo controle foi de 98,96% e do grupo suplementado 99,24%, não diferindo estatisticamente.

**Tabela 7** –Porcentagem de destruição dos microrganismos opsonizados causadores de mastite pelos neutrófilos do leite de novilhas da raça Holandesa, sendo sete não suplementadas (controle) e sete suplementadas com 1000 UI de vitamina E (Vitamina E). Pirassununga, 2005.

Microrganismos	Controle %	Vitamina E %
<i>Staphylococcus aureus</i> 1	98,18 ( $\pm 2,6$ )	98,99 ( $\pm 1,0$ )
<i>Staphylococcus aureus</i> 2	96,45 ( $\pm 3,8$ )	97,80 ( $\pm 2,8$ )
<i>Streptococcus agalactiae</i> 1	97,79 ( $\pm 3,0$ )	99,91 ( $\pm 0,1$ )
<i>Streptococcus agalactiae</i> 2	99,74 ( $\pm 0,3$ )	99,42 ( $\pm 0,9$ )
<i>Corynebacterium bovis</i> 1	99,89 ( $\pm 0,3$ )	99,79 ( $\pm 0,5$ )
<i>Corynebacterium bovis</i> 2	98,13 ( $\pm 3,0$ )	98,03 ( $\pm 4,4$ )
<i>Escherichia coli</i> 1	100,0 ( $\pm 0,0$ )	99,95 ( $\pm 0,1$ )
<i>Escherichia coli</i> 2	100,0 ( $\pm 0,0$ )	100,0 ( $\pm 0,0$ )
<i>Prototheca zopfii</i> 1	99,50 ( $\pm 0,9$ )	99,05 ( $\pm 1,9$ )
<i>Prototheca zopfii</i> 2	99,94 ( $\pm 0,1$ )	99,51 ( $\pm 0,9$ )
Total (média)	98,96 ( $\pm 2,2$ )	99,24 ( $\pm 1,8$ )

Com relação à resposta individual, considerando a porcentagem de destruição de patógenos por animal, também não foram detectadas diferenças estatísticas entre os mesmos (Tabela 8).

**Tabela 8** - Porcentagem média de destruição intracelular de todos os microrganismos opsonizados estudados, pelos neutrófilos do leite de novilhas da raça Holandesa, sendo sete não suplementadas (1 a 7) e sete suplementadas com 1000 UI de vitamina E (8 a 14) apresentados por animal. Pirassununga, 2005.

Grupos	Destruição intracelular de patógenos (% média por animal)						
	Animais						
	1	2	3	4	5	6	7
Controle	99,51	99,96	99,70	99,72	99,56	98,57	97,77
	8	9	10	11	12	13	14
Vitamina E	98,67	99,81	97,26	99,24	99,92	98,53	99,09

### 5.5 Produção de superóxido

Quanto à produção de superóxido, não foram detectadas diferenças estatísticas entre os dois grupos, sendo 1,6 ( $\pm 1,4$ ) nmol no grupo controle e 3,0 ( $\pm 1,9$ ) nmol no grupo suplementado.

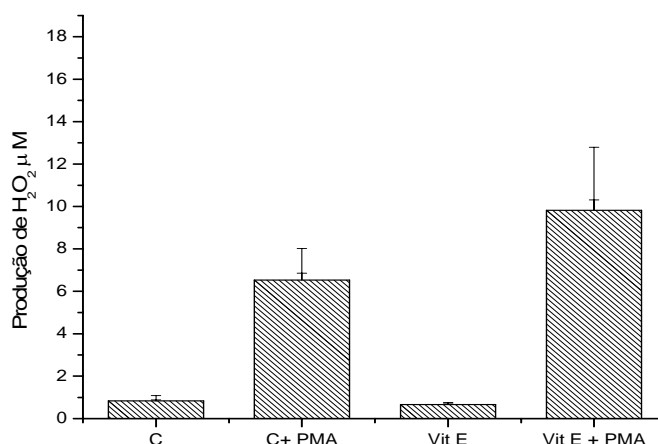
### 5.6 Produção de peróxido de hidrogênio

Quanto à produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, não foram detectadas diferenças estatísticas entre os grupos controle e suplementado, sendo 0,83 $\mu$ M e 0,67 $\mu$ M respectivamente (Tabela 9, Figura 13). Sob o estímulo do PMA, os neutrófilos do grupo controle produziram 8 vezes mais H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $P < 0,05$ ). No grupo suplementado, as células incubadas com PMA produziram 15 vezes mais H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quando comparadas com as células do mesmo grupo sem a presença de PMA ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 9** – Produção de  $H_2O_2$  em  $\mu M$  pelos neutrófilos do leite de novilhas da raça Holandesa, sendo sete não suplementadas (controle) e sete suplementadas com 1000 UI de vitamina E (Vitamina E) na ausência e na presença de *phorbol myristate acetate* (PMA). Pirassununga, 2005.

	Controle ( $\mu M$ )	Vitamina E ( $\mu M$ )
Sem PMA	0,83 ( $\pm 0,66$ ) <sup>a</sup>	0,67 ( $\pm 0,25$ ) <sup>a</sup>
Com PMA	6,53 ( $\pm 3,9$ ) <sup>b</sup>	9,82 ( $\pm 7,3$ ) <sup>b</sup>

Letras diferentes (a,b) ressaltam diferenças estatísticas para  $P < 0.05$ , teste T, dentro do mesmo tratamento, com ou sem a presença de PMA.



**Figura 13** – Produção de  $H_2O_2$  em  $\mu M$  pelos neutrófilos do leite de novilhas da raça Holandesa, sendo sete não suplementadas (C=controle) e sete suplementados com 1000 UI de vitamina E (Vit E) na ausência e na presença de PMA. Pirassununga, 2005.

### 5.7 Avaliação da atividade enzimática

Quanto à atividade enzimática, não foram detectadas diferenças estatísticas entre os grupos controle e suplementado. A atividade da catalase foi de 4,3 e 3,6  $\mu mol \text{ min}^{-1} \text{ mg prote\acute{a}na}^{-1}$ , da glutathiona redutase de 42,7 e 48,9  $nmol \text{ min}^{-1} \text{ mg prote\acute{a}na}^{-1}$ , da glutathiona peroxidase de 16,2 e 30  $nmol \text{ min}^{-1} \text{ mg prote\acute{a}na}^{-1}$ , superóxido dismutase de 3,85 e 6,32  $U \text{ mg prote\acute{a}na}^{-1}$  e da mieloperoxidase de 0,67 e 0,29  $U \text{ mg prote\acute{a}na}^{-1}$  para o grupo controle e suplementado respectivamente (Tabela 10).

**Tabela 10** – Atividade média da catalase, da glutatona redutase, da glutatona peroxidase, da superóxido dismutase e da mieloperoxidase nos neutrófilos do leite de novilhas da raça Holandesa, sendo sete não suplementadas (controle) e sete suplementadas com 1000 UI de vitamina E (Vitamina E). Pirassununga, 2005.

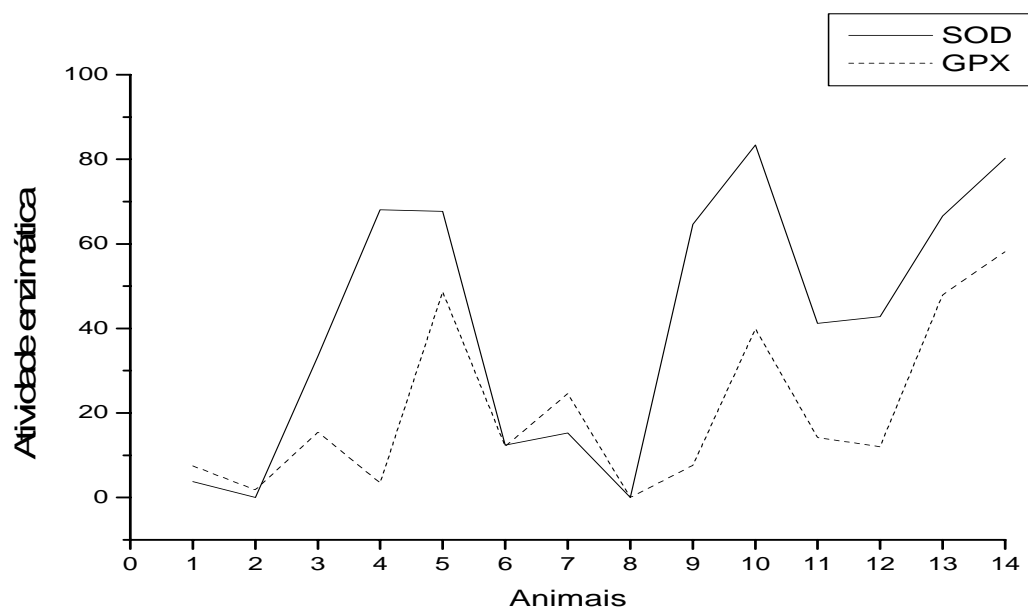
Enzimas	Controle	Vitamina E
Catalase ( $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg proteína}^{-1}$ )	4,3 ( $\pm 2,1$ )	3,6 ( $\pm 2,2$ )
Glutaciona redutase ( $\text{nmol min}^{-1}\text{mg proteína}^{-1}$ )	42,7 ( $\pm 13,8$ )	48,9 ( $\pm 17,6$ )
Glutaciona peroxidase ( $\text{nmol min}^{-1}\text{mg proteína}^{-1}$ )	16,2 ( $\pm 16,3$ )	30,0 ( $\pm 21,4$ )
Superóxido dismutase (U mg proteína <sup>-1</sup> )	3,85 ( $\pm 2,4$ )	6,32 ( $\pm 1,8$ )
Mieloperoxidase (U mg proteína <sup>-1</sup> )	0,67 ( $\pm 0,45$ )	0,29 ( $\pm 0,26$ )

A correlação entre a glutatona peroxidase e a superóxido dismutase foi positiva (0,55,  $P < 0,1$ ); entre a mieloperoxidase e a glutatona redutase foi negativa (-0,68,  $P < 0,05$ ); sendo que entre as demais enzimas não foram detectadas diferenças estatísticas significativas (Tabela 11; Figuras 14 e 15).

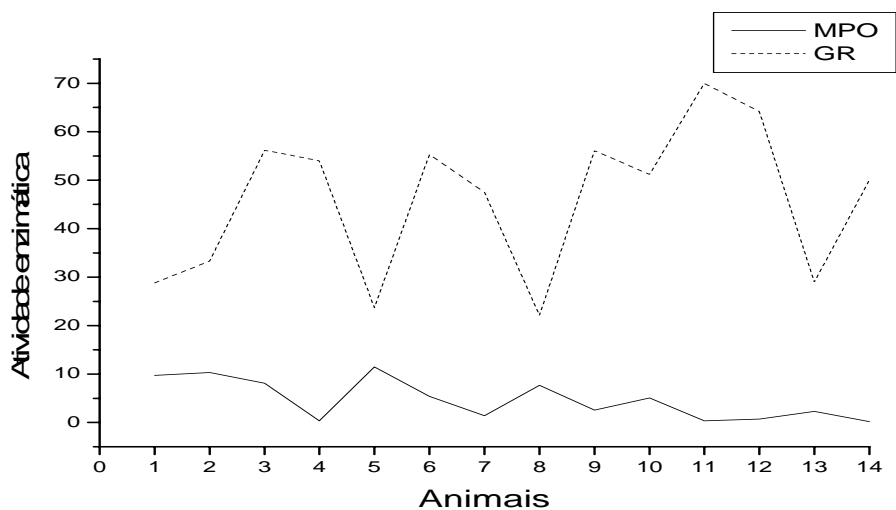
**Tabela 11** – Atividade das enzimas que apresentaram correlação estatisticamente significativa, sendo positiva entre a glutathione peroxidase (GPX) e a superóxido dismutase (SOD) e negativa entre a glutathione reductase (GR) e a mieloperoxidase (MPO) nos neutrófilos do leite de novilhas da raça Holandesa não suplementadas (1 a 7) e suplementadas com 1000 UI de vitamina E (8 a 14). Pirassununga, 2005.

Animais	Enzimas			
	GPX	SOD	MPO	GR
	nmol/min/mg prot	U/mg prot	U/mg prot	nmol/min/mgprot
1	7,5	3,38	0,98	28,8
2	1,8	nd	1,0334	33,3
3	15,5	3,35	0,8107	56,2
4	3,5	6,81	0,032	54
5	48,7	6,77	1,15	23,7
6	12,1	1,24	0,54	55,3
7	24,6	1,53	0,139	47,5
8	nd	nd	0,7679	22,1
9	7,6	6,46	0,2576	56,1
10	39,9	8,34	0,5069	51,2
11	14,2	4,12	0,0327	70
12	12	4,28	0,0693	64,2
13	48	6,66	0,2294	29
14	58	8,03	0,1906	50
Correlação	(0,55, $P < 0,1$ )		(-0,68, $P < 0,05$ )	

Prot= proteína; min= minuto; U= unidades, nd = não determinada



**Figura 14** – Atividade da superóxido dismutase (SOD; U mg proteína<sup>-1</sup> x 10) e da glutatona peroxidase (GPX; nmol min<sup>-1</sup>mg proteína<sup>-1</sup>) nos neutrófilos de novilhas da raça Holandesa do grupo controle (1 a 7) e suplementadas com 1000 UI de vitamina E (8 a 14). Pirassununga, 2005.



**Figura 15** – Atividade da mieloperoxidase (MPO; U mg proteína<sup>-1</sup> x 10) e da glutatona redutase (GR; nmol min<sup>-1</sup>mg proteína<sup>-1</sup>) nos neutrófilos de novilhas da raça Holandesa do grupo controle (1 a 7) e suplementadas com 1000 UI de vitamina E (8 a 14). Pirassununga, 2005.

### 5.8 Concentração sérica de selênio

A concentração sérica de selênio aos trinta dias antes do parto comparada à concentração na semana após o parto diferiu estatisticamente, sendo 0,048 e 0,060  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente ( $P < 0,05$ ). No pré-parto, comparando-se o grupo controle com o grupo suplementado, detectou-se maior ( $P < 0,05$ ) concentração do mineral no grupo suplementado (0,040 x 0,057  $\mu\text{g/ml}$ ). Após o parto não foram detectadas diferenças estatísticas entre os dois grupos (Tabela 12).

**Tabela 12** – Concentração sérica de selênio de novilhas da raça Holandesa, sendo sete não suplementadas (controle) e sete suplementadas com 1000 UI de vitamina E (Vitamina E) no pré e pós-parto. Pirassununga, 2005.

	Pré-parto $\mu\text{g/ml}$	Pós-parto $\mu\text{g/ml}$
Controle	0,040 ( $\pm 0,006$ ) <sup>a</sup>	0,057 ( $\pm 0,021$ )
Vitamina E	0,057 ( $\pm 0,005$ ) <sup>b</sup>	0,063 ( $\pm 0,010$ )
Total	0,048 ( $\pm 0,010$ ) <sup>A</sup>	0,060 ( $\pm 0,016$ ) <sup>B</sup>

Letras diferentes (a,b) ressaltam diferenças estatísticas para  $P < 0,05$ , ANOVA.

Letras diferentes (A,B) ressaltam diferenças estatísticas para  $P < 0,05$ , teste T.



## 5 DISCUSSÃO

Vários autores (HOGAN; WEISS; SMITH, 1993; McDOWEL et al., 1996; WEISS, 1998) têm sugerido a suplementação com vitamina E nos períodos pré e pós-parto, visando melhorar a resposta imunológica, aumentando assim a resistência dos animais às diversas doenças que os acometem. A indicação da suplementação com vitamina E baseia-se no estresse oxidativo a que são submetidas as vacas leiteiras, considerando principalmente o período de transição, onde a ingestão de matéria seca é minimizada combinada com produção leiteira crescente após o parto, levando o animal ao balanço energético negativo, onde o catabolismo aumenta, resultando na produção espécies reativas de oxigênio (ALLISON; LAVEN, 2000).

A diminuição da fagocitose e da destruição intracelular de patógenos ocorre paralelamente com a diminuição da ingestão de matéria seca e da concentração de vitamina E circulante, aumentando a susceptibilidade da glândula mamária às infecções. Estudos como o Weiss et al. (1990), Politis et al. (1995) e Politis et al. (1996) mostraram que a suplementação com vitamina E no período seco e no início da lactação evita a queda na concentração sanguínea da mesma.

No presente estudo, a suplementação com vitamina E aumentou a fagocitose de zimosan opsonizado ( $P < 0,05$ ), mas não foram observadas diferenças na porcentagem de fagocitose de microrganismos causadores de mastite. Hogan et al. (1990) e Hogan et al. (1992) também não detectaram diferenças na fagocitose de *Staphylococcus aureus* e *E. coli* dos neutrófilos do leite de bovinos suplementados com vitamina E. Ndiweni e Finch (1996) suplementando *in vitro* os neutrófilos isolados do sangue, detectaram aumento na fagocitose de *S. aureus*, com doses intermediárias da vitamina. Neste trabalho, as condições foram bem diversas do que ocorre na glândula mamária e na presença do leite, onde a ingestão de glóbulos de gordura e micelas de caseína provavelmente interfere na resposta fagocitária destas células (DULIN; PAAPE; NICKERSON, 1988; SORDILLO; NICKERSON, 1988).

O PMA estimulou a fagocitose de zimosan opsonizado, tanto no grupo controle, quanto no grupo suplementado, sendo que entre os dois grupos, o estímulo que o PMA produziu não diferiu estatisticamente. Estes resultados são fisiologicamente explicáveis, já que a função destas células é fagocitar na presença de estímulos desencadeados por agentes estranhos ao hospedeiro.

Quanto à destruição intracelular de patógenos, não foram detectadas diferenças entre os grupos experimentais, contrariando os resultados obtidos por Hogan et al. (1990) e Hogan et al.

(1992), onde a destruição de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foi maior nos animais suplementados. Hogan et al. (1992) compararam a suplementação oral com intramuscular e observaram aumento na destruição de patógenos somente no grupo que recebeu a suplementação por via intramuscular.

A destruição intracelular de patógenos fagocitados é dependente de várias reações enzimáticas e da produção de espécies reativas de oxigênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; PEAKMAN; VERGANI, 1999), como por exemplo, o peróxido de hidrogênio e o ânion superóxido, que levam à “explosão” oxidativa. A vitamina E, agindo como antioxidante, é capaz de proteger as células da oxidação dos ácidos graxos polinsaturados presentes nas membranas, preservando as suas funções (HOGAN et al., 1990; MILLER; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA; MADSEN, 1993). No presente estudo a suplementação com vitamina E não modificou a produção de  $O_2^-$  pelos neutrófilos. Outros autores observaram o mesmo trabalhando com macrófagos da glândula mamária (POLITIS et al., 1996), porém verificaram que os neutrófilos sanguíneos de animais suplementados produziram duas vezes mais  $O_2^-$  (POLITIS et al., 1995). Resultados similares foram obtidos *in vitro*, onde foram observados um pequeno aumento com doses intermediárias de suplementação, e certa inibição com doses mais elevadas (NDIWENI; FINCH, 1996).

A produção  $O_2^-$  pode ser avaliada indiretamente através da capacidade de redução do NBT (*nitro blue tetrazolium*). Katamoto et al. (1998) utilizando esta metodologia, verificaram maior capacidade de redução do NBT pelos neutrófilos estimulados de cabras suplementadas com vitamina E, porém sem significância estatística. Contrariando estes resultados, Lopes et al. (2003), observaram menor capacidade de redução do NBT pelos neutrófilos estimulados do grupo suplementado. Neste trabalho, a dose utilizada de vitamina E foi superior, podendo ter interferido na produção de ânion superóxido através da inibição da NADPH oxidase, presente na membrana celular, como o que foi observado por Schock et al. (2004), e conseqüentemente, diminuindo a capacidade de redução do NBT. Segundo Azzi, Ricciarelli e Zingg (2002) a vitamina E inibe a produção de superóxido nos fagócitos através da inibição da atividade da proteína quinase C. Comparando-se os resultados destes trabalhos, verifica-se que a produção de  $O_2^-$  pode ser influenciada pela suplementação de vitamina E, sendo que em doses inferiores é estimulada e em doses elevadas é inibida.

A quantidade de peróxido de hidrogênio produzida pelos neutrófilos não diferiu entre grupo controle e o suplementado. O PMA, ao estimular os neutrófilos, simula um processo inflamatório, aumentando a atividade dos mesmos, fato observado com o aumento da produção de peróxido de hidrogênio nos dois tratamentos sob o seu estímulo. A maior produção de peróxido de hidrogênio pode aumentar a destruição de microrganismos fagocitados, imprescindível para debelar a infecção (NOCKELS, 1996), porém o acúmulo do mesmo pode comprometer a funcionalidade dos polimorfonucleares (MILLER; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA; MADSEN, 1993; SMITH; HOGAN; WEISS, 1997). Valle et al. (2000a) observaram que a porcentagem de infecções intramamárias foi maior no grupo recebendo a suplementação diária de 3000UI comparada com o grupo suplementado com 1000UI e com o grupo não suplementado, sendo também maior nas vacas recebendo 1000UI comparadas às vacas não suplementadas, provavelmente, devido à menor produção de espécies reativas de oxigênio, inibindo assim um dos principais mecanismos de destruição de patógenos, a explosão respiratória.

Nos estudos que tentaram correlacionar a ocorrência de mastite com a suplementação de vitamina E, foram obtidos os mais diversos resultados, como: diminuição da mastite clínica (PASCHOAL; ZANETTI; CUNHA, 2003; VALLE et al., 2000b; WEISS et al., 1997) ausência de diferenças quanto à mastite clínica (ERSKINE et al., 1997; LEBLANK et al., 2002), ausência de diferenças quanto à ocorrência de mastite subclínica (BATRA; HIDIROGLOU; SMITH, 1992; ERSKINE et al., 1987; JUKOLA et al., 1996; NDIWENI et al., 1991; PASCHOAL, 2002; VALLE et al., 2000a; ZANETTI et al., 1998), menor CCS (BALDI et al., 2000; PAES et al., 2001), redução das infecções intramamárias (WEISS et al., 1997), ausência de diferenças quanto às infecções (BATRA; HIDIROGLOU; SMITH, 1992; JUKOLA et al., 1996; SCHUKKEN et al., 1999), aumento na ocorrência de infecções (VALLE et al., 2000a). Barnouin e Chassagne (1998) correlacionaram rebanhos com alta incidência de mastite e baixa suplementação de ADE.

Analisando os trabalhos acima referidos pode-se observar que a suplementação com vitamina E parece exercer maior impacto na resposta inflamatória, como foi referido por Wu, Hayek e Meydani (2001), que relataram menor atividade da cicloxigenase influenciada pela vitamina, o que explica a redução da mastite clínica nos animais suplementados, do que propriamente nas atividades dos neutrófilos da glândula mamária, como na fagocitose e na destruição de patógenos, comprovados pela discordância dos resultados quanto à ocorrência de

mastite subclínica e de infecções intramamárias. O trabalho em questão corrobora com estas observações, onde não foram encontradas diferenças estatísticas na produção de espécies reativas de oxigênio, na porcentagem de fagocitose de microrganismos e destruição dos mesmos com a suplementação.

*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Corynebacterium bovis* são classificados como microrganismos contagiosos da mastite, transmitidos primordialmente durante os procedimentos de ordenha (BRAMLEY; DODD, 1984; COSTA et al., 2001; MCDONALD, 1984; RADOSTITS et al., 2002; SANDHOLM; KAARTINEN; PYÖRÄLÄ, 1990; SMITH; TODHUNTER.; SCHONBERGER, 1985). Estes microrganismos necessitam do animal para a sobrevivência, multiplicando-se no interior da glândula mamária, no canal do teto ou sobre a pele e são transmitidos, principalmente, durante a ordenha, sendo bem adaptados ao hospedeiro, minimizando a eficiência da resposta imunológica, o que está de acordo com o resultado encontrado no experimento quanto à porcentagem de fagocitose.

Os microrganismos classificados como ambientais, no caso *Escherichia coli* e *Prototheca zopfii* (BENITES et al., 1999, 2000; COSTA et al., 1996; LANGONI et al., 1992; RADOSTITS et al., 2002; RIBEIRO et al., 2001), são oportunistas, sendo transmitidos do ambiente para o animal principalmente no período entre ordenhas. Portanto, esperavam-se encontrar diferenças nas atividades funcionais dos neutrófilos expostos a estes patógenos comparados aos demais acima referidos, fato não comprovado no presente estudo, onde não foram detectadas diferenças quanto à fagocitose e quanto à destruição intracelular de patógenos.

Quanto à atividade enzimática, também não foram detectadas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais, apesar dos animais do grupo suplementado apresentarem tendência de maior atividade da glutathione peroxidase, da glutathione reductase e da superóxido dismutase e menor atividade da mieloperoxidase. Katamoto et al. (1998) observaram o mesmo em relação à glutathione peroxidase. Reforçando estas observações, Tauler et al. (2002) detectaram maior atividade destas enzimas, inclusive da catalase, em atletas suplementados com vitaminas E, C e  $\beta$ - caroteno. Ndiweni et al.(1991) não encontraram diferenças na atividade da glutathione peroxidase e nas concentrações séricas de vitamina E comparando rebanhos com alta incidência e baixa incidência de mastite. Como a vitamina E reduz o requerimento de selênio inibindo a produção de peróxidos, reduzindo assim a quantidade de glutathione peroxidase necessária à

destruição dos mesmos (McDOWELL,1989), seria esperado encontrar menor atividade desta enzima nos animais suplementados, fato não observado em nenhum dos experimentos.

Ao analisar as correlações entre as enzimas, verificou-se correlação positiva entre glutathione peroxidase e a superóxido dismutase. A superóxido dismutase catalisa a reação que produz peróxido de hidrogênio a partir de superóxido. O peróxido de hidrogênio é reduzido à água com a oxidação da glutathione reduzida, pela glutathione peroxidase (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). A correlação positiva era esperada, devido às reações complementares entre elas.

Entre a mieloperoxidase e a glutathione reductase a correlação foi negativa, resultado também previsível. Quanto maior a atividade da glutathione reductase, maior é a quantidade de glutathione reduzida disponível para ser oxidada pela glutathione peroxidase, através da reação que promove a redução de peróxido de hidrogênio à água, conseqüentemente, menor quantidade de peróxido de hidrogênio disponível à mieloperoxidase.

A concentração sérica de selênio aos trinta dias antes do parto comparada à concentração na semana após o parto diferiu estatisticamente, sendo maior no pós-parto. No pré-parto, comparando-se o grupo controle com o grupo suplementado, detectou-se maior concentração do mineral no grupo suplementado com vitamina E, sendo que após o parto não foram detectadas diferenças estatísticas entre os dois grupos mostrando que a dieta fornecida aos animais possibilitou o aumento e a padronização das concentrações séricas do mineral. Os resultados encontrados nos valores séricos de selênio foram similares aos de Zanetti et al. (1998), antes e depois da suplementação, porém inferiores aos encontrados por Paschoal, Zanetti e Cunha (2003), provavelmente por diferenças nas dietas basais utilizadas nos experimentos. Segundo McDowell et al.(1996) as concentrações séricas abaixo de 0,03-0,04  $\mu\text{g} / \text{ml}$  são críticas para bovinos, sendo que os valores encontrados após o parto foram superiores (0,057 e 0,063  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ), indicando ausência de deficiência.

Diante do discutido, verifica-se grande discordância nos experimentos que avaliaram os efeitos da suplementação com vitamina E. As espécies reativas de oxigênio são essenciais para destruir os microrganismos fagocitados e a vitamina E agindo como antioxidante, protege a célula contra as mesmas, podendo comprometer a eficiência da explosão respiratória (SCHOCK et al., 2004) ou mesmo minimizando a inflamação, como por exemplo, através da inibição da

cicloxygenase (WU; HAYEK; MEYDANI, 2001) e da xantina oxidase (KAHL; ELSASSER, 2004). Portanto, o equilíbrio entre as substâncias antioxidantes, as espécies reativas de oxigênio e a atividade das enzimas envolvidas nas reações em questão, é um processo complexo e dinâmico, sendo mais relevante do que a simples suplementação com um único agente antioxidante.

O presente estudo demonstrou nos ensaios realizados com os neutrófilos *in vitro* o que foi observado por Valle (2000) ao realizar estudo sobre os efeitos da suplementação de vitamina E na ocorrência de mastite, em rebanhos leiteiros de três propriedades localizadas em Minas Gerais.

## 7 CONCLUSÕES

A suplementação com vitamina E, por via oral, nos períodos pré e pós-parto, aumentou a fagocitose de zimosan opsonizado pelos neutrófilos recuperados do leite na primeira semana após o parto de novilhas leiteiras alimentadas basicamente com silagem de milho e concentrados; porém não apresentou efeito na fagocitose de microrganismos causadores de mastite; na produção de espécies reativas de oxigênio; e na atividade das enzimas envolvidas na explosão respiratória e nos processos antioxidantes intracelulares.

As evidências obtidas permitiram concluir que devido à complexidade dos mecanismos envolvidos, a suplementação com um único agente antioxidante, como no caso a vitamina E, nas condições experimentais do presente estudo, não interferiu significativamente nos parâmetros avaliados.

## REFERÊNCIAS

- ABSOLOM, D.R. Basic methods for the study of phagocytosis. **Methods in Enzimology**, London, v.132, p.95-180, 1986.
- ALLISON, R.D.; LAVEN, R.A. Effect of vitamin E supplementation on the health and fertility of dairy cows: a review. **Veterinary Record**, v.147, p.703-708, 2000.
- AZZI, A.; RICCIARELLI, R.; ZINGG, J-M. Non-antioxidant molecular functions of  $\alpha$ -tocoferol (vitamin E). **FEBS Letters**, v.519, p.8-10, 2002.
- BALDASSI, L. et al. Etiologia da mastite subclínica na bacia leiteira de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.58, p.29-36, 1991.
- BALDI, A. et al. Effects of vitamin E and different energy sources on vitamin E status, milk quality and reproduction in transition cows. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, Berlin v.47, p.599-608, 2000.
- BARNOUIN, J.; CHASSAGNE, M. Factors associated with clinical mastitis incidence in French dairy herds during late gestation and early lactation. **Veterinary Research**, Paris, v.29, p.159-171, 1998.
- BARRET, J.J. et al. Concentrations of  $\alpha$ -tocoferol after intramammary infusion of *Escherichia coli* or lipopolysaccharide. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.80, n.11, p.2826-2832, 1997.
- BATRA, T.R.; HIDIROGLOU, M.; SMITH, M.W. Effect of vitamin E on incidence of mastitis in dairy cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, v.72, n.2, p.287-297, 1992.
- BEERS, R.F.; SIZER, J.W. A spectrophotometric method of measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **Journal of Biological Chemistry**, v.195, p.133-140, 1952.
- BENITES, N.R. et al. Estudo de microscopia eletrônica de *Prototheca zopfii* e avaliação histopatológica de glândulas mamárias por ela infectadas. **Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, São Paulo, v.2, n.1, p.22-26, 1999.



\_\_\_\_\_. Avaliação do *status* microbiológico de diferentes estruturas de glândulas mamárias de vacas leiteiras abatidas. **Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, São Paulo, v.3, n.3, p.10-13, 2000.

\_\_\_\_\_. Etiologia e histopatologia de mastites bovinas de ocorrência espontânea. **Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, São Paulo, v.4, n.1, p.3-8, 2001.

BEUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase; Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.195, p.133-140, 1971.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRAMLEY, A.J.; DODD, F.H. Reviews of the progress of dairy science: mastitis control progress and prospects. **Journal Dairy Research**, v.51, p.481-512, 1984.

CAMARGO, Z.P.; FISCHMAN, O. Use of morphophysiological characteristics for differentiation of the species of *Prototheca*. **Sabouraudia**, v.17, p.275-278, 1979.

CAPUCO, A.V.; PAAPE, M.J.; NICKERSON, S.C. In vitro study of polymorphonuclear leukocyte damage to mammary tissues of lactating cows. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.47, n.3, p.663-668, 1986.

CARLBERG, I.; MANNERVICK, B. Glutathione reductase. **Methods in Enzymology**, London, v.113, p.484-490, 1985.

COSTA, E.O. Importância da mastite na produção leiteira do país. **Revista Educação Continuada**, São Paulo, v.1, p.3-9, 1998.

COSTA, E.O. et al. Etiologia bacteriana da mastite bovina no Estado de São Paulo. **Revista de Microbiologia**, v.17, p.107-112, 1986.

\_\_\_\_\_. Survey on the etiology of intramammary infections in dairy cattle. In: CONGRESSO MUNDIAL DE BUIATRIA, 18., 1994a, Bolonha. **Proceedings...** p.853-855.

\_\_\_\_\_. Mastite bovina: índices de mastite clínica e subclínica. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 14., 1994b, Acapulco. **Anais...** p.45.

\_\_\_\_\_. Índices de mastite bovina clínica e subclínica nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.17, n.5, p.215-217, 1995a.

\_\_\_\_\_. Estudo etiológico da mastite clínica bovina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.17, n.4, p.156-158, 1995b.

\_\_\_\_\_. An increased incidence of mastitis caused by *Prototheca* species and *Nocardia* species on a farm in São Paulo, Brazil. **Veterinary Research Communications**, v.20, p.237-241, 1996.

\_\_\_\_\_. Influência da suplementação de selênio na incidência de mastite. **Revista brasileira de Medicina Veterinária**, v.19, p.169-172, 1997.

\_\_\_\_\_. Mastite subclínica: prejuízos causados e os custos de prevenção em propriedades leiteiras. **Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, São Paulo, v.2, n.2, p.16-20, 1999.

\_\_\_\_\_. Estudo da etiologia das mastites bovinas nas sete principais bacias leiteiras do Estado de São Paulo. **Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, São Paulo, v.3, n.2, p.6-13, 2000.

\_\_\_\_\_. Proporção de ocorrência de mastite clínica em relação à subclínica correlacionada aos principais agentes etiológicos. **Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, São Paulo, v.4, n.3, p.10-13, 2001.

COTRAN, R.S. et al. Environmental and nutrition diseases. In: \_\_\_\_\_. **Robbins: pathologic basis of disease**. 5.ed. London: WB Saunders Company, 1994. p.379-430.

DULIN, A.M.; PAAPE, M.J.; NICKERSON, S.C. Comparison of phagocytosis and chemiluminescence by blood and mamary gland neutrophils from multiparous and nuliparous cows. **American Journal Veterinary Research**, v.49, n.2, p.172-177, 1988.

EBERHART, R.J. Management of dry cows to reduce mastitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.69, p.1721-1732, 1986.

\_\_\_\_\_. New infection in the dry period. In: ANNUAL MEETING NATIONAL MASTITES COUNCIL, 21., 1992, Louisville. p.15-18.

ERSKINE, R.J et al. Blood selenium concentrations and glutathione peroxidase activities in dairy herds with high and low cell counts. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.190, p.1417-1421, 1987.

\_\_\_\_\_. Effects of parenteral administration of vitamin E on health of periparturient dairy cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.211, n.4, p.466-469, 1997.

FRIDOVICH, I. Superoxide anion ( $O_2^-$ ), superoxide dismutases and related matters. **Journal Biological and Chemistry**, v.272, p.18515-18517, 1997.

GERLOFF, B.J. Effect of selenium supplementation on dairy cattle. **Journal Animal Science**, v.70, p.3934-3940, 1992.

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

GRAPHPAD Instat. São Paulo. Universidade de São Paulo. 1990-1993. Software empregado para análise estatística.

GRASSO, P.J. et al. Phagocytosis, bactericidal activity, and oxidative metabolism of milk neutrophils from dairy cows fed selenium-supplemented and selenium-deficient diets. **American Journal of Veterinary Research**, v.51, n.2, p.269-274, 1990.

GRUMMER, R.R. NRC 2001 de gado de leite: o que há de novo?. In: NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 5., 2001, Uberlândia. **Anais...** p.19-24.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3.ed. New York: Oxford University Press Inc., 1999. 936p.

HEMINGWAY, R.G. The influences of dietary selenium and vitamin E intakes on milk somatic cell counts and mastitis in cows. **Veterinary Research Communications**, Netherlands, v.23, p.481-499, 1999.

HILLEGASS, L.M. et al. Assessment of mieloperoxidase activity in whole rat kidney. **Journal Pharmacology Methods**, v.24, p.285-295, 1990.

HOGAN, J.S.; WEISS, W.P.; SMITH, K.L. Role of vitamin E and selenium in host defense against mastitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.76, n.9, p.2795-2803, 1993.

HOGAN, J.S. et al. Bovine neutrophil responses to parenteral vitamin E. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.75, p.399-405, 1992.

\_\_\_\_\_. Relationships among vitamin E, selenium, and bovine blood neutrophils. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.73, p.2372-2378, 1990.

\_\_\_\_\_. Vitamin E as an adjuvant in an *Escherichia coli* J5 vaccine. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, n. 2, p. 401-407, 1993.

\_\_\_\_\_.  $\alpha$ -Tocoferol concentrations in milk and plasma during clinical *Escherichia coli* mastitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.79, n.1, p.71-75, 1996.

JUKOLA, E. et al. Blood selenium, vitamin E, vitamin A, and  $\beta$ -carotene concentrations and udder health, fertility treatments, and fertility. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.79, n.5, p.838-845, 1996.

KAHL, S.; ELSASSER, T.H. Endotoxin challenge increases xanthine oxidase activity in cattle: effect of growth hormone and vitamin E treatment. **Domestic Animal Endocrinology**, v.26, p.315-328, 2004.

KATAMOTO, H. et al. Nitroblue tetrazolium reduction of neutrophils in heat stressed goats is not influenced by selenium and vitamin E injection. **Journal of Veterinary Medical Science**, Sakai, v.60, n.11, p.1243-1249, 1998.

KRIEG, N.R.; HOLT, J.C. **Bergey's manual of sistematic bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1994. 2298 p.

LANGONI, H. et al. Aspectos etiológicos na mastite bovina: flora bacteriana aeróbica. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.20, p.204-209, 1998.

\_\_\_\_\_. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bovina subclínica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.43, p.507-515, 1991.

\_\_\_\_\_. *Prototheca zopfii* e mastite bovina: clínica e terapêutica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 22., 1992, Curitiba. **Anais...** Curitiba: 1992. p.125.

LEBLANC, J.S. et al. The effect of prepartum injection of vitamin E on health in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.85, p.1416-1426, 2002.

LOPES, S.T.A. et al. Atividade funcional neutrofílica em cabras com mastite induzida experimental por *Staphylococcus aureus* e suplementadas com vitamina E (acetate DL- $\alpha$ -tocopherol). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.55, n.5, p.515-521, 2003.

MALLARD, B. A. et al. Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.81, p.585-595, 1998.

MARKERT, M.; ANDREWS, P.C.; BABIOR, B.M. Measurement of  $O_2^-$  production by human neutrophils. The preparation and assay of NADPH oxidase- containing particles from human neutrophils. **Methods and enzymology**, London, v.105, p.358-365, 1984.

McDONALD, J.S. Streptococcal and staphylococcal mastitis. **Veterinary Clinical North American: large animal practice**, v.6, p.269-285, 1984.

McDOWELL, L.R. Vitamina E. In: \_\_\_\_\_. **Vitamins in animal nutrition**. San Diego: Academic Press, 1989. cap.4, p.93-131.

McDOWELL, L.R. et al. Vitamin E supplementation for the ruminant. **Animal Feed Science Technology**, v.60, p.273-296, 1996.

MEGLIA, G.E. et al. Changes in some blood micronutrients, leukocytes and neutrophil expression of adhesion molecules in periparturient dairy cows. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.42, n.1, p.139-150, 2001.

MELVILLE, P.A. **Estudos sobre algas do gênero *Prototheca* isoladas do leite e de infecções intramamárias em bovinos leiteiros.** 1995. 94 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

MICHIELS, C. et al. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v.17, p.235-248, 1994.

MILLER, G.Y. et al. Factors affecting serum selenium and vitamin E concentrations in dairy cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.206, n.9, p.1369-1373, 1995.

MILLER, J.K.; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E.; MADSEN, F.C. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.76, n.9, p.2812-2823, 1993.

MURRAY, P.R. et al. **Manual of clinical microbiology.** 7.ed. Washington: American Society for Microbiology, 1999. 1773p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle.** 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1989. 157 p.

\_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. 7.ed. Washington: National Academy of Sciences, 2001. 598p.

\_\_\_\_\_. **Vitamin tolerance of animals.** Washington: National Academy Press, 1987. p.23-30.

NADER FILHO, A. et al. Prevalência e etiologia da mastite bovina na região de Ribeirão Preto, São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.5, p.53-56, 1985.

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

NDIWENI, N. et al. Studies of incidence of clinical mastitis and blood levels of vitamin E and selenium in dairy herds in England. **Veterinary Record**, London, v.129, p.86-89, 1991.

NICKERSON, S.C. Immunological aspects of mammary involution. **Journal of Dairy Science**, v.72, p.1665-1678, 1989.

NJERU, C.A. et al. Assessment of vitamin E nutritional status in sheep. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.72, p.3207-3212, 1994.

\_\_\_\_\_. Assessment of vitamin E nutritional status in yearling beef heifers. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.73, p.1440-1448, 1995.

NOCKELS, C.F Antioxidants improve cattle immunity following stress. **Animal Feed Science and Technology**, v.62, n.1, p.59-68, 1996.

OLSON, O.E.; PALMER, I.S.; CARY, E.E. Modification of de oficial fluometric method for selenium in plants. **Journal AOAC**, v.58, p.117-121, 1975.

PAES, P.R.O. et al. Efeitos da administração de vitamina E na infecção mamária e na contagem de células somáticas de cabras primíparas desafiadas experimentalmente com *Staphylococcus aureus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.1, p.15-20, 2003.

PAGLIA, D.E.; VALENTINE, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.276, p.368-374, 1967.

PANKEY, J.M.; DRECHSLER, P.A. Evolution of udder higiene: premilking teat sanitation. **Veterinary Clinical North American**, v.9, p.519-530, 1993.

PASCHOAL, J.J. **Efeito da suplementação de selênio e vitamina E sobre a incidência de mastite em vacas Holandesas**. 2002. 61 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2002.

PASCHOAL, J.J; ZANETTI, M.A.; CUNHA, J.A. Efeito da suplementação de selênio e vitamina E sobre a incidência de mastite clínica em vacas da raça holandesa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.3, p.249-255, 2003.

PEAKMAN, M.; VERGANI, D. **Imunologia básica e clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 327p.

PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **Journal Immunology Methods**, v.46, p.211-226, 1981.

POLITIS, I. et al. Effects of vitamin E on immune function of dairy cows. **American Journal Veterinary Research**, v.56, n.2, p.179-184, 1995.

\_\_\_\_\_. Effects of vitamina E on mammary and blood leukocyte function, with emphasis on chemotaxis, in periparturient dairy cows. **Animal Journal of Veterinary Research**, v.57, n.4, p.468-471, 1996.

PORE, R.S. *Prototheca* taxonomy. **Mycopathologia**, v.90, p.129-139, 1985.

RADOSTITS, O.M. et al. **Clínica veterinária: um tratado de doenças de bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737p.

RIBEIRO, A.R. et al. Influência da sazonalidade na ocorrência de mastite bovina por microrganismos ambientais. **Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, São Paulo, v.4, n.4, p.10-14, 2001.

ROCKSÉN, D. et al. Vitamin E reduces transendothelial migration of neutrophils and prevents lung injury in endotoxin-induced airway inflammation. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v.28, p.199-207, 2003.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 5.ed. São Paulo: Manole, 1999. 423p.

SANDHOLM, M.; KAARTINEN, L.; PYÖRÄLÄ, S. Bovine mastitis -why does antibiotic therapy not always work? an overview. **Journal Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.13, p.248-260, 1990.

SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.O. Experimental and observations leading to developing of California mastitis test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.139, p.199-204, 1957.

SCHOCK, B.C. et al. Enhanced inflammatory responses in  $\alpha$ -tocopherol transfer protein null mice. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.423, p.162-169, 2004.



SCHUKKEN, Y.H. et al. Experimental *Staphylococcus aureus* intramammary challenge in late lactation dairy cows: quarter and cow effects determining the probability of infection. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.82, p.2393-2401, 1999.

SHEPHERD, H. Milking machine testing and mastitis. In: WORLD BUIATRICS MASTITIS WORKSHOP & SEMINARS, 19., 1996, Edinburgh. **Proceedings...** p.16-18.

SMITH, K.L.; TODHUNTER, P.A.; SCHONBERGER, P.S. Environmental pathogens and intramammary infections during the dry period. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.68, p.402-404, 1985.

SMITH, L.K.; HOGAN, J.S.; WEISS, W.P. Dietary vitamin E and selenium affect mastitis and milk quality. **Journal of Animal Science**, v.75, p.1659-1665, 1997.

SMITH, L.K. et al. Effect of vitamin E and selenium supplementation on incidence of clinical mastitis and duration of clinical symptoms. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.67, n.6, p.1293-1300, 1984.

SORDILLO, L.M.; NICKERSON, S.C. Morphologic changes in the bovine mammary gland during involution and lactogenesis. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.49, n.7, p.1112-1120, 1988.

SORDILLO, L.M.; NICKERSON, S.C.; AKERS, R.M. Pathology of *Staphylococcus aureus* mastitis during lactogenesis: relationships with bovine mammary structure and function. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.72, n.1, p.228-240, 1989.

SORDILLO, L.M.; SHAFER-WEAVER, K.; DeROSA, D. Immunobiology of the mammary gland. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.80, n.8, p.1851-1865, 1997.

TAULER, P. et al. Diet supplementation with vitamin E, vitamin C and  $\beta$ -caroteno cocktail enhances basal neutrophil antioxidant enzymes in athletes. **Archive European Journal of Physiology**, v.443, p.791-797, 2002.

THIERS, F.O. **Análise do conteúdo de células somáticas de amostras de leite de bovinos leiteiros em diferentes fases da lactação e do tanque de expansão de propriedades produtoras de leite do Estado de São Paulo e Minas Gerais.** 1999. 129 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

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

VALLE, C.R. **Influência da suplementação de vitamina E nos períodos pré e pós-parto na ocorrência de mastite**. 2000. 76 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2000.

VALLE, C.R. et al. Avaliação da administração oral de vitamina E durante o final do período seco e início de lactação sobre a ocorrência de mastite. **Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, São Paulo, v.3, n.2, p.9-14, 2000a.

\_\_\_\_\_. The influence of vitamin E supplementation on the incidence of bovine mastitis during the pre and post parturition period. In: SYMPOSIUM ON IMMUNOLOGY OF RUMINANT MAMMARY GLAND, 2000b, Stressa. **Proceedings...**

VAN SAUN, R.J. Rational approach to selenium supplementation essencial. **Feedstuffs**, v.62, n.3, p.15-17, 1990.

WATTS, J.L. Etiological agents of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.16, p.41-59, 1988.

WEBER, L.; PETERHANS, E.; WYLER, R. The chemiluminescent response of bovine polymorphonuclear leucocytes isolated from milk and blood. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.4, p.397-412, 1983.

WEISS, M.P. Vitamin requirements for dairy cow. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.81, p.2493-2501, 1998.

WEISS, W.P. et al. Effect of duration of supplementation of selenium and vitamin E on periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.73, n.11, p.3187-3194, 1990.

\_\_\_\_\_. Effect of vitamin E in diets with a low concentration of selenium on mammary gland health of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.80, n.8, p.1728-1737, 1997.

WU, D.; HAYEK, M.G.; MEYDANI, S.N. Vitamin E and macrophage cyclooxygenase regulation in the aged. **Journal of Nutrition**, v.131, p.382S-388S, 2001.

ZANETTI, M.A. et al. Efeitos da suplementação de selênio e vitamina E em bovinos leiteiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.27, n.2, p.405-408, 1998./