

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CAMPUS DE BOTUCATU

**IMPACTOS DOS PRINCIPAIS ASPECTOS DO PERÍODO
DE TRANSIÇÃO SOBRE A PRODUÇÃO DE LEITE E
RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE VACAS LEITEIRAS**

ALICE POGGI BRANDÃO

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós Graduação em Zootecnia como parte
das exigências para obtenção do título de
Mestre.

BOTUCATU – SP

Dezembro – 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CAMPUS DE BOTUCATU

**IMPACTOS DOS PRINCIPAIS ASPECTOS DO PERÍODO
DE TRANSIÇÃO SOBRE A PRODUÇÃO DE LEITE E
RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE VACAS LEITEIRAS**

ALICE POGGI BRANDÃO

Médica Veterinária

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Fernandes Cooke

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós Graduação em Zootecnia como parte
das exigências para obtenção do título de
Mestre.

BOTUCATU – SP

Dezembro – 2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Brandão, Alice Poggi.

Impactos dos principais aspectos do período de transição sobre a produção de leite e a resposta inflamatória de vacas leiteiras / Alice Poggi Brandão. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Reinaldo Fernandes Cooke

Capes: 50405004

1. Leite - Produção. 2. Bovino de leite. 3. Resposta imune. 4. Inflamação - Aspectos imunológicos.

Palavras-chave: Inflamação; Omnigen-AF; Período de transição; Produção de leite.

Aos meus pais, Fernando e Lucilene, e à minha irmã Letícia, por sempre terem sido meu porto seguro.

Ao meu companheiro e namorado Tiago, por ter ficado ao meu lado de todas as formas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que está sempre à frente das minhas conquistas.

Ao Professor e Orientador Reinaldo Fernandes Cooke, pelos seus ensinamentos, por toda a sua ajuda, pelos conselhos, pela confiança que tornou este trabalho possível e pelas oportunidades únicas que me concedeu.

À toda minha família, em especial aos meus pais, Fernando e Lucilene, pelo apoio, pelos exemplos de trabalho e dedicação que sempre foram dentro de casa e por todo incentivo ao estudo que sempre recebi; à minha irmã Letícia, minha eterna companheira e amiga, sempre me trazendo alegrias e bons conselhos; e ao meu avô Gentil Poggi, pelos primeiros ensinamentos de amor ao campo e aos animais.

Ao meu grande parceiro Tiago Leiva, cuja ajuda, em todos os aspectos, foi indispensável para este projeto; por todo seu companheirismo e cumplicidade independente das circunstâncias.

Ao Professor Zequinha (José Luiz Moraes Vasconcelos), que me abriu as primeiras portas e com quem sempre pude contar desde o período da graduação, pelo seu exemplo de dedicação e comprometimento e especialmente pelos bons conselhos.

Ao Desidério, pelo trabalho exemplar realizado dentro do Setor de Bovinocultura de Leite, por estar pronto a ajudar em qualquer situação, pelo seu interesse em melhorar tudo que fosse possível, pelos aprendizados compartilhados e acima de tudo, pela sua amizade.

À toda a comunidade da Fazenda Lageado, pessoas generosas e cheias de bondade perto das quais me senti acolhida.

A todos os alunos e estagiários que se envolveram de alguma maneira neste trabalho, pessoas pelas quais guardo um enorme carinho e admiração, pela paciência, pela notável boa vontade e em quem muitas vezes encontrei a força para seguir em frente. Sem eles este trabalho não teria sido possível, meus votos sinceros e confiantes de sucesso profissional a todos que auxiliaram dentro do Setor de Bovinocultura de Leite.

À Conapec Jr, por todo seu apoio, pela coragem e determinação das pessoas que fazem parte deste grupo.

A todos os colegas da pós-graduação, pela convivência e pelos aprendizados compartilhados.

À FMVZ, por sua excelência da qual, nós, alunos, sempre pudemos usufruir.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo nº 2015/05536-1) pelo apoio financeiro, em forma de bolsa, concedido durante a execução deste projeto.

Ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia, a todos seus funcionários e professores pela boa vontade em servir, ajudar e ensinar sempre que necessário.

À República Luz Vermelha, que será sempre meu lar e minha família em Botucatu e de onde guardo as melhores amizades e lembranças.

Aos meninos da República Karca Um Gole, que se tornaram grandes amigos e com quem pude sempre contar.

Aos amigos e colegas de pós-graduação Kelsey Schubach, Luiz Gustavo Teodoro, e Rodrigo Marques pela convivência, por toda a ajuda, pela amizade e pelos bons momentos compartilhados. Ao Rodrigo em especial pela sua generosidade e paciência ao ensinar e pelos seus sempre bons conselhos.

À Flávia Cooke, por todos os ensinamentos, pela sua prontidão em ajudar e aconselhar e pela sua enorme hospitalidade.

Aos funcionários da EOARC-Burns Skip, Tony e Lyle, pelo companheirismo no trabalho, por toda a consideração e pelos aprendizados.

Ao Professor Ronaldo Cerri, ao Davi Araújo, ao Eraldo Drago e ao Augusto Madureira, por terem tido em comum a prontidão e a generosidade ao auxiliar este projeto.

Minha imensa e sincera gratidão!

*“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível e de repente você estará
fazendo o impossível.”*

—São Francisco de Assis

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	1
CAPÍTULO I.....	4
REVISÃO DE LITERATURA.....	5
1. PERÍODO DE TRANSIÇÃO.....	5
2. BALANÇO ENERGÉTICO NEGATIVO.....	6
2.1.Ácidos Graxos Não-Esterificados (AGNE).....	7
2.2.Glicose e Insulina.....	10
3. EIXO SOMATOTRÓPICO.....	12
3.1.Fator de Crescimento semelhante à Insulina tipo 1.....	14
4. SISTEMA IMUNE.....	16
4.1.Resposta de Fase Aguda (RFA).....	18
4.1.1. Haptoglobina (Hp).....	22
4.1.2. Desafio com LPS.....	24
4.2. Imunossupressão e o Periparto de Vacas Leiteiras.....	25
5. ESTRESSE.....	28
6. ENDOMETRITE.....	30
7. OMNIGEN-AF.....	31
CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
CAPÍTULO II.....	64
SUPLEMENTAÇÃO DE OMNIGEN-AF® PARA VACAS LEITEIRAS EM PERÍODO DE TRANSIÇÃO E INÍCIO DE LACTAÇÃO: IMPACTOS FISIOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS	
RESUMO.....	65
OMNIGEN-AF® SUPPLEMENTATION FOR TRANSITION AND EARLY LACTATION DAIRY COWS: PHYSIOLOGIC AND IMMUNOLOGIC IMPACTS	
ABSTRACT.....	67
1. INTRODUÇÃO.....	69

2. MATERIAL E MÉTODOS.....	70
2.1. Animais e Dietas.....	70
2.2. Amostragem.....	72
2.2.1. Pré-parto.....	73
2.2.2. Pós-parto.....	73
2.3. Endometrite.....	74
2.4. Desafio com LPS.....	74
2.5. Análises Laboratoriais.....	75
2.5.1. Glicose.....	76
2.5.2. AGNE.....	76
2.5.3. Haptoglobina.....	76
2.5.4. TNF- α	77
2.5.5. Cortisol, Insulina e IGF-1.....	77
2.6. Análise Estatística.....	77
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	78
3.1. Balanço Energético e Status Nutricional.....	79
3.2. Produção e Constituintes do Leite.....	80
3.3. Estresse e Resposta de Fase Aguda.....	82
3.4. Endometrite.....	83
3.5. Desafio com LPS.....	86
3.5.1. Temperatura Vaginal durante o Desafio com LPS.....	88
4. CONCLUSÃO.....	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH – Hormônio Adrenocorticotrófico

AGNE – Ácidos Graxos Não-Esterificados

AGCC – Ácidos Graxos de Cadeia Curta

AGL – Ácidos Graxos Livres

ATP – Adenosina Trifosfato

BEN – Balanço Energético Negativo

BHBA – β -hidroxibutirato

CCS – Contagem de Células Somáticas

CNF – Carboidratos Não-Fibrosos

CRH – Hormônio Liberador de Corticotrofina

CV – Coeficiente de Variação

DAMP – Padrões Moleculares Associados a Danos teciduais

DEL – Dias Em Leite

ECC – Escore de Condição Corporal

EL_L – Energia Líquida de Lactação

EL_M – Energia Líquida de Manutenção

EM – Energia Metabolizável

EPM – Erro Padrão Médio

FDN – Fibra solúvel em Detergente Neutro

GH – Hormônio do Crescimento

GHR-1A – Receptor de Hormônio do Crescimento no Fígado

HHA – Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

Hb – Hemoglobina

Hp – Haptoglobina

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IFN- γ – Interferon-gama

IGF-1 – Fator de Crescimento insulina-símile tipo 1

IL-1 – Interleucina-1

IL-6 – Interleucina-6

IL-10 – Interleucina-10

ITU – Índice de Temperatura e Umidade

LPS – Lipopolissacarídeo

mRNA – RNA mensageiro

MS – Matéria Seca

NRC – Nutritional Research Council

PAMP – Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PC – Peso Corporal

PMN – Polimorfonucleados

OMN – Omnigen-AF®

TG – Triacilglicerol

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

VLDL – Lipoproteína de Muito Baixa Densidade

VP – Vasopressina

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1.....100

Peso Corporal e Escore de Condição Corporal de vacas leiteiras suplementadas com Omnigen-AF (**OMN**; n = 19) ou não (**CON**; n = 19) antes e 46 dias após o parto.

Tabela 2.....101

Composição e perfil nutricional do concentrado oferecido às vacas leiteiras durante o pré-parto e início da lactação.

Tabela 3.....102

Perfil nutricional da silagem de milho oferecida às vacas leiteiras durante o pré-parto e início da lactação.

Tabela 4.....103

Dados de PC, ECC, número de parições, produção de leite e produção de leite corrigida para sólidos totais a 12% das vacas dos grupos **OMN** (n = 9) e **CON** (n = 9) selecionadas para realização do desafio com LPS no d46.

Tabela 5.....104

Parâmetros séricos de vacas leiteiras suplementas (**OMN**; n = 19) ou não (**CON**; n = 19) com Omnigen-AF® antes e 46 dias após o parto.

Tabela 6.....105

Parâmetros de produção de leite de vacas leiteiras suplementadas (**OMN**; n = 19) ou não (**CON**; n = 19) com Omnigen-AF® antes e 46 dias após o parto.

Tabela 7.....106

Produção média diária de leite dos 14 aos 46 DEL de vacas leiteiras suplementadas (**OMN** = 19) ou não (**CON** = 19) com Omnigen-AF® durante o pré e pós-parto

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

FIGURAS.....107

Figura 1.....108

Peso Corporal, ECC de vacas leiteiras suplementadas ou não com Omnigen-AF® (n = 38) durante o pré-parto e até 46 dias pós-parto. Efeito de dia ($< 0,01$) foi detectado para os dois parâmetros.

Figura 2.....110

Concentrações plasmáticas de AGNE, glicose e IGF-1 de vacas leiteiras suplementadas ou não com Omnigen-AF® (n = 38) durante o pré-parto e até 46 dias pós-parto. Efeito de dia ($< 0,01$) foi detectado para todos os parâmetros.

Figura 3.....111

Concentrações plasmáticas de cortisol e haptoglobina de vacas leiteiras suplementadas ou não com Omnigen-AF® (n = 38) durante o pré-parto e até 46 dias pós-parto. Efeito de dia ($< 0,01$) foi detectado para os dois parâmetros.

Figura 4.112

Produção de leite de vacas leiteiras suplementadas (OMN; n = 19) ou não (CON; n = 19) com Omnigen-AF® antes e 46 dias após o parto. Barras de erro representam EPM. Efeito de tratamento foi detectado ($P = 0,02$), e a interação tratamento x dia não foi detectada ($P = 0,99$). Em cada dia, * = $P \leq 0,05$ e † = $P \leq 0,10$.

Figura 5.....113

Produção de leite de vacas leiteiras suplementadas (OMN; n = 19) ou não (CON; n = 19) com Omnigen-AF® antes e 46 dias após o parto, e classificadas de acordo com a porcentagem de células polimorfonucleadas (PMN; $\geq 6\%$ or $< 6\%$; critério para endometrite citológica) numa contagem de 100 células (PMN + células endometriais) de amostras de endométrio coletadas por meio da técnica do *cytobrush* nos d30 e d46 da lactação (de acordo Dubuc et al., 2010). Barras de erro representam EPM. Uma interação tratamento $\times$ grupo PMN $\times$ dia foi detectada ($P = 0,04$). Em cada dia, vacas do grupo CON + PMN $\geq 6\%$ menor produção de leite quando comparadas a qualquer combinação dos demais grupos apresentaram (* = $P \leq 0,05$; † = $P \leq 0,10$).

Figura 6.....114

Concentrações plasmáticas de Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) e haptoglobina e temperatura vaginal em vacas leiteiras suplementadas (OMN; n = 9) ou não (CON; n = 9) com

Omnigen-AF® e que receberam infusão intravenosa de LPS (0,25 µg/kg de PC de lipopolissacarídeo bacteriano –*Escherichia coli* 0111:B4, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) no momento 0 h. Barras de erro representam EPM. Efeito de tempo foi detectado ($P < 0,01$) para todos os parâmetros. Interação tratamento x hora foi detectada para TNF- α plasmático ($P = 0,03$), e efeito de tratamento foi detectado para haptoglobina plasmática ($P = 0,04$), mas não para temperatura vaginal ($P = 0,50$). Em cada hora * = $P \leq 0,05$; † = $P \leq 0,10$.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O Brasil é reconhecido internacionalmente pelo seu grande potencial agropecuário, o que inclui a bovinocultura de leite. Segundo o IBGE, de 2010 a 2015 a produção leiteira do Brasil foi de aproximadamente 23 bilhões de litros de leite cru recolhidos por laticínios anualmente. Viela et al. (2002) constataram que a produção de leite no Brasil passou de cerca de 8 bilhões em 1975 para mais de 20 bilhões em 2001. Segundo esse estudo, a maior produtividade das vacas teve papel mais significativo no aumento da produção do que o aumento no número de animais do rebanho nacional.

Ter uma produção maior por vaca significa ter animais mais eficientes, mas segundo diversos autores (Erb et al., 1985; Deluyker et al., 1991; Rajala-Schultz et al., 1999; Ingvarsen e Moyes, 2015) esta maior produção por vaca está também associada com maior ocorrência de problemas de saúde nos animais, que traz prejuízos aos produtores. Goff et al. (2006) também constataram que, apesar dos avanços na nutrição, manejo e alternativas para a saúde de vacas leiteiras, houve pouca diminuição das doenças mais incidentes (mastite, laminite, retenção de placenta, febre do leite, deslocamento de abomaso) nos últimos 25 anos. Desta forma evidencia-se que a saúde de vacas leiteiras ainda é um tópico que requer estudos.

Considerando um ciclo de lactação completo, os maiores desafios metabólicos e imunológicos encontram-se, sem dúvidas, compreendidos no período periparturiente, ou de transição (Wathes et al., 2009; LeBlanc, 2010; Sordillo e Raphael, 2013). Estudos aprofundados sobre este período tornaram-se mais frequentes durante a década de 1990, quando por meio de revisões relevantes (Grummer, 1993; Bell, 1995; Grant e Albright, 1995; Grummer, 1995; Goff e Horst, 1997; Drackley, 1999) conceitos da fisiologia da vaca periparturiente foram estabelecidos. Esses estudos também começaram a

demonstrar a necessidade de mais pesquisas na área, dentro da qual ainda havia muitas perguntas sem resposta.

No NRC de 1989, por exemplo, o período pré-parto (*close-up*) é colocado nutricionalmente na mesma categoria de vacas secas (*far-off*). Considerando as diferenças atualmente conhecidas entre esses dois períodos (na ingestão e mobilização de nutrientes – principalmente cálcio e lipídios) sabe-se que oferecer a mesma dieta, dependendo de como ela for formulada, às vacas pós-secagem e a animais pré-parto pode ser prejudicial para a lactação seguinte.

Por ser um período de alto desafio, influenciado por inúmeras variáveis – em especial os agentes estressores, como: estresse térmico, umidade, instalações precárias, mudança excessiva de animais no lote, dieta mal balanceada (Herdt, 2000; Hayirli et al., 2002) – e ao mesmo tempo estar intimamente ligado com a produção e rentabilidade dos animais tornou-se também cada vez mais um tópico recorrente em trabalhos científicos da área. O campo para pesquisa sobre vacas leiteiras durante o período de transição é vasto, visto as divergências entre opiniões, abordagens e estratégias, que são relatadas por Grummer (2016a). Na formulação de dietas, por exemplo, há vertentes de estudiosos e técnicos que defendem uma restrição energética durante todo o período seco, incluindo o pré-parto a fim de evitar ganho de peso e transtornos metabólicos (cetose e fígado gorduroso) decorrentes da lipólise excessiva reportada em vacas obesas (Grum et al., 1996; Dann et al., 2006). Porém, foi relatado que a restrição alimentar, embora tenha realmente o efeito positivo de atenuar a lipólise pós-parto, reduz também a produção de leite (Grum et al., 1996; Dann et al., 2006; Silva-del-Rio et al., 2010), e principalmente o conteúdo de gordura deste leite (Grum, 1996; Dann 2006; Richards, 2011), diminuindo, portanto, o valor agregado do produto final e os lucros da atividade, o que torna questionável sua utilização como estratégia de manejo.

Desta forma, mesmo mais de 20 anos após o início das investigações sobre o período de transição de vacas leiteiras, são necessários novos estudos que avaliem não apenas o metabolismo, mas também possibilidades para melhor adaptação aos desafios do parto e início da lactação.

Frente à problemática descrita, este trabalho foi desenvolvido em dois capítulos. No CAPÍTULO I, apresentado como uma Revisão de Literatura, o objetivo é discorrer sobre conceitos da fisiologia e metabolismo da vaca leiteira durante o período de transição. Isto dá suporte ao CAPÍTULO II, o qual expõe, na forma de artigo científico, o experimento realizado como parte desta dissertação, cujo principal objetivo foi avaliar os efeitos sobre produção, metabolismo e resposta inflamatória de um suplemento nutricional (*Omnigen-AF*®) para vacas leiteiras durante o período de transição.

,

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

1. PERÍODO DE TRANSIÇÃO

A definição de período de transição como as três semanas anteriores e posteriores ao parto foi sugerida por Grummer (1995), reutilizada por Drackley (1999) e então passou a ser adotada em diversos trabalhos. Assim, “período de transição” se tornou, atualmente, sinônimo de periparto.

A razão para a determinação do período não está elucidada no trabalho, mas demonstrou-se que a partir de 21 dias antes do parto inicia-se a queda gradual na ingestão de matéria seca, que atinge seu pico na última de gestação. Esta queda de ingestão varia, mas é comum que ela seja de aproximadamente 30% entre vacas adultas e novilhas (Grummer, 1995). Foi determinado também que a colostrogênese de vacas leiteiras inicia-se em média três semanas antes da parição (Guy et al., 1994) e a produção do colostro tem papel relevante na utilização de nutrientes, devido a sua elevada concentração de proteínas, gordura e minerais (Tsioulpas et al., 2007).

Drackley (1999) colocou-se de acordo com Grummer (1995) e afirmou que o período de 43 dias acerca do parto seria adequadamente delimitado, pois é nesse curto espaço de tempo em que ocorre a maioria dos problemas de saúde relatados em fazendas leiteiras, sejam eles distúrbios metabólicos ou doenças infecciosas.

Por convenção adotou-se como período de transição as três semanas que precedem e mais as três semanas que sucedem o parto. Na prática, e em situações experimentais, isto varia devido à data estipulada para o parto ser aproximada.

Desde as primeiras abordagens científicas, no início da década de 90, o estudo do período de transição intensificou-se, tornando-se mais frequente com o passar do tempo e com o surgimento de novas tecnologias. É uma área de pesquisa em expansão e promissora, não apenas para o maior entendimento da fisiologia da vaca leiteira, mas

também para melhoria dos sistemas de pecuária de leite. Desta forma, o objetivo desta revisão é abordar pontos cruciais para a compreensão do metabolismo da vaca periparturiente.

2. BALANÇO ENERGÉTICO NEGATIVO (BEN)

Uma das características mais marcantes do período de transição, e que mais impacta a fisiologia e o desempenho de vacas leiteiras, é o *Balanço Energético Negativo* (BEN). Trata-se de um *déficit* energético, ou seja, a demanda de energia é maior do que sua disponibilidade. Durante o pré-parto a ingestão de matéria seca é reduzida, tem início a colostrogênese e o feto e a placenta continuam em crescimento, que aumentam as necessidades energéticas, proteicas e minerais do animal (Guy et al., 1994; Drackley, 1999; Hayirli et al., 2002; Adewuyi et al., 2005).

O BEN se manifesta com intensidade no início da lactação (McNamara, 1991; Contreras et al., 2010). Neste período há acentuada perda de PC e de ECC devido à intensa lipólise para suprir as crescentes demandas energéticas voltadas à produção de leite e não obtidas pela insuficiente ingestão de matéria seca (Bauman e Currie, 1980; Bell, 1995; LeBlanc, 2010). Devido à intensa seleção genética para a produção de leite, o BEN durante o parto tornou-se fenômeno acentuado em bovinos leiteiros de alta produção (Herdt, 2000), podendo ter consequências danosas à rentabilidade da atividade, bem como para a saúde dos animais, pois está relacionado com distúrbios metabólicos (Herdt, 2000; LeBlanc, 2010; Chapinal et al., 2011) atraso da ciclicidade reprodutiva (Butler e Smith, 1989; Senatore et al., 1996; DeVries et al., 1998) e comprometimento do sistema imune (Hammon et al., 2006; Mallard et al., 1998), gerando prejuízos ao produtor.

2.1.Ácidos Graxos Não-Esterificados (AGNE)

Ácidos Graxos Não-Esterificados (AGNE), ou Ácidos Graxos Livres (AGL), são os metabólitos oriundos da lise da molécula de triacilglicerol (TG). A segunda nomenclatura acabou caindo em desuso, pois na corrente sanguínea estes ácidos graxos não se encontram “livres”, mas sim ligados à albumina para mérito de transporte (Herdt, 1997; Rukkwamsuk et al., 2000). O TG é a molécula de armazenamento de lipídios encontrada no interior dos adipócitos se acumulando em gotículas até que, em situação de demanda energética, ocorra lipólise e os AGNE sejam então liberados para a circulação sanguínea (Nelson e Cox, 2005).

Durante o periparto, especialmente o período entre a última semana antes do parto e as primeiras semanas de lactação, a ingestão de matéria seca diminui entre 20 a 40% (Grummer 1993; Hayirli et al., 2002). As produções de colostro e leite geram uma enorme demanda energética na qual a energia disponível, proveniente da dieta, é menor que a energia necessária para as exigências de manutenção e lactação (Bauman e Curie, 1980; Bell, 1995). Diante deste quadro, o organismo da vaca leiteira utiliza-se da lipólise em larga escala, o que eleva intensamente as concentrações sanguíneas de AGNE, que se encontravam elevadas alguns dias antes da parição, tendo apresentado um pico no dia do parto e manutenção em níveis elevados durante as primeiras semanas de lactação, com relação ao pré-parto (Bertics et al., 1992; Grummer, 1993; Underwood, 1998; Drackley, 1999).

O sistema neuroendócrino interage de diversas formas nesse processo. Diversos hormônios, como insulina, somatotropina, cortisol, estrógeno, progesterona e prolactina, apresentam oscilação durante o periparto e parecem ter importante papel na regulação da lipólise e, conseqüentemente, na liberação de AGNE para a corrente sanguínea (Bauman e Vernon, 1993; Bell e Bauman, 1997).

Devido a sua ação gliconeogênica, o cortisol estimula a partição de gordura e proteína no fígado para a obtenção de metabólitos intermediários (como piruvato, lactato, glicerol e aminoácidos), a fim de que estes possam suportar o aumento da atividade gliconeogênica no fígado (Carroll e Forsberg, 2007). Desta forma, as concentrações sanguíneas de cortisol irão associar-se positivamente com as de AGNE, pois como citado anteriormente eles são majoritariamente originários do processo de lipólise.

A proporção insulina:glucagon – com diminuída insulina e elevado glucagon – na corrente sanguínea foi reportada como sinal desencadeador da lipólise e da consequente liberação de AGNE (Bell, 1995; Eaton et al., 1996; Bell e Bauman, 1997; Chilliard et al., 2000).

A somatotropina, também é citada como regulador homeorrético e com influência sobre a resistência à insulina de tecidos periféricos, lipólise e oxidação de ácidos graxos (McNamara e Hillers, 1986; Vernon e Sasaki, 1991; Bauman e Vernon, 1993). Os efeitos hormonais mais pronunciados são sobre o aporte de AGNE para o fígado em detrimento do suprimento intracelular dos AGNE (Drackely et al., 2001). Concentrações plasmáticas elevadas de glucagon e de hormônio do crescimento (GH) e concentrações diminuídas de insulina e leptina foram positivamente relacionadas com as concentrações séricas de AGNE em vacas leiteiras durante o período de transição (Rhoads et al., 2004).

Uma vez na circulação sanguínea, os AGNE chegam ao fígado onde poderão ser processados de três formas distintas: 1) processo de β -oxidação e utilização como fonte ATP, 2) conversão em corpos cetônicos (acetona, acetoacetato ou β -hidroxibutirato – BHBA) que poderão ser utilizados como fonte energética para os próprios hepatócitos ou liberados na corrente sanguínea e 3) re-esterificação em TG que será armazenado no

interior dos hepatócitos ou, após conversão em lipoproteínas de muito baixa densidade (*very low density lipoproteins* – VLDL), liberado para a corrente sanguínea (Christensen et al., 1997; Ingvarsten, 2006; Grummer, 2011; Ingvarsten e Moyes, 2011). De acordo com o resultado do processamento dos AGNE pelo fígado para o metabolismo da vaca são úteis, a β -oxidação e a exportação de TG na forma de VLDL. Essas vias, porém, são limitadas no metabolismo dos ruminantes e quando a lipólise é acentuada, a concentração plasmática de AGNE torna-se elevada e as vias de síntese de corpos cetônicos e o acúmulo de TG nos hepatócitos ocorrem em excesso, predispondo o animal à cetose e à lipidose hepática, respectivamente (Grummer, 2011). Por isso, os AGNE são considerados importantes marcadores do metabolismo e da fisiologia da vaca de leite periparturiente. Além disso, são os principais indicadores do BEN (Bell, 1995; Herdt, 1997; Overton, 2003) e sua concentração plasmática foi positivamente associada com ocorrência de hipocalcemia, retenção de placenta, metrite, mastite e deslocamento de abomaso (Dyk, 1995; Kaneene et al., 1997; Sato et al., 1999; Ospina et al., 2010; , Chapinal et al., 2011); negativamente associada a parâmetros reprodutivos, como probabilidade de prenhez à primeira IA e retomada da ciclicidade ovariana (Garverick et al., 2013; Ospina et al., 2010; Staples et al., 1990), e, também negativamente associada a indicadores do sistema imune, como contagem de leucócitos e função neutrofílica (Hammon, et al., 2006; Wathes et al., 2009).

Estratégias para a redução da lipólise e, portanto, das concentrações plasmáticas de AGNE foram investigadas a fim de melhorar a saúde e o equilíbrio energético de vacas leiteiras periparturientes. Concentrações plasmáticas diminuídas de AGNE foram avaliadas por meio de manejos e dietas, porém na maioria das situações, em detrimento da produção e da porcentagem de gordura do leite, o que torna essas estratégias pouco rentáveis (Grummer, 2016a). Há também estudos que buscaram favorecer as vias

hepáticas nas quais os AGNE são naturalmente utilizados pelo metabolismo, como aumento da exportação de VLDL pela adição de suplementos à dieta, especialmente a colina protegida (Lima et al., 2007; Lima et al., 2011). A pesquisa pelo ponto de equilíbrio no qual ocorra a lipomobilização de forma a sustentar o pico de lactação e a qualidade do leite, porém sem prejudicar a saúde e o metabolismo dos animais é crucial para o sucesso de um período de transição que possa ser ao mesmo tempo rentável ao produtor e sustentável para a fisiologia dos animais (Grummer, 2016a, b).

2.2.Glicose e Insulina

Ruminantes são animais naturalmente hipoglicêmicos quando comparados com monogástricos (Bauman e Curie, 1980; Sasaki 2002), pois a fermentação ruminal dos alimentos gera Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC: principalmente acetato, propionato e butirato), sendo os principais substratos energéticos para o ruminante, enquanto que a maioria dos açúcares e carboidratos presentes na dieta é rapidamente utilizada pelos micro-organismos do rúmen, não se tornando disponível para a absorção pelo intestino delgado na forma de monossacarídeos.

A glicose é obtida praticamente em sua totalidade pela gliconeogênese hepática, para a qual o principal substrato é o propionato (Brockman, 2005). A maioria das células dos ruminantes, porém, utiliza-se da oxidação de ácidos graxos para obtenção de energia, processo para o qual os principais substratos são os AGNE e o acetato, por isso, os ruminantes não necessitam de elevadas concentrações de glicose sanguínea (Bell, 1995; Herdt, 1997; Drackley, 1999).

Próximo à parição, porém, a demanda por glicose eleva-se uma vez que o feto, a placenta e o útero apresentam elevada exigência deste substrato para suas manutenções e crescimento ao final da gestação (Bell, 1995; Adewuyi et al., 2005). No início da lactação, a secreção de leite se intensifica e com ela a necessidade da glândula mamária

por glicose para a produção de lactose (Neville et al., 1983). Segundo Bell e Bauman (1997), a demanda por glicose é quatro vezes maior para ovelhas prenhes ao final da gestação quando comparadas às ovelhas não-gestantes. Em vacas de muito alta produção a situação é mais extrema e a exigência pode ser sete vezes superior a de vacas não-lactantes.

Para que animais hipoglicêmicos – os ruminantes, e especialmente a vaca leiteira de alta produção, quando comparados aos monogástricos – consigam suprir as demandas do organismo existem certas adaptações homeorréticas, como a priorização do uso da glicose para tecidos fetais, placentários e mamários (Bell, 1995; Bell e Bauman, 1997; Adewuyi et al., 2005) em relação aos demais tecidos do organismo da vaca periparturiente. Isso ocorre, pois, entre outros motivos, nas células do feto, placenta e da glândula mamária predominam os transportadores de glicose do tipo GLUT1 e GLUT3, independentes da ação da insulina (Simmons et al., 1979; Bell e Bauman, 1997; Ehrhardt e Bell, 1997;). Em tecidos periféricos, principalmente adiposo e muscular, predomina o transportador do tipo GLUT4, insulín-dependente (Zhao, 1993). Desta forma, o aporte de glicose para o útero gravídico, durante o pré-parto, e para a glândula mamária, durante o pós-parto, é facilitado (Molina et al., 1991; Zhao, 1996).

Os ruminantes apresentam tecidos periféricos (que expressam transportadores GLUT4) com baixa sensibilidade à insulina, quando comparados com outras espécies como roedores e humanos (Sasaki, 2002). Este perfil, ao intensificar-se, caracteriza um quadro de resistência à insulina, vastamente descrito durante o período de transição (Kronfeld, 1982; Sano et al., 1991; Sano et al., 1993, Bell e Bauman 1997; Hayirli, 2006) e recentemente identificado em vacas sobrealimentadas durante meio e final de lactação (Leiva et al., 2015a). Isto significa que para obterem aporte celular de glicose,

esses tecidos dependerão de concentrações plasmáticas de insulina ainda mais elevadas, o que foi observado nos animais utilizados por Leiva et al. (2015a), mas dificilmente ocorrerá em vacas durante o período de transição durante o BEN (Butler et al., 2003; Grum et al., 1996; Vazquez-Anon, 1994; Lucy 2011). Além disso a elevada taxa de lipomobilização, típica do parto, promove o acúmulo de TG nos hepatócitos, reduzindo a capacidade gliconeogênica do fígado e agravando a hipoglicemia e, conseqüentemente, a hipoinsulinemia. Desta forma, as concentrações diminuídas de glicose e insulina estimulam a lipólise no tecido adiposo e prolongam o BEN (Grummer, 1993).

Em vista do que foi descrito, glicose e insulina são consideradas importantes marcadores do status metabólico da vaca leiteira durante o período de transição. Desta forma, a determinação de suas concentrações plasmáticas é ferramenta relevante para a avaliação e interpretação de resultados experimentais.

3. EIXO SOMATOTRÓPICO

O eixo somatotrópico é definido, de maneira simplificada, como a interação entre o GH (ou somatotropina), seus receptores no fígado (GHR-1A) e o fator de crescimento insulina-símile tipo 1 (*insulin-like growth factor type 1 — IGF-1*). Quando o GH se liga aos GHR-1A há estímulo para que o fígado secrete IGF-1. Concentrações plasmáticas diminuídas de IGF-1 sinalizam à hipófise que mais GH deve ser liberado na corrente sanguínea. Enquanto que concentrações elevadas de IGF-1 inibem a secreção de GH, em esquema de *feedback* negativo (Lucy, 2011).

A maioria dos tecidos do organismo é responsiva ao GH por meio de GHR-1A. É no fígado, porém, que estes receptores são encontrados com maior abundância (Hauser et al., 1990; Lucy et al., 1998). O acoplamento do GH aos seus receptores gera

respostas variadas, mas a mais conhecida e de maior relevância no metabolismo da vaca periparturiente é a produção e secreção de IGF-1 para a corrente sanguínea (Hannon et al., 1991; Bichell et al., 1992; Gronowski e Rotwein, 1995). O IGF-1 é um importante mediador da ação do GH em diversos tipos celulares (McGuire et al., 1992; Thissen et al., 1994; Jones e Clemmons, 1995; Le Roith, 2001). O receptor de GH encontrado no fígado de bovinos adultos é regulado por fatores nutricionais, hormonais e metabólicos (Lucy et al., 2001).

Bezerros alimentados com dieta para alto ganho de peso tiveram maior expressão de GHR-1A hepático quando comparados com bezerros alimentados com dietas para baixo ganho de peso (Smith et al., 1999). A exemplo disso, vacas periparturientes com balanço nutricional negativo apresentam reduzida expressão de GHR-1A hepático no dia do parto, acompanhada por concentrações plasmáticas diminuídas de IGF-1 e elevadas de GH. Este fenômeno, em vacas saudáveis, é revertido em média 21 dias após a parição (Kobayashi et al., 1999). Ainda neste mesmo estudo, constatou-se que um dos animais do experimento ao apresentar deslocamento de abomaso logo após o parto, não expressou GHR-1A hepático aos 15 dias em leite (DEL). Os autores hipotetizaram que o prolongado período de ingestão reduzida foi prejudicial à expressão dos receptores hepáticos. Segundo Lucy et al. (2001) a falha no reestabelecimento dos níveis normais de GHR-1A após o parto pode afetar a saúde e o desempenho da vaca, fato que está de acordo com estudos que associaram concentrações plasmáticas elevadas de IGF-1 ao retorno mais rápido da atividade reprodutiva (Thatcher et al., 2006; Taylor 2004) e melhor título de anticorpos, relacionado com animais imunocompetentes (Mallard et al., 1997).

Lucy et al. (2001) demonstraram relação entre a expressão de GHR-1A hepático e a ingestão de alimento, fase da lactação e aplicação de GH bovino exógeno em vacas

leiteiras, porém não identificaram o mecanismo exato pelo qual há redução de GHR-1A durante o pós-parto imediato. Em estudo posterior, Butler et al. (2003) investigaram o papel da insulina no eixo somatotrópico, e constaram que, ao elevar as concentrações sanguíneas de insulina em vacas leiteiras durante o pós-parto (10 dias após o parto) havia aumento da expressão de GHR-1A hepático e, em consequência, elevação também na concentração plasmática de IGF-1. Além da influência do balanço energético e do ambiente hormonal na expressão de GHR-1A, a lipólise excessiva impacta negativamente na função hepática de vacas leiteiras periparturientes, devido principalmente ao acúmulo de TAG nos hepatócitos, e há esforços para que este quadro possa ser revertido ou amenizado (Grummer, 1993; Drackley, 1999; Herdt, 2000; Bobe et al., 2004), com o objetivo de restaurar rapidamente a função plena dos hepatócitos após o parto. Caso isso não seja possível, o que ocorre com frequência, principalmente entre vacas leiteiras de alta produção, o animal pode apresentar o que é chamado de desacoplamento do eixo somatotrópico ou resistência ao GH (Donaghy e Baxter, 1996). Como descrito inicialmente, no eixo somatotrópico, há a ligação do GH ao seu receptor que desencadeia a produção e secreção de IGF-1 pelo fígado e este hormônio então, dependendo de suas concentrações plasmáticas, estimula ou inibe a hipófise a secretar GH em esquema de *feedback*. Se, no entanto, a situação é de expressão diminuída de GHR-1A, como no pós-parto imediato, essa ligação não ocorre. Mesmo que a concentração de GH seja abundante, a produção de IGF-1 é insuficiente e o sinal que chega a hipófise a induz a secretar ainda mais GH. Essa situação é fisiológica (Butler et al., 2003), porém espera-se que seja revertida em um prazo de dias ou poucas semanas após o parto (Kobayashi et al., 1999). Quando o quadro se prolonga há consequências indesejáveis como queda na produção, perdas reprodutivas e comprometimento do

sistema imune, devido principalmente às diminuídas concentrações plasmáticas do IGF-I (Mallard et al., 1997; Taylor, 2004; Thatcher et al., 2006; Lucy 2011).

3.1.Fator de Crescimento semelhante à Insulina tipo 1 (IGF-1)

O Fator de Crescimento semelhante à Insulina tipo 1, ou IGF-1, é um hormônio proteico da família dos IGFs, e seu nome deriva do fato de ele se relacionar direta e indiretamente com a fisiologia do crescimento e possuir uma estrutura molecular muito semelhante à da insulina (Le Roith et al., 2001). Quando um fator intermediário para a ação do GH no crescimento ósseo foi identificado nos anos 50, ele foi chamado de “fator de sulfção” e posteriormente de somatomedina C, pelo fato de a molécula em questão mediar a ação da somatotropina, o GH (Salmon e Daughaday, 1957). Apenas em 1978 foi possível a purificação e caracterização dos IGF-I e IGF-II, que foram então batizados por compartilharem 50% da sequência de aminoácidos com a insulina e serem capazes de estimular a captação de glicose em células do tecido muscular e adiposo (Rinderknecht e Humbel, 1978).

À medida que o estudo dos IGFs evoluiu foram descobertas novas funções e interações destes hormônios em diferentes tecidos e sistemas do organismo. Evidenciou-se que se tratava de um sistema complexo, dentro do qual o IGF-I possuía diversos sítios de ação, sob diferentes mediadores (Le Roith et al., 2001).

Dentre suas ações pode-se citar o efeito no crescimento, tanto como mediador do GH no crescimento ósseo e cartilaginoso (Blair et al, 1988; Gourmelen et al., 1984), como sua possível ação independente no crescimento embrionário e na hipertrofia de órgãos como o baço e os rins (Gourmelen et al., 1984, Guler et al., 1988). Sua função direta no desenvolvimento dos folículos ovarianos e do útero tem grande influência na fertilidade (Zhou et al., 1997; Laron, 1999) é também potente estimulador das células da granulosa e da esteroidogênese em células luteais bovinas (Schams et al., 1988;

McArdle e Holtorf, 1989) e função metabólica conjunta á da insulina, aumentando o metabolismo proteico e inibindo a proteólise (Fryburg, 1994; Fryburg et al., 1995), além de melhor a captação de glicose celular em tecidos periféricos (Jacob et al., 1989). Na imunidade inata, estudos *in vitro* mostraram maior atividade de células *natural killers* (NK) quando estas foram estimuladas com IGF-1 (Kooijman et al., 1992), macrófagos pré-tratados com IGF-1 e expostos a endotoxina apresentaram maior produção de TNF- α (Renier et al., 1996) e o IGF-1 também modula a diferenciação e a proliferação de células da linhagem mieloide (McCubrey et al., 1991; Clark, 1997).

Na maioria destes trabalhos, as funções do IGF-I foram descritas utilizando como modelo experimental, roedores (Blair et al, 1988; Guler et al., 1988; Jacob et al., 1989; Zhou et al., 1997) e seres humanos (Gourmelen et al., 1984; Fryburg, 1994; Fryburg et al., 1995). Nota-se que, em um contexto de produção animal, algumas das ações deste hormônio se destacam mais que outras, como, por exemplo, seu papel na fertilidade e, de acordo com o que foi discutido sobre a fisiologia do período de transição, na captação de glicose celular. As ações do IGF-I fizeram com que este fosse frequentemente incluído em estudos com vacas leiteiras (Burton et al., 1991; Mallard et al., 1997; Butler, 2000; Rhoads et al., 2008; Wathes et al., 2009; Kessler et al., 2013).

Devido à sua propriedade de interagir com diferentes tipos celulares (Le Roith et al., 2001), o IGF-I foi utilizado como ferramenta na avaliação da fertilidade (Lucy, 2000; Armstrong et al., 2002; Rhoads et al., 2008), da função imune (Burton et al., 1991; Mallard et al., 1997; Wathes et al., 2009) e do status nutricional (Elsasser et al., 1989; Smith et al., 1999; Butler, 2000) de bovinos. Desta forma, o IGF-I é um indicador que auxilia no esclarecimento de dados referentes à eficiência reprodutiva, ao sistema imunológico e à condição nutricional, o que fez deste hormônio um importante marcador do metabolismo da vaca leiteira periparturiente.

4. SISTEMA IMUNE

Para fins de estudo o sistema imune é dividido em sistema imune inato e sistema imune adquirido e, embora seja possível identificar características distintas entre os dois, eles possuem componentes em comum e um mesmo objetivo: proteger o organismo hospedeiro contra ameaças de patógenos e, portanto, funcionam em conjunto (Janeway et al., 2005)

O sistema imune inato possui um componente físico-químico: barreiras inespecíficas contra o acesso de possíveis fonte de infecção (pele, mucosas, pH, micro-organismos benéficos presentes, por exemplo, nas mucosas intestinais e respiratórias), e um componente celular: células (neutrófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas, células NK, mastócitos, basófilos, e eosinófilos) que têm como principal função a identificação e a fagocitose de patógenos, de células infectadas ou anormais e a liberação de mediadores inflamatórios (Carroll e Forsberg, 2007). O sistema imune inato fornece a primeira linha de defesa do organismo, que ocorre rapidamente (0 a 4h) após a infecção (Janeway et al., 2005), a fim de que os patógenos não tenham tempo e oportunidade de se proliferarem no hospedeiro. Para que isto ocorra, as células do sistema imune inato identificam tanto os patógenos, por meio dos padrões moleculares associados a patógenos, PAMP, como a ocorrência de danos teciduais, indicada pela liberação de padrões moleculares associados a danos DAMP. O reconhecimento destes padrões moleculares incita uma resposta inflamatória, inicialmente localizada e posteriormente sistêmica. (Ceciliani et al., 2012).

Os PAMP são estruturas moleculares comumente presentes em células microbianas, porém incomuns ou ausentes em células mamíferas, como por exemplo: lipopolissacarídeo (parede celular de bactérias gram-negativas), ácido lipotecoico

(parede celular de bactérias gram-positivas), manoses (glicolipídios e glicoproteínas bacterianas), n-metil-formil-metionina (proteínas bacterianas), RNA de fita dupla (presente em vírus) e glucanos (parede celular de fungos) (Brodsky e Medzhitov, 2009). Já os DAMP são derivados de componentes intracelulares como mitocôndria, núcleo, retículo endoplasmático, e quando encontrados no ambiente extracelular indicam morte ou injúria celular (Krysko et al., 2011).

O sistema imune adquirido compõe a segunda linha de defesa do organismo, na qual há reconhecimento de antígenos específicos e subsequente produção de anticorpos (Janeway et al., 2005). Detalhes desta ramificação do sistema imune não serão abordados nesta revisão, mas, como mencionado anteriormente, há interações entre componentes do sistema imune inato e adquirido, como, por exemplo, a influência das citocinas produzidas por células NK sobre a diferenciação dos linfócitos T (Mosman e Sad, 1996; Elenkov e Chrousos, 1999).

As citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α , IFN- γ , dentre outras) são proteínas liberadas por células do sistema imune inato (células NK, macrófagos e monócitos) (Gauldie et al., 1987; Carroll e Forsberg, 2007). Elas mediam a resposta inflamatória através de diversos mecanismos celulares e sistêmicos e um deles é o desencadeamento de uma resposta de fase aguda (RFA), evento do sistema imune inato avaliado através de proteínas e marcadores que permitem quantificar a inflamação (Eckersall e Bell, 2010; Ceciliani et al., 2012).

4.1.Resposta de Fase Aguda (RFA)

A RFA é um componente do sistema imune inato presente em eventos inflamatórios, infecciosos, traumáticos e neoplásicos (Cray et al., 2009). Possui reações características inespecíficas que variam em intensidade de acordo com a natureza do insulto enfrentado pelo organismo, sendo elas: leucocitose, febre, mudanças

comportamentais (letargia, apatia, anorexia, hiperalgesia), alterações nas concentrações plasmáticas de minerais (ferro, zinco e cobre) e a mudança no padrão de síntese proteica (Heinrich et. al., 1990; Carroll e Forsberg, 2007).

Estas reações ocorrem em resposta ao estímulo das citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- α) liberadas por macrófagos, quando há reconhecimento de PAMP ou DAMP. Dentre as reações citadas, duas se destacam como principais componentes de uma RFA: a resposta febril e a alteração no metabolismo e regulação gênica do fígado.

A resposta febril envolve alteração da regulação térmica pelo hipotálamo. É uma adaptação de defesa muito antiga dos organismos e está associada com uma aceleração dos processos enzimáticos envolvidos na eliminação de patógenos. A febre, apenas pela mudança de temperatura, é capaz de destruir muitas bactérias e micro-organismos presentes no hospedeiro e também acelera a proliferação de vários tipos celulares do sistema imune. Ela ocorre em resposta ao aumento nas concentrações plasmáticas de IL-1, IL-6 e TNF- α que induzem a síntese de prostaglandina E2, fator estimulador da febre (Carroll e Forsberg, 2007)

A alteração no metabolismo e regulação gênica do fígado ocorre quando as citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- α) chegam ao órgão pela corrente sanguínea e os hepatócitos respondem iniciando a síntese e liberação de uma classe de proteínas denominadas proteínas de fase aguda (PFA) (Ceciliani et al., 2012).

A síntese das PFA desvia os aminoácidos disponíveis no fígado da síntese das proteínas habituais (Carroll e Forsberg, 2007), desta forma têm-se duas classes de PFA: aquelas que se elevam em concentração durante a RFA, chamadas PFA positivas (haptoglobina, amiloide A sérico, ceruloplasmina e fibrinogênio, por exemplo) e aquelas que diminuem em concentração, chamadas de PFA negativas (albumina e

paraoxonase, por exemplo). As PFA positivas são ainda classificadas em três subgrupos: “*major*” (como haptoglobina e amiloide A sérico, no caso dos ruminantes), “moderada” (proteína ligadora de lipopolissacarídeo e fibrinogênio) e “*minor*” (ceruloplasmina), de acordo com maneira como suas concentrações se alteram durante a RFA (Eckersall e Bell 2010; Ceciliani et al., 2012). Proteínas de fase aguda que expressam elevação rápida durante a RFA e apresentam concentrações maiores, até em centenas de vezes, que as concentrações basais são consideradas “*major*”; as que têm suas concentrações elevadas lentamente em no máximo o dobro dos valores de referência são consideradas “*minor*” e por fim aquelas que se encontram em situação intermediária e apresentam elevação de suas concentrações entre o dobro e 10 vezes em relação às concentrações iniciais são consideradas “moderadas” (Eckersall e Bell, 2010). O número de vezes que as PFA “*major*”, “moderadas” ou “*minor*” aumentam durante a RFA diferiu entre trabalhos e espécies animais estudadas (Petersen et al., 2004; Ceron et al., 2005; Paltrinieri, 2008; Cray er al., 2009; Eckersall e Bell, 2010), porém o conceito geral permaneceu o mesmo.

O perfil proteico da RFA varia de acordo com a espécie e, da mesma forma, a classificação das PFA. Para ruminantes, por exemplo, a haptoglobina é uma PFA “*major*”, enquanto para caninos, ela é considerada “moderada” (Martinez-Subiela et al., 2002; Eckersall e Bell, 2010; Ceciliani et al., 2012). Por isto, é essencial ter conhecimento do significado das PFA em relação à espécie estudada. Além disso, a produção de PFA não é exclusivamente hepática (Skovgaard et al., 2009). Em ruminantes, ela foi descrita na glândula mamária (Hiss et al., 2004; Larson et al., 2005; Thiele et al., 2007; Molenarr et al., 2009), nos sistemas reprodutivo (Sheldon et al., 2001; Lavery et al., 2003; Chapwanya et al., 2009), respiratório (Lecchi et al., 2009; Rahaman et al., 2010), digestivo (Dilda et al., 2011; Rahaman et al., 2010) e no tecido

adiposo (Saremi et al., 2010; Berg et al., 2011), embora haja relatos que a participação de PFA produzidas localmente é mínima a nível sistêmico, e é a produção hepática responsável pelas elevações observadas nas concentrações séricas durante a RFA (Ceciliani et al., 2012).

A dosagem das PFA para avaliação da reposta inflamatória é uma abordagem relativamente nova na medicina veterinária, datando dos anos 90 (Cray et al., 2009), e desde então trabalhos têm mostrado sua relevância para fins diagnósticos e prognósticos tanto na clínica de animais de companhia quanto na avaliação de rebanhos de animais de produção (French, 1989; Ceron et al., 2005; Murata et al., 2004; Petersen et al., 2004; Ceciliani et al., 2012).

Em vacas leiteiras, durante o período de transição, há exposição a diversos eventos inflamatórios e mesmo animais que não enfrentam qualquer episódio de doença ou distúrbio metabólico apresentam desvios do funcionamento regular do sistema imune durante o parto (Alsemgeest et al., 1993; Chan et al., 2010; Jawor e Stefaniak, 2011). O parto, em condições fisiológicas, eleva as concentrações sanguíneas de haptoglobina em vacas leiteiras e incita eventos que caracterizam uma RFA (Uchida et al., 1993). Esta RFA é necessária, pois durante o parto há dano tecidual e exposição do organismo, principalmente do sistema reprodutivo e da glândula mamária, a uma elevada carga patogênica. Desta forma a RFA compõe uma ação do sistema imune inato na tentativa de retomada da homeostase. Em contrapartida, situações de estresse, sem qualquer estímulo patogênico, são também capazes de incitar uma RFA, como foi demonstrado por Cooke e Bohnert, (2011) ao observarem o desenvolvimento de RFA em bezerros que receberam aplicação de intravenosa CRH, mimetizando estímulo estressor. Quando isto ocorre, ou seja, quando o organismo desencadeia uma RFA em consequência de um evento caracterizado unicamente como estresse, sem dano tecidual

ou ameaça de doença (por exemplo, transporte, desmama ou estresse térmico), pode-se dizer que ocorre uma RFA “desnecessária”, já que não há patógenos a serem combatidos ou tecidos a serem reparados e o aumento nas concentrações plasmáticas das PFA acaba não encontrando as funções presentes em outros eventos nos quais elas se encontram elevadas, como infecções, traumas, parição e neoplasias.

A dosagem das PFA durante o período de transição de vacas leiteiras permite a caracterização da resposta inflamatória experienciada pelos animais e acresce informação relevante na interpretação de outros dados relacionados com a fisiologia e problemática desse período.

4.1.1. Haptoglobina (Hp)

A Haptoglobina (Hp) é uma proteína de fase aguda positiva, “major” e juntamente com o Amilóide A Sérico, são PFA de importante aspecto diagnóstico para ruminantes (Eckersall e Bell, 2010). Sua molécula consiste de duas cadeias α e duas cadeias β ligadas por pontes de dissulfeto (Morimatsu et al. 1991).

A principal função da Hp é ligar-se à hemoglobina (Hb) formando um complexo estável Hp-Hb (Ceceliani et al., 2012), que pode então ser reconhecido, fagocitado e removido da corrente sanguínea por macrófagos especializados do fígado, as células de Kupffer (Graversen et al., 2002). Além disso, a formação do complexo Hp-Hb desacelera o crescimento bacteriano por reduzir a disponibilidade de hemoglobina livre, excelente meio de cultura para micro-organismos (Murata et al. 2004); também evita o estresse oxidativo dos tecido (Yang et al. 2003) e previne o dano renal, pois o complexo Hp-Hb não atravessa a filtração glomerular, ao contrário da Hb que ao passar pelos glomérulos renais gera lesão (Allison e Rees, 1957). Assim, a Hp, por meio da formação do complexo Hp-Hb, protege o organismo dos efeitos nocivos da hemoglobina livre proveniente da hemólise (Kato, 2009). Além disso, Hp também

possui propriedades anti-inflamatórias, ligando-se ao receptor CD163 de monócitos ou macrófagos e induzindo expressão de mediadores anti-inflamatórios como a IL-10 (Philippidis et. al, 2004; Schaer et. al 2006).

Dentro de uma RFA, sucintamente, pode-se então nomear os seguintes eventos: o insulto de origens variadas, como já descrito anteriormente; as células do sistema imune inato respondem com a produção de citocinas inflamatórias, principalmente IL-1, IL-6 e TNF- α , e por fim os hepatócitos, em resposta irão sintetizar as PFA, dentre elas a Hp (Carroll e Forsberg, 2007; Cray et al., 2009; Ceciliani et al., 2012). As concentrações séricas de Hp, refletem, portanto a ocorrência de uma série de eventos em cadeia que, em função das circunstâncias, podem ter interpretações diferentes. Elevadas concentrações séricas de Hp indicam, portanto, que houve uma RFA mediante a algum estímulo.

Assim, alguns autores (Alsemgeest et al., 1994; Hirvonen et al., 1996; Huzzey, et al., 2009) relacionaram o aumento nas concentrações séricas de Hp com a ocorrência e o desenvolvimento do quadro clínico de doenças. Alsemgeest et al. (1994) caracterizaram as concentrações séricas de Hp em animais saudáveis ou que desenvolveram, de forma clínica, inflamações agudas e crônicas e observaram que as concentrações de Hp foram significativamente menores em animais saudáveis em comparação aos demais. Hirvonen et al. (1996) relacionaram a elevação das concentrações séricas de Hp com a gravidade, duração e resolução de casos de mastite induzida: animais com concentrações mais elevadas de Hp apresentaram quadro clínico mais grave de mastite, de maior duração e com pior resolução (perda de função de quartos mamários afetados). Huzzey, et al. (2009) demonstraram o potencial uso das concentrações séricas de Hp como um preditor de metrite puerperal, no qual as

concentrações mais elevadas em momentos de coleta precedentes ao episódio clínico foram indicativos de forma mais agressiva da doença.

Em contrapartida, outros estudos relacionaram o aumento das concentrações de Hp com marcadores imunológicos e de produção positivos em vacas leiteiras periparturientes. Silvestre et al. (2011a, 2011b) ao suplementarem vacas leiteiras com diferentes fontes de ácidos graxos, observaram aumento das concentrações séricas de Hp nos animais recebendo fontes de ácidos graxos essenciais quando comparadas aos animais recebendo ácidos graxos não essenciais e associaram este aumento a um perfil pró-inflamatório benéfico durante o parto, que auxilia em uma resposta imunológica mais eficaz. Outros dados destes trabalhos suportam tais conclusões sobre a melhoria da função imune como a mudança no perfil de ácidos graxos da membrana plasmática e maior atividade fagocítica dos neutrófilos. Leiva et al. (2015b), também observaram elevação das concentrações plasmáticas de Hp de vacas leiteiras periparturientes suplementadas com colina protegida durante o período de transição e, da mesma forma, interpretaram este resultado como benéfico.

Logo, para a utilização das concentrações séricas de Hp como indicador da saúde de vacas leiteiras periparturientes é preciso ter conhecimento sobre os critérios de avaliação e, de acordo com os trabalhos mencionados nos parágrafos anteriores, há indícios de que as elevações nas concentrações de Hp tenham significados diferentes dependendo de fatores como a situação clínica do animal, sendo que em vacas já sabidamente enfermas maiores concentrações de Hp foram associadas com piores quadros clínicos e sintomas mais agressivos (Alsemgeest et al., 1994; Hirvonen et al., 1996; Huzzey et al., 2009), enquanto que outros estudos ao utilizarem animais periparturientes saudáveis (Silvestre et al. 2011a; Silvestre et al., 2011b; Leiva et al.,

2015b) associaram concentrações de Hp mais elevadas a um perfil pró-inflamatório potencialmente benéfico para vacas leiteiras durante o parto.

4.1.2. Desafio de LPS

O lipopolissacarídeo (LPS) é uma substância presente na parede celular de bactérias Gram-negativas capaz de estimular intensamente a resposta imune inata da maioria dos animais (Alexander e Rietschel, 2001). É utilizado em pesquisa com a intenção de simular a resposta imunológica a uma infecção bacteriana, sem, no entanto, haver risco de doença. Segundo Ceciliani et al. (2012) o desafio com LPS é o modelo padrão para estudo da RFA, pois os eventos ocorrerão de maneira muito semelhante a uma infecção por bactérias Gram-negativas e é possível a coleta de amostras para avaliação de marcadores desta resposta, principalmente as PFA e citocinas.

O LPS foi identificado no organismo de bovinos expostos a diferentes condições patológicas (mastites ambientais, septicemia, acidose, laminite e deslocamento de abomaso) (Boosman et al., 1991; Andersen, 1994; Blum et al., 2000). Infecções por bactérias gram-negativas são situações nas quais há grande concentração plasmática de LPS, induzindo RFA, com produção de TNF- α , haptoglobina e outros, como amiloide-A sérico (SAA) (Boosman et al., 1989; Sordillo e Peel., 1992; Werling et al., 1996).

Durante o período de transição, devido aos eventos do parto, início da lactação, mudanças de ambiente e de dieta, a vaca leiteira é exposta a grande quantidade de patógenos, dentre eles as bactérias gram-negativas. Por isso, o desafio de LPS é válido no estudo da RFA de vacas leiteiras periparturientes, pois cria uma situação similar a enfrentada pelos animais no campo e permite sua avaliação.

4.2. Imunossupressão e o Parto de Vacas Leiteiras

Antes mesmo dos estudos sobre o período de transição se intensificarem, alguns trabalhos investigaram a o sistema imune de vacas leiteiras periparturientes, acessando-

o através de marcadores de função leucocitária (Kehrli et al., 1989a, b; Newbould, 1976). No mais antigo destes trabalhos, Newbould (1976) avaliou a competência fagocítica de leucócitos polimorfonucleados (PMN) através da concentração de “PMN ativos”, definidos como aqueles que apresentam fagocitose de *S. aureus* in vitro, no sangue de oito vacas durante um ciclo completo de gestação. Foi observado que a atividade fagocítica atingiu o mínimo absoluto durante o ciclo todo na primeira semana após o parto. Resultados semelhantes foram observados por Kehrli et al. (1989a, b) que ao estudarem separadamente neutrófilos e linfócitos de vacas durante o ciclo de gestação constaram queda dos marcadores de atividade de ambos os tipos celulares durante a primeira semana após o parto. Evidenciou-se, então, que havia uma queda significativa da atividade leucocitária em vacas após o parto, especialmente durante os primeiros sete dias, o que compõe um quadro de imunossupressão.

Imunossupressão é definida como a inabilidade do sistema imune em responder à presença de patógenos ou a danos teciduais, falhando desta forma em debelar infecções e reparar tecidos danificados (Bryant, 2003).

A imunossupressão de vacas leiteiras durante o periparto é descrita na literatura, porém, os exatos mecanismos fisiológicos pelos quais ela ocorre ainda não foram completamente esclarecidos (Burton et al., 2003; Goff, 2006; Sordillo e Raphael, 2013).

Sugeriu-se que o agente causador da imunossupressão durante o periparto era mudança nos perfis hormonais que ocorre durante o período de transição (Alsemgeest et al., 1993). A elevação na concentração plasmática de cortisol causada pela parição em si, bem como pelas diversas situações estressantes previstas na rotina da vaca de transição, foram também apontadas como possíveis causas da imunossupressão (Burton et al., 1995). Além disso, as alterações nas concentrações plasmáticas de estradiol e

progesterona, por serem intensas e abruptas nos momentos acerca da parição, são prováveis coadjuvantes na queda de imunidade (Weber et al., 2001).

A glicose também é um metabólito crítico durante o periparto, pois neste período a vaca apresenta hipoglicemia acentuada, causada pela associação da sua elevada demanda para produção da lactose do leite e reduzida ingestão de matéria seca, como mencionado anteriormente (Neville et al., 1983; Vazquez-Añon et al., 1994; Drackley, 1999; Jorritsma et al., 2003). Sabe-se que a glicose é a fonte de energia preferencial para as células do sistema imune (Newsholme e Newsholme, 1989) e que pode ter efeitos estimulatórios na resposta imunológica, como aumento da proliferação, diferenciação, quimiotaxia e atividade fagocitária dos leucócitos (Barghouthi et al., 1995; Gamelli et al., 1996; Pithon-Curi et al., 2004). Desta forma, é compreensível que a baixa disponibilidade de glicose seja prejudicial às funções leucocitárias, e, consequentemente, responsável, pelo menos em partes, pela imunossupressão.

A lipomobilização que ocorre no periparto foi relacionada com o comprometimento da função imune em vacas leiteiras, denotando que o BEN tem relevante influência na imunossupressão e, portanto, na ocorrência de problemas de saúde, como distúrbios metabólicos e doenças infecciosas durante o periparto. As abordagens variam entre estudos, mas neste contexto, foi relatado que o BEN está relacionado com a ocorrência de problemas locomotivos e nutricionais (Collard et al., 2000), com o comprometimento da função neutrofílica, avaliada pela atividade das enzimas citocromo-c e mieloperoxidase, refletindo em maior ocorrência de doenças uterinas (Hammon et al., 2006), com o perfil de ácidos graxos plasmáticos, que se altera, influenciando na composição fosfolipídica da membrana de leucócitos (Contreras et al., 2010) e a elevada concentração sérica de AGNE durante a semana anterior ao parto foi associada com maior risco de retenção de placenta, metrite e deslocamento de abomaso

(Chapinal et al., 2011). Embora a concentração sérica de AGNE durante o pré-parto seja um bom preditor de distúrbios durante o pós-parto (Moyes et al., 2013), é preciso ter cautela ao relacionar AGNE e imunossupressão, pois foi relatada a capacidade estimulatória de alguns ácidos graxos sob o sistema imune (Lee et al., 2001; Lee et al., 2004; Lee e Hwang, 2006). Além dos AGNE, outros marcadores do BEN, os corpos cetônicos, além de não poderem ser utilizados como fonte de energia pelos leucócitos (Newsholme et al., 1987), foram associados à diminuição da quimiotaxia e da atividade fagocítica destas células (Grinberg et al., 2008; Ingvarsen and Moyes, 2013).

Não há dúvidas que as alterações homeorréticas do periparto de vacas leiteiras têm impacto no sistema imunológico dos animais. Além disso, hormônios e metabólitos, como aqueles mencionados previamente (cortisol, estradiol, progesterona, glicose, corpos cetônicos) relacionam-se de alguma forma com a imunossupressão. Os mecanismos de ação e detalhes da fisiologia da imunossupressão de vacas leiteiras durante o período de transição, porém, ainda requerem mais estudos para que possam ser completamente compreendidos (Waldron, 2011).

5. ESTRESSE

O conceito de estresse foi esboçado na década de 30 (Selye, 1936) e descrito como um conjunto de reações do organismo comum a diferentes estímulos agressores, um método de alerta do organismo frente a possíveis ameaça. E, independente da natureza do estímulo agressor, algumas reações permaneciam consistentes, como: taquicardia, hiperglicemia, vasoconstrição visceral e periférica e vasodilatação muscular. Essas repostas foram interpretadas como adaptações evolutivas que permitiram aos animais reconhecer e reagir adequadamente a situações de perigo e assim garantir sua sobrevivência.

Muitos anos depois, o termo “estresse” ainda é frequentemente utilizado nos mais diferentes campos da biologia, sem ter, no entanto uma descrição unânime. A definição de Moberg (2000) é semelhante a de Selye (1936): uma resposta biológica desencadeada pelo próprio organismo quando este reconhece alguma perturbação (por exemplo, temperaturas extremas, presença de predadores, doenças, traumas, parição e outros) à que ameace a sua homeostase. Morberg (2000) ainda diferencia os termos estresse e *distress* (que traduzido para o português seria “aflição” ou “sofrimento”), em que o primeiro seria o conjunto de respostas benéficas do estresse, aquelas cuja função é realmente de alerta; já *distress* é o estado no qual o estresse causa consequências negativas para o organismo, comumente associadas às formas crônicas de estresse.

Embora a reação incitada seja semelhante para os diferentes agentes estressores, pode-se classificar esses agente em três categorias no estudo de animais de produção: 1) estresse psicológico: contato com novos animais, mudança para novo ambiente; 2) estresse fisiológico: alterações endócrinas e neuroendócrinas por alguma condição, como restrição alimentar ou disfunções glandulares; 3) estresse físico: traumas mecânicos, estresse térmico, cansaço (Carroll e Forsberg, 2007). No estudo de vacas leiteiras, portanto, justifica-se a caracterização do período de transição como um momento estressante, pois, em rotinas de fazendas comerciais, elas enfrentam todos os três tipos de agentes estressores.

A endocrinologia do estresse baseia-se no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), no qual um estímulo estressor ativa a liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e vasopressina (VP) pelo hipotálamo e ambos estimulam a hipófise anterior a produzir e secretar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (Carroll e Forsberg, 2007). A potência de estímulo de CRH ou VP sobre a secreção de ACTH é espécie-específica e, para bovinos foi demonstrado que o CRH é o estimulador mais

potente (Wagner, 1987; Carroll et al., 2007). Além de estimular a secreção de ACTH, a VP potencializa a ação do CRH, colaborando também desta maneira para o estímulo à secreção de ACTH (Rivier e Vale, 1983; Carroll et al., 1993).

As ações primárias do ACTH são estimular a síntese e liberação de hormônios esteroides na glândula adrenal e promover a captação do colesterol e sua conversão em pregnenolona. Os hormônios esteroides são classificados em glicocorticoides, mineralocorticoides e andrógenos. Os glicocorticoides são aqueles que se relacionam diretamente com as reações de estresse e interagem com diferentes órgãos e sistemas. No fígado estimulam a gliconeogênese pela conversão de proteínas e gorduras em metabólitos intermediárias (como piruvato, lactato, glicerol e aminoácidos) que podem então ser convertidos em glicose pelos hepatócitos (Carroll e Forsberg, 2007). Na própria glândula adrenal estimulam a liberação de catecolaminas que têm efeitos como taquicardia, midríase, vasoconstrição em pele e vísceras e vasodilatação muscular e também colaboram com o aumento da gliconeogênese hepática (Plotsky et al., 1989).

Os glicocorticoides também interagem com o sistema imune, suprimindo reações inflamatórias, um mecanismo de defesa do organismo contra a estimulação crônica ou excessiva destes sistemas, que pode ser prejudicial (Munck et al., 1984). Mais especificamente os glicocorticoides reduzem a liberação de citocinas, como o TNF- α , IL-1 e IL-12 (Schleimer, 2004).

A exposição a elevadas concentrações de glicocorticoides é, no entanto, prejudicial à saúde e causa distúrbios como catabolismo proteico excessivo, hiperglicemia, imunossupressão e depressão. Em animais de produção foram relatadas piora nos índices reprodutivos, crescimento inadequado, redução da produção leiteira, imunossupressão, e maior susceptibilidade a doenças (Ono et al., 1984; Friend, 1991). O

principal glicocorticoide da maioria dos mamíferos é o cortisol (Carroll e Forsberg, 2007).

A avaliação do cortisol plasmático é, portanto, um relevante indicador do estresse e da saúde da vaca leiteira durante o período de transição.

6. ENDOMETRITE

A endometrite pós-parto em vacas leiteiras foi definida como inflamação do endométrio ocorrendo a partir dos 21 dias pós-parto, sem sinais clínicos sistêmicos (Sheldon, 2006). A principal ferramenta para o diagnóstico preciso da endometrite é a coleta de amostras para citologia do endométrio que pode ser realizada pelo método do “*cytobrush*” (Kasimanickam et al., 2004), pela lavagem uterina (Gilbert et al., 2005) ou pela coleta de biópsia (Bonnett et al., 1993). Esses exames geram uma lâmina de microscopia com a amostra do tecido ou das células endometriais, através da qual é possível fazer contagem diferencial da população celular e determinar a porcentagem de células polimorfonucleadas (PMN), parâmetro que identifica a intensidade da infiltração leucocítica, geralmente associado à ocorrência de infecção (Dubuc et al., 2010).

A endometrite pode ser classificada em clínica e subclínica. Endometrite clínica é aquela que o animal apresenta muco vaginal de aspecto muco-purulento ou mais grave (purulento, aquoso com odor fétido) e/ou cervix com diâmetro igual ou maior que 7,5 cm à palpação retal, 20 dias ou mais após o parto (LeBlanc et al., 2002; McDougall et al., 2007; Runciman et al., 2008). A endometrite subclínica é aquela em que não há sinais clínicos, mas a porcentagem de PMN na lâmina, obtida por meio de um dos métodos de coleta citados, é elevada, o limiar dessas porcentagens para determinação de endometrite citológica ou subclínica variou entre 4% e 18% de acordo com diferentes estudos (Kasimanickam et al., 2004; Gilbert et al., 2005; Barlund et al., 2008; Galvão et

al., 2009). A endometrite subclínica também pode ser chamada de endometrite citológica, por ser necessária a realização de uma citologia para seu diagnóstico.

Estudos demonstraram que a endometrite citológica é altamente prevalente entre vacas leiteiras e prejudicial ao desempenho reprodutivo dos animais (Gilbert et al., 2005; Cheong et al., 2011). O exame citológico para a determinação de endometrite em vacas não é uma prática comum no campo, mas em pesquisa e em alguns casos, justifica-se sua realização a fim de avaliar a saúde do sistema genital e investigar possíveis causa de baixa fertilidade em fazendas leiteiras.

7. OMNIGEN-AF

Omnigen-AF® é um suplemento composto por uma mistura ativa desidratada de *Saccharomyces cerevisiae*, produto de fermentação desidratada de *Trichoderma longibrachiatum*, niacina, vitamina B12, riboflavin-5-fosfato, *d*- pantotenato de cálcio, cloreto de colina, biotina, tiamina monoidratada, hidrocloreto de piroxidina, bisulfato de menidiona dimetilpirimidinol, ácido fólico, aluminiosilicato de sódio, terra diatomácea, carbonato de cálcio, casca de arroz e óleo mineral (a formulação completa não é de domínio público).

Sua função seria melhorar a resposta do sistema imune de animais suplementados através de mudança na expressão gênica de neutrófilos, o que já foi verificado em vacas leiteiras durante o periparto (Wang et al. 2009a; Nightingale et al. 2013) e em animais de laboratório (Ortiz-Marty et al. 2012; Rowson et al., 2011). Omnigen-AF® também foi eficiente em melhorar a resposta vacinal em gado de corte, ovinos e em ratos (Forsberg et al., 2007; Punttenney et al., 2010). Rowson et al. (2008), ao desafiarem ratas com patógenos de mastite bovina (*S. aureus*, *S. uberis*, *E. coli*), verificaram menores concentrações de DNA de *S. aureus* e *S. uberis* na glândula

mamária de ratas suplementadas com Omnigen-AF® quando comparadas aos animais não-suplementados. Em outro experimento Rowson et. al (2009) também verificaram aumento da infiltração neutrofílica em tecido mamário de ratas suplementadas com Omnigen-AF® e aumento da expressão de moléculas apresentadoras de antígeno quando os animais tiveram mastite induzida por *E. coli*. Resultados semelhantes foram obtidos por Wang et al. (2009b), também em ratas.

Não há, porém, estudos que associem os parâmetros imunológicos e impactos metabólicos e produtivos do suplemento em questão em vacas leiteiras durante o período de transição e início da lactação. Mais estudos com este suplemento são necessários para confirmar os resultados obtidos até então e para avaliar possível aplicabilidade e rentabilidade do produto no campo em diferentes sistemas de produção.

CONCLUSÃO

O período de transição apresenta grandes desafios para o metabolismo e a imunidade de vacas leiteiras. A produção, a saúde, os parâmetros reprodutivos e a rentabilidade do animal durante toda a lactação estão fortemente relacionados com o que ocorre durante este curto, mas importante, espaço de tempo.

E, embora esta revisão tenha abordado os temas na forma de tópicos para maior clareza, é necessário considerar que os eventos apresentados ocorrem concomitantemente durante o período de transição e influenciam uns aos outros.

O BEN tem influência sobre o sistema imunológico, suprimindo-o (Hammon et al., 2006; Mallard et al., 1998). Se um animal, por estar imunossuprimido, adoece, por outro lado, ingere menos alimento (Heinrich et. al., 1990; Carroll e Forsberg, 2007) e o BEN intensifica-se. A menor ingestão de alimento pode prolongar o desacoplamento do eixo somatotrópico e diminuir a liberação de IGF-1, o que também terá efeitos

deletérios sobre o sistema imune (Mallard et al., 1997). O desacoplamento do eixo somatotrópico por tempo prolongado atrasa a ciclicidade reprodutiva e impacta negativamente nos índices de reprodução (Thatcher et al., 2006; Taylor 2004). E, dessa maneira, muitas relações, que se sobrepõem e interligam, podem ser traçadas, evidenciando-se a complexidade do período e a dificuldade do estudo de seus aspectos de forma fragmentada ou isolada.

Apesar de muitos trabalhos científicos terem sido publicados sobre o assunto, o período de transição em vacas leiteiras, nas práticas de fazendas comerciais, ainda é negligenciado por produtores e técnicos, muitas vezes por falta de informação. Revisões que esclareçam conceitos sobre a fisiologia e o metabolismo desta categoria se fazem necessárias para melhor difusão destes conhecimentos. Além disso, formas de melhorar os indicadores do período de transição e garantir o bem-estar da vaca leiteira periparturiente são cruciais para o sucesso da atividade. Em vista disto, esta revisão buscou esclarecer alguns conceitos e evidenciar a importância do estudo do período de transição em vacas leiteiras. O próximo capítulo apresentará a avaliação dos impactos fisiológicos, imunológicos e produtivos do uso de um aditivo nutricional para vacas leiteiras durante o período de transição.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEWUYI, A. A.; GRUYS, E. e VAN EERDENBURG, F.J.C.M. 2005. Non esterified fatty acids (NEFA) in dairy cattle. A review, *Veterinary Quarterly*, 27:3, 117-126
- ALEXANDER, C. e RIETSCHEL, E. T. 2001. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J. Endotoxin Res.* v. 7(3) p. 167-202.
- ALLISON, A. C. e REES, W. 1957. The binding of haemoglobin by plasma proteins (haptoglobins) — its bearing on the renal threshold for haemoglobin and the aetiology of haemoglobinuria. *Br Med J*; 2(NOV16):1137–43.
- ALSEMGEEEST, S.P.M.; KALSBECK, H.C.; WENSING, TH.; KOEMAN, J.P.; VAN EDEREN, A.M.; GRUYS, E. 1994. Concentrations of serum Amyloid-A (SAA) and haptoglobin (HP) as parameters of inflammatory diseases in cattle. *Veterinary Quarterly* 1994 (16); 1:21-3
- ALSEMGEEEST, S. P. M.; TAVERNE, M. A. M.; BOOSMAN, R.; WEYDEN, B. C.; GRUYS, E. 1993. Peripartum acute-phase protein serum amyloid-A concentration in plasma of cows and fetuses. *American Journal of Veterinary Research*, Vol.54, No.1, (January 1993), pp.164-167
- ANDERSEN, P. H. 1994. Portal infusion of low-dosage endotoxin: A model simulating translocation of ruminal endotoxin in cattle. *Acta Vet. Scand.* 35:111–114
- ARMSTRONG, D. G.; BAXTER, G.; HOGG, C. O.; WOAD, K. J. 2002. Insulin-like growth factor (IGF) system in the oocyte and somatic cells of bovine preantral follicles. *Reproduction* 123, 789–797.
- BAUMAN, D. E. e CURRIE, W. B. 1980. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *J. Dairy Sci.* 63:1514.

- BARGHOUTHI, S.; EVERETT, K. D.; SPEERT, D. P. 1995. Nonopsonic phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* requires facilitated transport of D-glucose by macrophages. J. Immunol., 154: 3420-3428.
- BARLUND, C. S.; CARRUTHERS, T. D.; WALDNER, C. L.; PALMER, C. W. 2008. A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. Theriogenology 69:714–723.
- BAUMAN D. E. e VERNON R. G. 1993. Effects of exogenous bovine somatotropin on lactation. Annual Review of Nutrition; 13: 437-461
- BELL, A. W. 1995. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. J. Anim. Sci. 73:2804–2819.
- BELL A. W. e BAUMAN D. E. 1997. Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia.; 2: 265-278
- BERG, L. C.; THOMSEN, P. D.; ANDERSEN, P. H.; JENSEN, H. E.; JACOBSEN, S. 2011. Serum amyloid A is expressed in histologically normal tissues from horses and cattle. Vet Immunol Immunopathol;144(1–2):155–9
- BERTICS, S. J.; GRUMMER, R. R.; CADORNIGA-VALINO, C. e STODDARD, E. E. Effect of prepartum dry matter intake on liver triglyceride concentration and early lactation. Journal of Dairy Science 1992; 75: 1914-1922.
- BICHELL, D. P.; KIKUCHI, K. e ROTWEIN, P. 1992. Growth hormone rapidly activates insulin-like growth factor I gene transcription in vivo. Mol. Endocrinol. 6:1899-1908.
- BLAIR, H. T.; MCCUTCHEON, S. N.; MACKENZIE, D. D.; ORMSBY, J. E.; SIDDIQUI, R. A.; BREIER, B. H.; GLUCKMAN, P. D. 1988 Genetic selection

- for insulin- like growth factor-1 in growing mice is associated with altered growth. *Endocrinology* 123:1690–1692
- BLUM, J. W.; DOSOGNE, H.; HOEBEN, D.; VANGROENWEGHE, F.; HAMMON, H. M.; BRUCKMAIER, R. M.; BURVENICH, C. 2000. Tumor necrosis factor- α and nitrite/nitrate responses during acute mastitis induced by *Escherichia coli* infection and endotoxin in dairy cows. *Dom. Anim. Endocrinol.* 19:223–235.
- BOBE, G.; YOUNG, J. W. e BEITZ, D.C. 2004. Invited Review: Pathology, Etiology, Prevention, and Treatment of Fatty Liver in Dairy Cows, *Dairy Science*, v. 87, p. 3105-3124.
- BONNETT, B. N.; MARTIN, S. W.; MEEK, A. H. 1993. Associations of clinical findings, bacteriological and histological results of endometrial biopsy with reproductive performance of postpartum dairy cows. *Prev. Vet. Med.* 15:205–220.
- BOOSMAN, R.; MUTSAERS, C. W. A. A.; KLARENBECK, A. 1991. The role of endotoxin in the pathogenesis of acute bovine laminitis. *Vet. Q.* v. 13 p. 155–162
- BOOSMAN, R.; NIEWOLD, TH. A.; MUTSAERS, C. W. A. A.; GRUYS, E. 1989. Serum amyloid A concentrations in cows given endotoxin as an acute-phase stimulant. *Am. J. Vet. Res.* v. 50 p. 1690–1694.
- BROCKMAN, R. P. 2005. Glucose and short-chain fatty acid metabolism. In J. Dijkstra, J. M. Forbes and J. France (eds.), *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*, 2nd edition, CAB International, Wallingford, United Kingdom, pp. 291-310.
- BRODSKY, I. E. e MEDZHITOV, R. 2009. Targeting of immune signaling networks by bacterial pathogens. *Nat Cell Biol*;11(5):521–6.

- BRYANT, R. 2003. *Journal of Pediatric Nursing*, Vol 18, No 2 (April): 113-125.
- BURTON, J. L.; MADSEN, S. A.; YAO, J.; SIPKOVSKY, S. S.; E COUSSENS, P .M. 2003. An Immunogenomics Approach to Understanding Periparturient Immunosuppression and Mastitis Susceptibility in Dairy Cows. *Acta vet. scand.*, Suppl. 98, 71-88.
- BURTON, J. L.; KEHRLI, JR, M. E.; KAPIL., S.; HORST, R. L. 1995. Regulation of L-selectin and CD18 on bovine neutrophils by glucocorticoids: effects of cortisol and dexamethasone. *J. Leukoc. Biol.* 57:317-325.
- BURTON, J. L.; MCBRIDE B. W.; KENNEDY B. W.; BURTON J. H.; ELSASSER T. H.; WOODWARD B. 1991. Influence of Exogenous Bovine Somatotropin on the Responsiveness of Peripheral Blood Lymphocytes to Mitogen. *J. Dairy Sci* 74:916428.
- BUTLER, S. T.; MARR, A. L.; PELTON, S. H.; RADCLIFF, R. P.; LUCY, M. C. e BUTLER. W. R. 2003. Insulin restores GH responsiveness during lactation induced NEBAL in dairy cattle: Effects on expression of IGF-1 and GH receptor-1a. *Journal of Endocrinology.* 176: 205-217.
- BUTLER, W. R. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. 2000. *Animal Reproduction Science* 60–61:449–45
- BUTLER, W. R. e SMITH, R. D. 1989. Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72:767–783.
- CARROLL, J. A. e FORSBERG, N. E. 2007. Influence of stress and nutrition on cattle immunity. *Veterinary Clinics Food Animal.* v. 23, p. 105-149.
- CARROLL, J. A.; MCARTHUR, N. H.; WELSH, T. H. 2007. In vitro and in vivo temporal aspects of ACTH secretion: stimulatory corticotropin-releasing

- hormone and vasopressin in cattle. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*;54:7-14.
- CARROLL, J. A.; GILLESPIE, J. C.; WILLARD, S. T.; et al. 1993. Utilization of corticotropin-releasing factor and vasopressin to assess the pituitary-adrenocortical system in cattle [abstract]. *J Anim Sci*;71(Suppl 1):207.
- CECILIANI, F.; CERON, J. J.; ECKERSALL, P.D.; SAUERWEIN, H. 2012. Acute phase proteins in ruminants. *Journal of Proteomics* v. 75, p. 4207-4231.
- CERON, J. J.; ECKERSALL, P. D.; MARTYNEZ-SUBIELA, S. 2005. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Pathol* 34:85–99.
- CHAN, J.P-W.; CHANG, C-C.; HSU, W-I.; LIU, W-B. & CHEN, T-H. 2010. Association of increased serum acute-phase protein concentrations with reproductive performance in dairy cows with postpartum metritis. *Veterinary Clinical Pathology*, Vol.39, No.1, (March 2010), pp. 72-78
- CHAPINAL, N.; CARSON, M.; DUFFIELD, T. F.; CAPEL, M.; GODDEN, S.; OVERTON, M.; SANTOS J.E.P. e LEBLANC. S. J. 2011. The association of serum metabolites with clinical disease during the transition period. *J. Dairy Sci.* v. 94 p. 4897–4903.
- CHAPWANYA, A.; MEADE, K. G.; DOHERTY, M. L.; CALLANAN, J.; MEE, J. F.; O'FARRELLY, C. 2009. Histopathological and molecular evaluation of Holstein–Friesian cows postpartum: toward an improved understanding of uterine innate immunity. *Theriogenology*; 71(9):1396–407.
- CHEONG, S. H.; NYDAM, D. V.; GALVAO, K. N.; CROSIER, B. M.; GILBERT, E. R. O. 2011. Cow-level and herd-level risk factors for subclinical endometritis in lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* v. 94 p. 762–770.

- CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; FAULCONIER, Y.; BONNET, M.; ROULE, J. e BOCQUIER, F. 2000. Adipose tissue metabolisms and its role in adaptations to undernutrition in ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society*; 59: 127-134.
- CHRISTENSEN, J. O.; GRUMMER, R. R.; RASMUSSEN, F. E. e BERTICS, S. J. 1997. Effect of method of delivery of propylene glycol on plasma metabolites of feed-restricted cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 80, p. 563-568.
- CLARK, R. 1997. The somatogenic hormones and insulin-like growth factor-1-stimulators of lymphopoiesis and immune function. *Endocr Rev*;18(2):157-79.
- COLLARD, B. L.; BOETTCHER, P. J.; DEKKERS, J.C.M.; PETITCLERC, D.; SCHAEFFER, L. R. 2000. Relationships Between Energy Balance and Health Traits of Dairy Cattle in Early Lactation. *J Dairy Sci* 83:2683–2690
- CONTRERAS, G. A.; O'BOYLE, N. J.; HERDT, T. H.; SORDILLO, L. M. 2010. Lipomobilization in periparturient dairy cows influences the composition of plasma nonesterified fatty acids and leukocyte phospholipid fatty acids. *J. Dairy Sci.* 93:2508–2516.
- COOKE e BOHNERT. 2011. Technical note: Bovine acute-phase response after corticotrophin-release hormone challenge. *J. Anim. Sci.* 2011. 89:252–257.
- CRAY, C.; ZAIAS, J.; ALTMAN, N. H. 2009. Acute phase response in animals: A review. *Comp. Med.* 59:517-526.
- DANN, H. M.; LITHERLAND, N. B.; UNDERWOOD, J. P.; BIONAZ, M.; D'ANGELO, A.; MCFADDEN, J. W.; e DRACKLEY, J. K. 2006. Diets During Far-Off and Close-Up Dry Periods Affect Periparturient Metabolism and Lactation in Multiparous Cows. *J. Dairy Sci.* 89:3563–3577.

- DELUYKER, H. A., J. M. GAY, L. D. WEAVER, e A. S. AZARI. 1991. Change of milk yield with clinical diseases for a high producing dairy herd. *J. Dairy Sci.* 74:436–445.
- DEVRIES, M. J.; VAN DER BEEK, S.; KAAL-LANSBERGEN, L. M. T. E.; OUWELTJES, W.; e WILMINK, J. B. M. 1998. Modeling of energy balance in early lactation and the effect of energy deficits in early lactation on first detected estrus postpartum in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:1927–1934.
- DILDA, F.; PISANI, L. F.; RAHMAN, M. M.; MODINA, S.; TESSARO, I.; SARTORELLI, P.; et al. 2011. Distribution of acute phase proteins in the bovine forestomach and abomasum. *Vet J*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.05.005>.
- DONAGHY, A. J. e BAXTER, R. C. 1996 Insulin-like growth factor bioactivity and its modification in growth hormone resistant states. *Baillieres Clinical Endocrinology and Metabolism* 10 421–446.
- DRACKLEY, J. K. 1999. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? *J. Dairy. Sci.* 82:2259–2273.
- DRACKLEY, J. K.; OVERTON, T. R. e DOUGLAS, G. N. 2001. Adaptations of glucose and long-chain fatty acids metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. *Journal of Dairy Science*; 84 (E. Suppl.): E100-E112
- DYK, P. B. 1995. The association of prepartum non-esterified fatty acids and body condition with peripartum health problems on 95 Michigan dairy farms. Master of Science Thesis, Michigan State University,
- EATON, S.; KIM, B. e MORTEZA, P. Mammalian mitochondrial β -oxidation *Biochemical Journal* 1996; 320: 345-357.
- ECKERSALL P. D. e BELL R. 2010. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Veterinary Journal* 185, 23–27.

- EHRHARDT, R. A. e BELL, A. W. 1997. Developmental increases in glucose transporter concentration in the sheep placenta. *Am. J. Physiol.* (in press).
- ELENKOV, I. J. e CHROUSOS, G. P. 1999. Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease. *Trends Endocrinol Metab*;10(9):359–68
- ELSASSER, T. H.; RUMSEY T. S.; HAMMOND A. C. 1989. Influence of diet on basal and growth hormone-stimulated plasma concentrations of IGF-I in beef cattle. *Journal of Animal Science* 67(1):128-141
- ERB, H. N., R. D. SMITH, P. A. OLTENACU, C. L. GUARD, R. B. HILMAN, P. A. POWERS, M. C. SMITH, e M. E. WHITE. 1985. Path model of reproductive disorders and performance, milk fever, mastitis, milk yield, and culling in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 68:3337– 3349.
- FORSBERG, N. E.; WANG, Y.; PUNTENNEY, S.; BURTON, J. 2007. Effects of an immunostimulatory feed additive on neutrophil function and development of titer in ruminant livestock. *J. Anim. Sci.* Vol. 85, Suppl. 1 (Abstract).
- FRENCH, T. 1989. Acute phase proteins, p 201–235. In: Loeb WF, Quimby FW, editors. *The clinical chemistry of laboratory animals*. Oxford (UK): Pergamon Press.
- FRIEND, T. H. 1991. Behavioral aspects of stress. *J Dairy Sci*; 74(1):292–303.
- FRYBURG, D. A.; JAHN, L. A.; HILL, S. A.; OLIVERAS, D. M.; BARRETT, E. J. 1995. Insulin and insulin-like growth factor-I enhance human skeletal muscle protein anabolism during hyperaminoacidemia by different mechanisms. *J Clin Invest* 96:1722–1729

- FRYBURG D. A. 1994. Insulin-like growth factor I exerts growth hormone- and insulin-like actions on human muscle protein metabolism. *Am J Physiol* 267:E331–336.
- GAMELLI, R. L.; LIU, H.; HE, L. K.; HOFMANN, C. A. 1996. Augmentations of glucose uptake and glucose transporter-1 in macrophages following thermal injury and sepsis in mice. *J. Leukoc. Biol.*, 59: 639-647.
- GALVÃO, K. N.; FRAJBLAT, M.; BRITTIN, S. B.; BUTLER, W. R.; GUARD, C. L.; GILBERT, R. O. 2009. Effect of prostaglandin F₂ α on subclinical endometritis and fertility in dairy cow. *J. Dairy Sci.* 92:4906–4913
- GARVERICK, H. A.; HARRIS, M. N.; VOGEL-BLUEL, R.; SAMPSON, J. D.; BADER, J.; LAMBERSON, W. R.; SPAIN, J. N.; LUCY, M. C.; e YOUNGQUIST, R. S. 2013. Concentrations of nonesterified fatty acids and glucose in blood of periparturient dairy cows are indicative of pregnancy success at first insemination. *J. Dairy Sci.* 96 :181–188.
- GAULDIE J.; RICHARDS C.; HARNISH D.; LANSDORP P.; BAUMANN H. 1987. Interferon beta-2/B-cell stimulatory factor type-2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver-cells. *Proc Natl Acad Sci USA*;84(20): 7251–5.
- GILBERT, R. O.; SHIN, S. T.; GUARD, C. L.; ERB, H. N.; FRAJBLAT, M. 2005. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology* 64:1879–1888.
- GOFF, J. P. 2006. Major advances in our understanding of nutritional influences on bovine health. *J. Dairy Sci.* 89:1292–1301.
- GOFF, J. P. e HORST, R. L. 1997. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J. Dairy Sci.* 80:1260–1268.

- GOURMELEN, M.; LE BOUC, Y.; GIRARD, F.; BINOUX, M. 1984 Serum levels of insulin-like growth factor (IGF) and IGF binding protein in constitutionally tall children and adolescents. *J Clin Endocrinol Metab* 59:1197–1203.
- GRAVERSEN, J. H.; MADSEN, M.; MOESTRUP, S. K. 2002. CD163: a signal receptor scavenging haptoglobin-hemoglobin complexes from plasma. *Int J Biochem Cell Biol*; 34(4):309–14.
- GRANT, R. J. e ALBRIGHT, J. L. 1995. Feeding behavior and management factors during the transition period in dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 73:2791–2803.
- GRINBERG, N.; ELAZAR, S.; ROSENSHINE, I.; SHPIGEL, N. Y. 2008. Beta-hydroxybutyrate abrogates formation of bovine neutrophil extracellular traps and bactericidal activity against mammary pathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 76: 2802-2807
- GRONOWSKI, A. M. e ROTWEIN, P. 1995. Rapid changes in gene expression after in vivo growth hormone treatment. *Endocrinology* 136:4741-4748
- GRUM, D. E.; DRACKLEY, J. K.; YOUNKER, R. S.; LA COUNT, D. W. e VEENHUIZEN, J. J. 1996. Nutrition during the dry period and hepatic lipid metabolism of periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 79: 1850
- GRUMMER, R. R. 2016a. Nutrition and Management of Transition Dairy Cows: Controversies and Areas for Future Exploration In: CURSO “NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS”, 20. Uberlândia, MG. Anais. São Paulo, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, p.1-12.
- GRUMMER, R. R. Nutrition and Management of Transition Dairy Cows: What Have We Learned During the Past Twenty Years. 2016b. In: CURSO “NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS”, 20.

- Uberlândia, MG. Anais. São Paulo, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, p.1-12.
- GRUMMER, R. C. Doenças metabólicas relacionadas a energia: etiologia, impacto no desempenho do rebanho e métodos para monitorar. 2011. In: CURSO “NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS”, 15., Uberlândia, MG. Anais. São Paulo, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, p.1-7.
- GRUMMER, R. R. 1995. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *J. Anim. Sci.* v. 73, p. 2820–2833.
- GRUMMER, R. R. 1993. Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 76, p. 3882–3896.
- GULER, H. P.; ZAPF, J.; SCHEIWILLER, E.; FROESCH, E. R. 1988. Recombinant human insulin-like growth factor I stimulates growth and has distinct effects on organ size in hypophysectomized rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:4889–4893
- GUY, M. A.; MCFADDEN, T. B.; COCKRELL, D. C; e BESSER, T.E. 1994. Regulation of colostrums formation in beef and dairy cows. *J. Dairy Sci.* Vol. 77, No. 10, p. 3002-3007
- HAMMON, D. S.; EVJEN, I. M.; DHIMAN, T. R.; GOFF, J. P. e WALTERS, J. L. 2006. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 113:21–29.
- HANNON, K.; GRONOWSKI, A. e TRENKLE, A. 1991. Relationship of liver and skeletal muscle IGF-1 mRNA to plasma GH profile, production of IGF-1 by liver, plasma IGF-1 concentrations, and growth rates of cattle. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 196:155-163

- HAUSER, S. D.; MCGRATH, M. F.; COLLIER, R. J. e KRIVI, G. G. 1990. Cloning and in vivo expression of bovine growth hormone receptor mRNA. *Mol. Cell Endocrinol.* 72:187-200.
- HAYIRLI, A. 2006. The role of exogenous insulin in the complex of hepatic lipidosis and ketosis associated with insulin resistance phenomenon in postpartum dairy cattle. *Vet. Res. Commun.* 30:749-774.
- HAYIRLI, A.; GRUMMER, R. R.; NORDHEIM, E. V. e CRUMP, P. M.. 2002. Animal and dietary factors affecting feed intake during the prefresh transition period in Holsteins. *J. Dairy Sci.* 85:3430–3443
- HEINRICH, P.C.; CASTELL, J.V.; ANDUS, T. 1990. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochemistry Journal*, Vol.265, No.3, (February 1990), pp. 621-626
- HERDT, T. H. 2000. Ruminant adaptation to negative energy balance. Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 16:215–230.
- HERDT, T. H. 1997. Gastrointestinal physiology and metabolism. *Textbook of Veterinary Physiology*, 2nd edition. Edited by J.G. Cunningham. WB Sanders Company 1997. pp. 263-380.
- HIRVONEN, J.; PYORALA, S.; JOUSIMIES-SOMER, H. 1996. Acute phase response in heifers with experimentally induced mastitis. *Journal of Dairy Research* 63, 31–36.
- HISS, S.; MIELENZ, M.; BRUCKMAIER, R. M.; SAUERWEIN, H. 2004. Haptoglobin concentrations in blood and milk after endotoxin challenge and quantification of mammary HpmRNA expression. *J Dairy Sci*;87:3778–84.

- HUZZEY, J. M.; DUFFIELD, T. F.; LEBLANC, S. J.; VEIRA, D. M.; WEARY, D. M.; VON KEYSERLINGK, M. A. G. 2009. Short communication: Haptoglobin as an early indicator of metritis. *J. Dairy Sci.* 92:621–625.
- INGVARTSEN, K. L. e Moyes, M. K. 2015. Factors contributing to immunosuppression in the dairy cow during the periparturient period. *Japanese Journal of Veterinary Research* 63(Supplement 1): S15-S24.
- INGVARTSEN, K. L. e MOYES, K. M. 2013. Nutrition, immune function and health of dairy cattle. *Animal*, 7 (Suppl 1): 112-122
- INGVARSTEN, K. L. e MOYES, K. M. 2011. Nutrition, immune function and health of herbivores. *Adv. Anim. Biosci.*, 2: 575.
- INGVARTSEN, K. L. 2006. Feeding- and management-related diseases in the transition cow, physiological adaptations around calving and strategies to reduce feeding-related diseases. *Anim. Feed Sci Technol.*, 126:175-213
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) – Estatística da Produção Pecuária, Junho de 2015.
- JACOB, R.; BARRETT, E.; PLEWE, G.; FAGIN, K. D.; SHERWIN, R. S. 1989. Acute effects of insulin-like growth factor I on glucose and amino acid metabolism in the awake fasted rat. Comparison with insulin. *J Clin Invest* 83:1717–1723.
- JANEWAY, C. A. JR; TRAVERS, M.; WALPORT, M.; et al. *Immunobiology, the immune system in health and disease*. New York: Garland Science Publishing; 2005
- JAWOR, P. e STEFANIAK, T. 2011. Acute Phase Proteins in Cattle, Acute Phase Proteins as Early Non-Specific Biomarkers of Human and Veterinary Diseases, Prof. Francisco Veas (Ed.), ISBN: 978-953-307- 873-1, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/acute-phase-proteins-as-early->

nonspecificbiomarkers-of-human-and-veterinary-diseases/acute-phase-proteins-
in-cattle

- JONES, J. I. e CLEMMONS, D. R. 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins: Biological actions. *Endocr Rev* 16:3-34
- JORRITSMA, R.; WENSING, T.; KRUIP, T. A. M.; VOS, P. L. A. M.; NOORDHUIZEN, J. P. T. M. 2003. Metabolic changes in early lactation and impaired reproductive performance in dairy cows. *Vet. Res.* v. 34, p. 11–26.
- KANEENE, J. B.; MILLER, R. e HERDT, T. H. 1997. The absorption of serum NEFA and cholesterol, management and feeding practices with peripartum diseases in dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*; 31: 51-58
- KASIMANICKAM, R.; DUFFIELD, T. F.; FOSTER, R. A.; GARTLEY, C. J.; LESLIE, K. E.; WALTON, J. S.; JOHNSON, W. H. 2004. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology* 62:9–23.
- KATO, G. J. 2009. Haptoglobin halts hemoglobin's havoc. *J Clin Invest*; 119(8):2140-2.
- KESSLER E. C.; GROSS, J. J.; BRUCKMAIER, R. M. 2013. Different adaptation of IGF-I and its IGFBPs in dairy cows during a negative energy balance in early lactation and a negative energy balance induced by feed restriction in mid-lactation.. *Veterinari Medicina*, 58, (9): 459–467.
- KOBAYASHI, Y.; BOYD, C. K.; BRACKEN, C. J.; LAMBERSON, W. R.; KEISLER, D. H. e LUCY, M. C. 1999. Reduced growth hormone receptor (GHR) messenger RNA in liver of periparturient cattle is caused by a specific downregulation of GHR 1A that is associated with decreased insulin-like growth factor-I. *Endocrinology* 140:3947-3954.

- KOOIJMAN, R.; M., WILLEMS; H. C., DE HAAS; G. T., RIJKERS; A. L., SCHUURMANS; O. S., VAN-BUUL; C. J., HEIJNEN e B. J., ZEGERS. Expression of type I insulin-like growth factor receptors on human peripheral blood mononuclear cells. *Endocrinol* 1992;131(5):2244±50.
- KRONFELD, D. S. 1982. Major metabolic determinants of milk volume, mammary efficiency, and spontaneous ketosis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 65:2204
- KRYSKO, D. V.; AGOSTINIS, P.; KRYSKO, O.; GARG, A. D.; BACHERT, C.; LAMBRECHT, B. N.; et al. 2011. Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. *Trends Immunol*;32(4):157–64.
- LARON Z. 1999. Natural history of the classical form of primary growth hormone (GH) resistance (Laron syndrome). *J Pediatr Endocrinol Metab* 12[Suppl 1]:231–249.
- LARSON, M. A.; WEBER, A.; WEBER, A. T.; MCDONALD, T. L. 2005. Differential expression and secretion of bovine serum amyloid A3 (SAA3) by mammary epithelial cells stimulated with prolactin or lipopolysaccharide. *Vet Immunol Immunopathol*; 107(3 4):255–64.
- LAVERY, K.; WAY, A.; KILLIAN, G. 2003. Identification and immunohistochemical localization of a haptoglobin-like protein in the tissues and fluids of the bovine (*Bos taurus*) ovary and oviduct. *Reproduction*; 125:837–46.
- LEBLANC, S. 2010. Monitoring metabolic health in the Transition Period. *J. Reprod. Dev.*, 56:S29-S35.
- LEBLANC, S. J.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E.; BATEMAN, K. G.; KEEFE, G. P.; WALTON, J. S.; JOHNSON, W. H. 2002. Defining and diagnosing

- postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85:2223–2236.
- LECCHI, C.; AVALONE, G.; GIUROVICH, M.; ROCCABIANCA, P.; CECILIANI, F. 2009. Extra hepatic expression of the acute phase protein alpha 1-acid glycoprotein in normal bovine tissues. *Vet J*; 180(2):256–8.
- LEE, J. Y. e HWANG, D. H. 2006. The modulation of inflammatory gene expression by lipids: mediation through Toll-like receptors. *Mol. Cells*, 21: 174-185.
- LEE, J. Y.; ZHAO, L.; YOUN, H. S.; WEATHERILL, A. R.; TAPPING, R.; FENG, L.; LEE, W. H.; FITZGERALD, K. A.; HWANG, D. H. 2004. Saturated fatty acid activates but polyunsaturated fatty acid inhibits Toll-like receptor 2 dimerized with Toll-like receptor 6 or 1. *J. Biol. Chem.*, 279: 16971-16979.
- LEE, J. Y.; SOHN, K. H.; RHEE, S. H.; HWANG, D. 2001. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.*, 276: 16683-16689.
- LEIVA T., COOKE R.F., BRANDÃO A.P., ABOIN A.C., RANCHES J. e VASCONCELOS J.L.M. 2015a. Effects of excessive energy intake and supplementation with chromium propionate on insulin resistance parameters, milk production, and reproductive outcomes of lactating dairy cows. *LivestockScience*180:121–128
- LEIVA, T.; COOKE, R. F.; BRANDÃO, A. P.; MARQUES, R. S.; E VASCONCELOS, J. L. M. 2015b. Effects of rumen-protected choline supplementation on metabolic and performance responses of transition dairy cows. *J. Anim. Sci.* v. 93 p. 1896-1904.
- LE ROITH, D., BONDY, C.; YAKAR, S.; LIU, J. L. e BUTLER, A. 2001. The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr Rev* 22:53-74.

- LIMA, F. S.; SÁ FILHO, M. F.; GRECO, L. F. e SANTOS, J.E.P. 2011. Effect of feeding rumen-protected choline on performance, health, and reproduction of dairy cows. *The Vet. J.* 193: 140-145.
- LIMA, F. S.; SA FILHO, M. F.; GRECO, L. F.; SUSCA, F. ; MAGALHAES, V. J. A.; GARRETT, J.; e SANTOS, J. E. P. 2007. Effects of feeding rumen-protected choline (RPC) on lactation and metabolism. *J. Dairy Sci.* 90(Suppl. 1):174.
- LUCY, M. C. Glicose sanguínea em ruminantes: Um metabólito crítico para a reprodução de vacas em lactação. 2011. In: CURSO “NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS”, 15, Uberlândia, MG. Anais. São Paulo, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,. p.1-7.
- LUCY, M. C.; JIANG, H. e KOBAYASHI, Y. 2001. Changes in the Somatotrophic Axis Associated with the Initiation of Lactation. *J. Dairy Sci.* 84(E. Suppl.):E113-E119
- LUCY, M. C. 2000. Regulation of Ovarian Follicular Growth by Somatotropin and Insulin-Like Growth Factors in Cattle.. *Journal of Dairy Science* Vol. 83, No. 7.
- LUCY, M. C.; BOYD, C. K.; KOENIGSFELD, A. T.; OKAMURA, C. S. 1998. Expression of somatotropin receptor messenger ribonucleic acid in bovine tissues. *J. Dairy Sci.* 81:1889-1895.
- MALLARD, B. A.; DEKKERS, J. C.; IRELAND, M. J.; LESLIE, K. E.; SHARIF, S.; LACEY VANKAMPEN, C.; WAGTER, L. AND WILKIE, B. N. 1998. Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. *J. Dairy Sci.* 81:585–595
- MALLARD, B.A.; WAGTER, C. L.; IRELAND, M. J. e DEKKERS, J. C. M. 1997. Effects of growth hormone, insulin-like growth factor-I, and cortisol on

- periparturient antibody response profiles of dairy cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 60: 61-76.
- MARTINEZ-SUBIELA, S.; TECLES, F.; ECKERSALL, P. D.; CERON, J. J. 2002. Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis. *Veterinary Record* 150, 241–244.
- MCARDLE, C. A. e HOLTORF, A.-P. 1989. Oxytocin and progesterone release from bovine corpus luteal cells in culture: effects of insulin-like growth factor I, insulin and prostaglandins. *Endocrinology* 124:1278.
- MCCUBREY, J.A.; STEELMAN, L. S.; MAYO, M. W.; ALGATE, P. A.; DELLOW, R. A.; KALEKO, M. 1991. Growth promoting effects of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) on hematopoietic cells: overexpression of introduced IGF-1 receptor abrogates interleukin-3 dependency of murine factor-dependent cells by a ligand-dependent mechanism. *Blood*.78(4):921-9.
- MCDUGALL, S., MACAULAY, R.; COMPTON, C. 2007. Association between endometritis diagnosis using a novel intravaginal device and reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 99:9–23.
- MCGUIRE, M. A.; VICINI, J. L.; BAUMAN, D. E. E VEENHUIZEN, J. J. 1992. Insulin- like growth factors and binding proteins in ruminants and their nutritional regulation. *J. Anim. Sci.* 70:2901-2910.
- MCNAMARA, J. P. 1991. Regulation of Adipose Tissue Metabolism in Support of Lactation. *J. Dairy Sci.* 74:706-719.
- MCNAMARA, J. P. e HILLERS, J. K. 1986. Adaptations in lipid yielding metabolism of bovine adipose tissue in lactogenesis and lactation. *Journal of Lipid Research*; 27: 150- 157.

- MOBERG, G. P. 2000. Biological responses to stress: Implications for animal welfare. In: The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare, CAB International, Oxon, UK. p. 1-21.
- MOLINA, R. D.; MESCHIA, G.; BATTAGLIA, F. C. e HAY, W. W. 1991. Gestational maturation of placental glucose transfer in sheep. *Am. J. Physiol.* 261:R697-R704
- MOLENAAR, A. J.; KUYIS, Y. M.; DAVIS, S. R.; WILKINS, R. J.; MEAD, P. E.; TWEEDE, J. W. 1996. Elevation of lactoferrin gene expression in developing, ductal, resting, and regressing parenchymal epithelium of the ruminant mammary gland. *J Dairy Sci*;79(7):1198–208.
- MORIMATSU, M.; SYUTO, B.; SHIMADA, N.; FUJINAGA, T.; YAMAMOTO, S.; SAITO, M.; NAIKI, M. 1991. Isolation and characterisation of bovine haptoglobin from acute phase sera. *Journal of Biological Chemistry* 266, 11833–11837.
- MOSMANN, T. R. e SAD S. 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today*;17(3):138–46.
- MOYES, K. M.; LARSEN, T.; INGVARTSEN, K. L. 2013. Generation of an index for physiological imbalance and its use as a predictor of disease in dairy cows during early lactation. *J. Dairy Sci.*, 96: 2161–2170.
- MUNCK, A.; GUYRE, P. M.; HOLBROOK, N. J. 1984. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr Rev*;5(1):25–44.
- MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet J*;168:28–40.

- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). 1989. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. Natl. Acad. Sci., Washington, DC
- NELSON, D. L. e COX M. M., Lipids. In: Nelson D. L., Cox M. M., Lehninger Principles of Biochemistry. New York, NY: W. H. Freeman and Company, 2005. p. 343-368.
- NEVILLE, M. C.; ALLEN, J. C. e WATTERS, C. 1983. The mechanisms of milk secretion. In: M. C. Neville and M. R. Neifert (Ed.) Lactation: Physiology, Nutrition, and Breast-Feeding. Pp 49–92. Plenum, New York
- NEWSHOLME, P. e NEWSHOLME, E. A. 1989. Rates of utilization of glucose, glutamine and oleate and formation of end-products by mouse peritoneal macrophages in culture. Biochem. J., 261: 211-218.
- NEWSHOLME, P.; GORDON, S.; NEWSHOLME, E. A. 1987. Rates of utilization and fates of glucose, glutamine, pyruvate, fatty acids and ketone bodies by mouse macrophages. Biochem. J., 242: 631-636
- NIGHTINGALE, C.R.; SELLERS, M.D.; PEPPER-YOWELL, A.R.; CHAPMAN, J.D.; O’CONNOR, D.L.; BALLOU, M.A. 2013. OmniGen-AF® supplementation improves leukocyte responses and hematology of multiparous peripartum cows. Joint Annual Meeting (Abstract).
- ONO, N.; LUMPKIN, M. D.; SAMSON, W. K. 1984. Intrahypothalamic action of corticotrophin-releasing factor (CRF) to inhibit growth hormone and LH release in the rat. Life Sci; 35(10): 1117–23
- ORTIZ-MARTY, R. J.; FORSBERG, N. E.; CHAPMAN, J. D.; MULLARKY, I. K. 2012. OmniGen-AF® restores GR-1, L-selectin, and RANTES expression by immunosuppressed murine PMN challenged with lipopolysaccharide in a MyD88-dependent manner. Joint Annual Meeting (Abstract).

- OSPINA, P. A.; NYDAM, D. V.; STOKOL, T. e OVERTON, T. R. 2010. Association between the proportion of sampled transition cows with increased nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate and disease incidence, pregnancy rate, and milk production at the herd level. *J. Dairy Sci.* 93:3595-3601.
- OVERTON, T. R. 2003. Managing the metabolism of transition cows. Proceedings of the 6th Western Dairy Management Conference, March 12-14, , Reno, Nevada.
- PALTRINIERI, S. 2008. The feline acute phase reaction. *Vet J* 177:26–35.
- PETERSEN, H. H.; NIELSEN, J. P.; HEEGAARD, P. M. H. 2004. Application of acute phase protein measurement in veterinary clinical chemistry. *Vet Res*;35:163–87.
- PHILIPPIDIS, P.; MASON, J. C.; EVANS, B. J.; NADRA, I.; TAYLOR, K. M.; HASKARD, D. O. 2004. Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis — antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery. *Circ Res*;94(1):119–26
- PITHON-CURI, T. C.; DE MELO, M. P.; CURI, R. 2004. Glucose and glutamine utilization by rat lymphocytes, monocytes and neutrophils in culture: a comparative study. *Cell Biochem. Funct.*, 22: 321-326.
- PLOTSKY, P. M.; CUNNINGHAM, J.; WIDMAIER, E. P. 1989. Catecholaminergic modulation of corticotropin-releasing factor and adrenocorticotropin secretion. *Endocr Rev*; 10(4): 437–58
- PUNTENNEY, S. B.; WANG, Y.; ROWSON, A.; FORSBERG, N. E. 2010. Effects of OmniGen-AF on development of humoral immune responses in beef cattle and in rats following a vaccination program. *J. Anim. Sci.* Vol. 88, E-Suppl. 2(Abstract).
- RAHMAN, M.; LECCHI, C.; AVALLONE, G.; ROCCABIANCA, P.; SARTORELLI, P.; CECILIANI, F. 2010. Lipopolysaccharide-binding protein: local expression in bovine extrahepatic tissues. *Vet Immunol Immunopathol*;137(1–2):28–35.

- RAJALA-SCHULTZ, P. J., Y. T. GROHN, e C. E. MCCULLOCH. 1999. Effects of milk fever, ketosis, lameness on milk yield in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:288–294.
- RENIER, G., CLEMENT, I.; DESFAITS, A.C. e LAMBERT, A. Direct stimulatory effect of insulin-like growth factor-I on monocyte and macrophage tumor necrosis factor-alpha production. *Endocrinol* 1996;137(11):4611-8.
- RHOADS, M. L.; MEYERJ. P.; KOLATH S. J.; LAMBERSON, W. R.; LUCY, M. C. 2008. Growth Hormone Receptor, Insulin-Like Growth Factor (IGF)-1, and IGF-Binding Protein-2 Expression in the Reproductive Tissues of Early Postpartum Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 91:1802–1813.
- RHOADS, R. P.; KIM, J. W.; LEURY, B. J.; BAUMGARD, L. H.; SEGOALE, N.; FRANK, S. J.; BAUMAN, D. E. e BOISCLAIR Y. R. 2004. Regulation of the GH receptor by insulin in dairy cows. *Journal of Nutrition*; 134: 1020-1027.
- RICHARDS, B. F. 2011. Strategies to Decrease Fatty Liver in Dairy Cows. PhD Thesis. University of Illinois, Urbana-Champaign.
- RINDERKNECHT E. e HUMBEL R. E. 1978. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 253:2769-2776
- RIVIER, C. e VALE, W. 1983. Interaction of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin on adrenocorticotropin secretion in vivo. *Endocrinology*; 113(3):939–42.
- ROWSON, A.; PUNTENNEY, S.; FORSBERG, N. E. 2011. Array analysis of mucosal gene expression in the intestine of rats following ingestion of OmniGen-AF. Midwest ADSA/ASAS (Abstract).
- ROWSON, A.; WANG, Y. Q.; AALSETH, E.; FORSBERG, N. E.; PUNTENNEY, S. B. 2008. Ability of an immunomodulatory feed additive to reduce infection of

- the murine mammary gland with *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Anim. Sci.* Vol. 86, E-Suppl. 2.
- ROWSON, A.; PUNTENNEY, S. B. ; AALSETH, E.; WANG, Y. Q.; FORSBERG, N. E. 2009. Use of OmniGen-AF to reduce mammary *E. coli* infection and to augment mucosal immunity in a murine model of bovine mastitis. Midwest ADSA/ASAS (Abstract).
- RUKKWAMSUK T.; GEELEN, M. J.; KRUIP, e T. A.; WENSING, T. 2000. Interrelation of fatty acid composition in adipose tissue, serum, and liver of dairy cows during the development of fatty liver postpartum. *J Dairy Sci.* 83(1):52-59.
- RUNCIMAN, D. J.; ANDERSON, G. A.; MALMO, J.; DAVIS, G. M. 2008. Use of postpartum, vaginoscopic (visual vaginal) examination of dairy cows for the diagnosis of endometritis and the association of endometritis with reduced reproductive performance. *Aust. Vet. J.* 86:205–213.
- SALMON, W.D. e DAUGHADAY, W.H. 1957. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J Lab Clin Med* 49:825–82
- SANO, H., M.; NAKAI, T.; KONDO e TERASHIMA, Y. 1991. Insulin responsiveness to glucose and tissue responsiveness to insulin in lactating, pregnant, and nonpregnant, nonlactating beef cows. *J. Anim. Sci.* 69:1122–1127.
- SANO, H.; NARAHARA, S.; KONDO, T.; TAKAHASHI, A. e TERASHIMA, Y. 1993. Insulin responsiveness to glucose and tissue responsiveness to insulin during lactation in dairy cows. *Domestic Animal Endocrinology.* 10:191-197.
- SAREMI, B.; MIELENZ, M.; HOSSEINI, A.; BEHRENDT, C.; VORSPOHL, S.; SAUERWEIN, H. 2010. Haptoglobin expression in different adipose tissues and

- adipocytes (in vitro) of dairy cows. Proc 19th Symp of the German Veterinary Society, Section Physiology and Biochemistry, Hannover;. p. 25.
- SASAKI, S. 2002. Mechanism of insulin action on glucose metabolism in ruminants. *Animal Science Journal* 73, 423–433
- SATO, H.; MATSUMATO, M. e HANASAKA S. 1999. Relations between plasma acetate, 3-hydroxybutyrate, FFA, glucose levels and energy nutrition in lactating dairy cows. *Journal of Veterinary Medical Science*; 61: 447-451
- SCHAER, C. A.; SCHOEDON, G.; IMHOF, A.; KURRER, M. O.; SCHAER, D. J. 2006. Constitutive endocytosis of CD163 mediates hemoglobin-heme uptake and determines the noninflammatory and protective transcriptional response of macrophages to hemoglobin. *Circ Res*;99(9):943–50.
- SCHAMS, D.; KOLL, R. e LI, C. H. 1988. Insulin-like growth factor-' stimulates oxytocin and progesterone production by bovine granulosa cells in culture. *J. Endocrinol.* 116:97.
- SCHLEIMER, R. P. 2004. Glucocorticoids suppress inflammation but spare innate immune responses in airway epithelium. *Proc Am Thorac Soc*; 1(3):222–30
- SENATORE, E. M.; BUTLER, W. R. e OLTENACU P. A. 1996. Relationships between energy balance and post-partum ovarian activity and fertility in first lactation dairy cows. *Anim. Sci.* 62:17–23
- SELYE, H. 1936. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*, v. 138, n.32
- SHELDON, I. M.; LEWIS, G. S.; LEBLANC, S.; GILBERT, R. O. 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* 65:1516–1530.

- SHELDON, I. M.; NOAKES, D. E.; RYCROFT, A.; DOBSON, H. 2001. Acute phase protein responses to uterine bacterial contamination in cattle after calving. *Vet Rec*; 148:172–5.
- SILVA-DEL-RIO, N.; FRICKE, P. M.; e GRUMMER, R. R. 2010. Effects of twin pregnancy and dry period feeding strategy on milk production, energy balance, and metabolic profiles in dairy cows. *J. Anim. Sci.* 88:1048-1060.
- SILVESTRE, F. T.; CARVALHO, T. S. M.; FRANCISCO, N.; SANTOS, J. E. P.; STAPLES, C. R.; JENKINS, T. C.; THATCHER, W. W. 2011a. Effects of differential supplementation of fatty acids during the peripartum and breeding periods of Holstein cows: I. Uterine and metabolic responses, reproduction, and lactation. *J. Dairy Sci.* 94:189–204.
- SILVESTRE, F. T.; CARVALHO, T. S. M.; CRAWFORD, P. C.; SANTOS, J. E. P.; STAPLES, C. R.; JENKINS, T. C.; THATCHER, W. W. 2011b. Effects of differential supplementation of fatty acids during the peripartum and breeding periods of Holstein cows: II. Neutrophil fatty acids and function, and acute phase proteins. *J. Dairy Sci.* 94:2285–2301.
- SKOVGAARD, K.; MORTENSEN, S.; BOYE, M.; POULSEN, K. T.; CAMPBELL, F. M.; ECKERSALL, P. D.; et al. 2009. Rapid and widely disseminated acute phase protein response after experimental bacterial infection of pigs. *Vet Res*;40(3).
- SIMMONS, M. A.; BATTAGLIA, F. C. e MESCHIA, G. 1979. Placental transfer of glucose. *J. Develop. Physiol.* 1:227-243.
- SMITH, J. M.; DIAZ, M. C.; VANAMBURGH, M. E. e LUCY, M.C. 1999. Metabolic responses to short-term bST administration in milk-fed bull calves between birth and 100 days of age. *J. Anim Sci.* 77(Suppl. 1):157. (Abstr.)

- SORDILLO, L. M. E PEEL, J. E. 1992. Effect of interferon- γ on the production of tumor necrosis factor during acute *Escherichia coli* mastitis. *J. Dairy Sci.* v. 75 p. 2119–2125.
- SORDILLO, L. M. e RAPHAEL, W. 2013. Significance of Metabolic Stress, Lipid Mobilization, and Inflammation on Transition Cow Disorders. *Vet Clin Food Anim* v. 29 p. 267–278.
- STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W. e CLARK J. H. 1990. Relationship between ovarian activity and energy status during the early postpartum period of high producing dairy cows. *Journal of Dairy Science*; 73: 938-943
- TAYLOR, V. J.; CHENG, Z.; PUSHPAKUMARA, P. G. A.; BEEVER, D. E. E WATHES, D. C. 2004. Relationships between the plasma concentrations of insulin-like growth factor-I in dairy cows and their fertility and milk yield. *The Veterinary Record*, November 6. Downloaded from veterinaryrecord.bmj.com.
- THATCHER, W.W.; BILBY, T.R.; BARTOLOME, J.A.; SILVESTRE, F.; STAPLES, C.R. e SANTOS, J.E.P. 2006. Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. *Theriogenology* 65:30–44
- THIELEN, M.; MIELENZ, M.; HISS, S.; ZERBE, H.; PETZL, W.; SCHUBERTH, H.; et al. 2007. Short communication: cellular localization of haptoglobin mRNA in the experimentally infected bovine mammary gland. *J Dairy Sci*; 90(3):1215–9.
- THISSEN, J. P., KETELSLEGERS, J. M. e UNDERWOOD, L. E. 1994. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocrine Rev.* 15:80-101
- UCHIDA, E.; KATOH, N. E TAKAHASHI, K. 1993. Appearance of haptoglobin in serum from cows at parturition. *Journal of Veterinary Medical Science*, Vol.55, No.5, pp. 893-894

- UNDERWOOD, J. P. Effects of feeding palatability enhancer in transition cow diet on performance of Holstein dairy cows. Master of Science Thesis, University of Missouri- Columbia, 1998.
- VAZQUEZ-AÑON, M.; BERTICS, S.; LUCK, M. e GRUMMER, R. R. 1994. Peripartum liver triglyceride and plasma metabolites in dairy cows. *Journal of Dairy Science*; 77: 1521-1528
- VERNON, R. G. e SASAKI, S. 1991. Control of responsiveness of tissues to hormones. In *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants*. Edited by T. Tsuda, Y. Sasaki and R. Kawashima, *Proceedings 7th International Symposium on Ruminant Physiology*. Academic Press, San Diego, pp. 155-182
- VILELA, D.; LEITE B. L. J. e RESENDE, J. C.; 2002. Políticas para o Leite no Brasil: Passado, presente e futuro. *Anais do Sul- Leite: Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil / editores Geraldo Tadeu dos Santos et al. – Maringá : UEM/CCA/DZO – NUPEL, 2002. 212P. Artigo encontra-se nas páginas 1-26.*
- WAGNER, K. W. 1987. Adrenocorticotropin (ACTH) secretion by primary cultures of bovine adrenohypophyseal cells in response to corticotropin-releasing factor and vasopressin: evidence for modulation through both adenylate cyclase and protein kinase C. *Texas A&M University Library, College Station (TX)*;
- WALDRON, M. R. 2011. Interações entre Metabolismo e Imunidade no Periparto. In: CURSO “NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS”, 15. Uberlândia, MG. *Anais. São Paulo, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” p.1-8.*
- WANG, Y.-Q.; PUNTENNEY, S. B.; BURTON, J. L.; FORSBERG N. E. 2009a. Use of gene profiling to evaluate the effects of a feed additive on immune function in

- periparturient dairy cattle. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 93:66–75.
- WANG, Y.-Q.; ROWSON, A.; FORSBERG, N. E.; PUNTENNEY, S. B. 2009b. Effects of OmniGen-AF on mammary mucosal responses to an *Escherichia coli* challenge. *J. Anim. Sci.* Vol. 87, E-Suppl. 2.(Abstract).
- WATHES, D. C.; CHENG, Z.; CHOWDHURY, W.; FENWICK, M. A.; FITZPATRICK, R.; MORRIS, D. G.; PATTON, J. e MURPHY, J. J. 2009. Negative energy balance alters global gene expression and immune responses in the uterus of postpartum dairy cows. *Physiol Genomics* 39: 1–13.
- WEBER, P. S.; MADSEN, S. A.; SMITH, G. W.; IRELAND, J. J.; BURTON, J. L. 2001. Pre-translational regulation of neutrophil L-selectin in glucocorticoid-challenged cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 83:213-240.
- WERLING, D.; SUTTER, F.; ARNOLD, M.; KUN, G.; TOOTEN, P. C. J.; GRUYS, E.; KREUZER, M.; LANGHANS, W. 1996. Characterisation of the acute phase response of heifers to a prolonged low dose infusion of lipopolysaccharide. *Res. Vet. Sci.* v. 61 p.252–257.
- YANG, F. M.; HAILE, D. J.; BERGER, F. G.; HERBERT, D. C.; VAN BEVEREN, E.; GHIO, A. J. 2003. Haptoglobin reduces lung injury associated with exposure to blood. *American Journal of Physiology and Lung Cell Molecular Physiology* 284, L402–L409.
- ZHAO, F.Q.; GLIMM, D. R.; e KENNELLY, J. J. 1993. Distribution of mammalian facilitative glucose transporter messenger RNA in bovine tissues. *Int. J. Biochem.* 25:1897.

- ZHAO, F.Q.; DIXON, W. T. e KENNELLY, J. J. 1996. Localization and gene expression of glucose transporters in bovine mammary gland. *Comp. Biochem. Physiol.* 115B:127–134.
- ZHOU, Y.; XU, B. C.; MAHESHWARI, H. G.; HE, L.; REED, M.; LOZYKOWSKI, M.; OKADA, S.; CATALDO, L.; COSCHIGAMO, K.; WAGNER, T. E.; BAUMANN, G.; KOPCHICK, J. J. 1997. A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/ binding protein gene (the Laron mouse). *Proc Natl Acad Sci USA* 94:13215–13220 175.

CAPÍTULO II

SUPLEMENTAÇÃO COM OMNIGEN-AF® PARA VACAS LEITEIRAS EM PERÍODO DE TRANSIÇÃO E INÍCIO DE LACTAÇÃO: IMPACTOS FISIOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS

RESUMO

Vacas leiteiras passam por muitas mudanças fisiológicas e metabólicas durante o período de transição (Gummer, 1995; Drackely, 1999). Essas prejudicam o sistema imune, expondo os animais a distúrbios metabólicos e doenças infecciosas (Mallard et al., 1998). Omingen-AF® (**OMN**) é um produto comercial que demonstrou potencial de modular a resposta imune de animais de produção (Wang et al., 2009). Com o objetivo de avaliar o potencial de OMN como suplemento nutricional para vacas leiteiras durante o período de transição, este estudo comparou parâmetros produtivos, fisiológicos e de saúde em vacas leiteiras suplementadas ou não com OMN durante o período de transição. Trinta e oito vacas mestiças Holandês-Gir prenhas, múltiparas e não-lactantes foram classificadas por peso corporal (PC) e escore de condição corporal (ECC) e designadas a receber (**OMN**; n=19) ou não (**CON**; n=19) 56 g/vaca/dia de OMN iniciando 35 dias antes da data estimada para o parto. Omnigen foi suplementado individualmente às vacas sobre o concentrado oferecido durante o período da manhã. Antes do parto, o PC e ECC das vacas foi aferido semanalmente e amostras de sangue foram coletadas a cada 5 dias, iniciando no d-35 em relação à data prevista para a parição. Após o parto e até 46 dias em leite (DEL), o PC e ECC foram aferidos também semanalmente. O registro da produção de leite individual e a coleta de amostras de leite para análise de sólidos totais e Contagem de Células Somáticas (CCS) e de amostras de sangue de 0 a 7 DEL foram realizados diariamente. De 9 a 21 DEL, amostras foram coletadas em dias alternados e de 26 a 46 DEL, a cada 5 dias. Todas as amostras de sangue, do pré e pós-parto, foram avaliadas para cortisol, ácidos graxos não-esterificados (AGNE), insulina, glicose, haptoglobina, cortisol e IGF-1. Nos dias 30 e

46 após o parto vacas foram avaliadas para endometrite através da técnica do *cytobrush*, baseada na porcentagem de células polimorfonucleadas (PMN) no total de uma contagem de 100 células (PMN + células endometriais). No dia $48,7 \pm 1,6$ após o parto, 9 vacas de cada tratamento receberam uma injeção de lipopolissacarídeo (LPS) ($0,25\mu\text{g/kg}$ de PC) e amostras de sangue foram coletadas a cada hora de -2h até 8h após a injeção às 0h; a cada 12h das 12 às 72h e a cada 24h das 96 às 120h. Amostras de sangue coletadas durante o desafio de LPS foram analisadas para haptoglobina e de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Não foi observado efeito de tratamento sobre o PC ($P \geq 0,15$), ECC ($P \geq 0,55$), concentrações séricas de cortisol, AGNE, insulina, glicose, haptoglobina, cortisol e IGF-1. Vacas recebendo OMN apresentaram maior ($P = 0,02$) produção de leite ($30,3\text{kg/d}$ vs. $27,1\text{kg/d}$) e maior ($P = 0,04$) porcentagem de células PMN na população celular endometrial ($12,2\%$ vs. $3,9\%$) quando comparadas com vacas recebendo CON. Após a administração do LPS, vacas do grupo OMN apresentaram concentração sérica média superior ($P = 0,04$) de haptoglobina ($212\mu\text{g/mL}$ vs. $94\mu\text{g/mL}$ para vacas dos grupos OMN e CON, respectivamente) assim como maior concentração plasmática de TNF- α ($P \leq 0,04$) nos momentos 1 ($1,34$ vs. $2,35\text{ ng/mL}$ para OMN e CON respectivamente), 2 ($0,79$ vs. $2,01\text{ ng/mL}$, para OMN e CON respectivamente) e 3h ($0,41$ vs. $1,34\text{ ng/mL}$, para OMN e CON respectivamente) em relação à injeção de LPS. Em conclusão, a suplementação de Omnigen-AF® durante o período de transição elevou a concentração plasmática de marcadores da resposta imune inata e aumentou a produção de leite em vacas leiteiras.

Palavras-chave: Inflamação, período de transição, produção de leite, Omnigen-AF

OMNIGEN-AF® SUPPLEMENTATION FOR TRANSITION AND EARLY LACTATION DAIRY COWS: PHYSIOLOGIC AND IMMUNOGIC IMPACTS

ABSTRACT

Dairy cows undergo several physiological and metabolic changes during the transition period. (Grummer, 1995; Drackley, 1999). These changes impair the immune function and cows become more susceptible to infectious and metabolic diseases (Mallard et al., 1998). Omnigen-AF® (**OMN**) is a commercial feed ingredient that has been shown to modulate the immune response in livestock animals (Wang et al., 2009). Aiming to evaluate the potential of OMN as a feed additive for transition dairy cows, this study compared physiological, health, and productive parameters in dairy cows supplemented or not with OMN during the transition period. Thirty-eight non-lactating, multiparous, pregnant Holstein × Gir cows were ranked by body weight (BW) and body condition score (BCS), and assigned to receive (**OMN**; n = 19) or not (**CON**; n = 19) 56 g/cow daily (as-fed basis) of OMN beginning 35 d prior to expected calving date. Omnigen was individually offered to cows as top-dressing into the morning concentrate feeding. Before calving, cow BW and BCS were recorded weekly and blood samples collected every 5 d beginning on d -35 relative to expected calving date. After calving and until 46 DIM, BW and BCS were recorded weekly. Individual milk production was recorded and milk samples were collected daily for total solids and SCC analyses. Blood was sampled daily from 0 to 7 DIM, every other day from 9 to 21 DIM, and every 5 d from 26 to 46 DIM. All blood samples were evaluated for cortisol, non-esterified fatty acids (NEFA), insulin, glucose, haptoglobin and IGF-1. On 30 and 46 DIM, cows were evaluated for endometritis via cytobrush technique, based on the % of polymorphonuclear (**PMN**) cells within 100 total cell count (PMN + endometrial cells). On 48.7 ± 1.6 DIM, 9 cows/treatment received a lipopolysaccharide (**LPS**) injection

(0.25 µg/kg of BW), and blood was sampled hourly from -2 to 8 h, at 12-h intervals from 12 to 72 h, and at 24-h intervals from 96 to 120 h relative to LPS administration at hour 0. Blood samples collected during the LPS challenge were analyzed for haptoglobin and tumor necrosis factor alpha (TNF-α). No treatment differences were detected on BW ($P \geq 0.15$), BCS ($P \geq 0.55$), serum concentrations of cortisol, NEFA, insulin, glucose, haptoglobin, cortisol, and IGF-I. Cows receiving the OMN diet had greater milk yield (30.3 vs. 27.1 kg/d, $P = 0.02$) and percentage of PMN cells in endometrial cell population (12.2 vs. 3.9%, $P = 0.04$) compared with CON cows. After LPS administration, OMN cows had greater ($P = 0.04$) mean serum haptoglobin (212 vs. 94 µg/mL, for OMN and CON, respectively), as well as greater ($P \leq 0.04$) plasma concentrations of TNF-α at 1, (1.34 vs. 2.35 ng/mL for OMN e CON respectively), 2 (0.79 vs. 2.01 ng/mL, for OMN e CON respectively) and 3h (0.41 vs. 1.34 ng/mL, for OMN e CON respectively) relative to LPS injection. In conclusion, supplementing Omnigen-AF® during the transition period increased plasma concentrations of innate immunity markers and increased milk yield of transition dairy cows.

Key Words: Inflammation, milk production, Omnigen-AF, transition cows

1. INTRODUÇÃO

Durante o período de transição, vacas leiteiras passam por mudanças fisiológicas associadas com o parto e estabelecimento da lactação que comprometem sua função imune (Mallard et al., 1998; Drackey, 1999). Essas incluem aumento da lipólise, desacoplamento dos eixos somatotrópico e insulina-glicose, processos inflamatórios, que devido à função imune comprometida podem ser frequentes e persistentes (Grummer, 1995; Sheldon et al., 2001). Consequentemente, vacas em período de transição são altamente susceptíveis a distúrbios metabólicos e doenças infecciosas que afetam diretamente sua produtividade e bem-estar (Goff e Horst, 1997; Mallard et al., 1998). Portanto, buscam-se estratégias de manejo que interajam com a fisiologia e o metabolismo de vacas leiteiras e beneficiem a imunocompetência durante o período de transição, a fim de reduzir a ocorrência de problemas de saúde nos animais, o que satisfaz as necessidades de bem estar animal bem como favorece a rentabilidade dos sistemas de pecuária leiteira (Overton e Waldron, 2004).

Omnigen-AF® (OMN) é um suplemento alimentar baseado principalmente em compostos de leveduras e vitaminas do complexo B, que tem se mostrado um estimulante às funções do sistema imunológico. A suplementação com OMN melhorou parâmetros da imunidade inata de ovinos recebendo dexametasona (Wang et al., 2007) e resposta leucocitária de novilhas Holandesas saudáveis (Ryman et al., 2013). Wang et al. (2009) suplementaram OMN a vacas Jersey durante o período de transição e reportaram aumento do número de leucócitos totais e da expressão de mRNA de citocinas pró-inflamatórias nos animais suplementados. Associados a esses resultados foi sugerido um aumento da atividade do sistema imune inato em resposta à suplementação com OMN, embora os impactos no metabolismo, sanidade e produção

de vacas leiteiras no período de transição em relação ao aditivo ainda precisem ser investigados.

Desta forma a hipótese deste estudo foi que a suplementação com OMN para vacas leiteiras estimularia a função imunológica durante o período de transição resultando em aumento da produção de leite. Para este fim, o presente estudo avaliou parâmetros metabólicos (concentrações plasmáticas de glicose, insulina, AGNE, IGF-1, PC e ECC), produtivos (produção diária e porcentagem de sólidos totais do leite) e de saúde (concentrações plasmáticas de haptoglobina e cortisol durante o período de transição, concentrações plasmáticas de haptoglobina e TNF- α diante desafio com LPS e avaliação da endometrite) de vacas leiteiras suplementadas ou não com OMN desde o período pré-parto até 46 dias em lactação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi conduzido no Setor de Bovinocultura de Leite da Fazenda Lageado da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, no câmpus de Botucatu, SP. Todas as técnicas e práticas de manejo aplicadas aos animais utilizados neste experimento foram relatadas e aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ/UNESP (Protocolo nº 16/2015 – CEUA).

2.1. Animais e Dietas

Trinta e oito vacas múltíparas, prenhas, não-lactantes mestiças Holandês-Gir de (média inicial $\pm$ erro padrão) PC: 638 kg $\pm$ 12kg e ECC: 3,33 $\pm$ 0,08 foram classificadas de acordo com paridade, PC e ECC (Wildman et al., 1982) em ordem decrescente e alternadamente designadas a receber (OMN; n=19) ou não (CON; n = 19) 56 g/vaca/dia de Omnigen-AF®, composto por uma mistura ativa desidratada *Saccharomyces*

cerevisiae, produto de fermentação desidratada de *Trichoderma longibrachiatum*, niacina, vitamina B12, riboflavin-5-fosfato, *d*- pantotenato de cálcio, cloreto de colina, biotina, tiamina monoidratada, hidrocloreto de piroxidina, bisulfato de metionina, dimetilpirimidinol, ácido fólico, aluminossilicato de sódio, terra diatomácea, carbonato de cálcio, casca de arroz e óleo mineral – formulação completa não é de domínio público (Phibro Animal Health Corporation, Guarulhos, SP). Iniciou-se a suplementação 35 dias antes da data esperada para parição. Essa alocação dos animais foi utilizada para garantir que os grupos tivessem paridade (OMN = $5,3 \pm 0,3$ paridades; CON = $5,2 \pm 0,3$ paridades), PC e ECC (Tabela 1) similares no início do experimento.

Durante o período pré-parto as vacas eram mantidas em piquete sem pasto com acesso *ad libitum* à silagem de milho (1,5 m de espaço linear de cocho por animal) e água. As vacas recebiam individualmente 3 kg de concentrado diariamente por meio de sistema de canzil. A composição do concentrado (em matéria natural) era de 45,5% de farelo de soja, 45,5% de milho moído e 9% de premix comercial pré-parto (Milk Ionic, M. Cassab Tecnologia Animal, São Paulo, SP; composição: 25% Ca; 4,7% S; 4,5% Mg; 3,3% Cl; 0,001% Se; 422.000 IU/kg de vitamina A; 21.200 IU/kg de vitamina D3 e 0,211% de vitamina E). Todas as vacas consumiam totalmente seu concentrado em no máximo 30 minutos após oferecimento.

Após o parto as vacas foram alocadas em piquete adjacente sem pasto e tinham acesso *ad libitum* à água e ao mineral para vacas lactantes (Milk MAC, M. Cassab Tecnologia Animal, São Paulo, SP; 22% Ca; 7,5% P, 6,5% Na; 1,0% K; 3,6% Mg; 2,0% S; 0,003% Co; 0,115% Cu; 0,004% I; 0,220% Mn; 0,003% Se; 0,400% Zn; 400.000 IU/kg de vitamina A; 100.000 IU/kg de vitamina D3; e 0,150% de vitamina E). As vacas eram ordenhadas duas vezes por dia (6h00 e 17h00), divididas em dois lotes aos quais eram oferecidos 35 kg de matéria natural de silagem de milho por vaca (1,5m

de espaço linear de cocho por animal) e recebiam concentrado individualmente por meio do sistema de canzins duas vezes ao dia imediatamente após as ordenhas. A composição do concentrado (em matéria natural) era de 40,5% de farelo de soja, 56,8% de milho moído e 2,7% de mineral para vacas lactantes (composição mencionada anteriormente). A quantidade de concentrado oferecida era ajustada semanalmente durante o período experimental usando o software de formulação Spartan Dairy Ration Evaluator/Balancer (versão 3.0; Michigan State University, East Lansing, MI, Estados Unidos), que utiliza dados de DEL, PC, ECC, produção e composição de leite (foi considerado gordura a 3,5% e proteína a 3,2%). O concentrado oferecido durante os primeiros três dias da lactação foi ajustado utilizando-se as variáveis supracitadas e estimando-se a produção em 20 kg de leite/vaca/dia. Todas as vacas consumiam o concentrado completamente em no máximo 30 minutos após a oferta do alimento.

Antes e até 46 dias após o parto, o OMN foi oferecido aos animais na quantia (56 g/vaca/dia) recomendada pelo fabricante e utilizada em outros estudos (Wang et al., 2009; Ryman et al., 2013), colocado sobre o concentrado matinal oferecido a cada vaca. Amostras da silagem de milho e dos concentrados de pré-parto e de lactação foram coletadas quinzenalmente, agrupadas em uma única amostra de forma homogênea e enviadas para análise química e bromatológica por um laboratório comercial (3rlab, Belo Horizonte, MG). Os cálculos da Energia Metabolizável (EM) e da Energia Líquida de Lactação (EL_L) e de Manutenção (EL_M) foram realizados utilizando as equações propostas pelo NRC (2001). O conteúdo de Matéria Seca (MS) foi de 38,4% na silagem de milho, 90,1% no concentrado do pré-parto e 89% no concentrado do pós-parto. Valores nutritivos, composição e perfil nutricional dos concentrados e da silagem de milho oferecidos às vacas durante o período experimental estão apresentados nas Tabelas 2 e 3.

2.2. Amostragem

As vacas foram monitoradas diariamente durante todo o período experimental para a ocorrência de enfermidades assim como mortalidade e morbidade (Lima et al. 2012) por um médico veterinário. Durante todo o período experimental as vacas eram pesadas em balança do tipo plataforma (Precision Balanças, Tupã, SP) e o ECC era aferido de acordo com Wildman et al. (1982) por dois avaliadores não informados sobre a distribuição das vacas nos tratamentos.

2.2.1. Pré-parto

O PC e o ECC foram programados para serem avaliados semanalmente (d -35, -28, -21, -14, e -7) em relação à data prevista para a parição.

As amostras de sangue foram programadas para serem coletadas a cada 5 dias, começando no d-25 em relação à data prevista para o parto (d -25, -20, -15, -10, e -5) no momento imediatamente anterior ao oferecimento do concentrado matinal (8h00). A partir das datas de parição reais, as vacas dos grupos OMN e CON foram designadas aos seus tratamentos e iniciaram-se os procedimentos experimentais $35,3 \pm 2,3$ e $32,1 \pm 2,2$ dias, respectivamente, antes do parto. Os dias de avaliação do PC, do ECC e de coleta de sangue foram aproximados para as datas pré-programadas mais próximas.

2.2.2. Pós-parto

As vacas foram avaliadas para o PC e ECC imediatamente após a parição (d0). No primeiro dia após o parto, PC e ECC foram reportados semanalmente, enquanto que a produção individual de leite foi aferida até 46 dias de lactação. Amostras de leite foram coletadas diariamente de cada vaca durante a ordenha matinal (50 mL) e analisadas para Contagem de Células Somáticas (CCS) através do método de citometria de fluxo (AOAC, 1990) com aparelho Somacount 300 (Bentley Instruments Inc.; Chaska, MN, Estados Unidos) e para sólidos totais usando espectrometria infravermelha

(método 972.16; AOAC, 1999). As análises foram realizadas por laboratório comercial (Clínica do Leite; Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP). As amostras de sangue foram coletadas diariamente do d0 ao 7 da lactação, em dias alternados do d9 ao d21 e a cada cinco dias do d26 ao 46, imediatamente antes do oferecimento do concentrado matinal (6h00).

2.3. Endometrite

Nos d30 e 46, as vacas foram avaliadas para endometrite através da técnica do *cytobrush* (VWR CanLab, Mississauga, ON, Canadá) de acordo com procedimentos descritos por Dubuc et al. (2010). Os esfregaços para análise citológica foram preparados através do rolamento do *cytobrush* numa lâmina de microscopia limpa e seca. As lâminas foram imediatamente coradas pelo método Panótico Rápido (Insta-Prov; Newprov, Pinhais, PR, Brazil), e armazenadas em temperatura ambiente para posterior análise. Cada lâmina foi analisada em microscópio ótico sob aumento de 400 vezes para contagem diferencial de 100 células por um único observador, como descrito por Dubuc et al. (2010). Essas contagens diferenciais geraram resultados na forma de porcentagens, que equivalem ao número de células polimorfonucleadas (PMN) sobre um total de 100 células contadas (PMN + células endometriais). A técnica do *cytobrush* e a porcentagem de células PMN foram previamente utilizadas como indicadores de endometrite em gado leiteiro (Dubuc et al., 2010; Madoz et al., 2014).

2.4. Desafio de LPS

Ao final do experimento, 9 vacas de cada grupo foram aleatoriamente selecionadas para participar de um desafio com lipopolissacarídeo (LPS). Essas vacas (n = 18) continuaram a receber os tratamentos OMN ou CON durante o período do desafio de LPS, enquanto as vacas não selecionadas (n = 20) foram removidas do experimento.

No d46, as vacas do grupo OMN selecionadas para o desafio de LPS tinham 578 ± 17 kg de PC, $3,00 \pm 0,13$ de ECC, $5,1 \pm 0,7$ parições, $33,5 \pm 1,8$ kg/d de produção de leite e $36,8 \pm 1,8$ kg/d de produção de leite corrigido para 12% de sólidos totais. No d46, as vacas do grupo CON selecionadas para o desafio de LPS apresentavam 575 ± 19 kg de PC, $3,16 \pm 0,19$ de ECC, $5,2 \pm 0,7$ parições; $31,3 \pm 1,3$ kg/d de produção de leite e $35,5 \pm 1,0$ kg/d de produção de leite corrigido para 12% de sólidos totais. Esses valores são apresentados na Tabela 4.

No d48, $7 \pm 1,6$ da lactação, as vacas selecionadas receberam uma infusão intravenosa com um bolus de LPS bacteriano dissolvido em 10mL de solução salina a 0,9% imediatamente antes da infusão e administrado via seringas estéreis descartáveis de 1mL de acordo com o PC de cada vaca ($0,25 \mu\text{g/kg}$ of BW, *Escherichia coli* 0111:B4, Sigma-Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, SP). O PC utilizado para cálculo da dose de LPS foi obtido a partir da média entre os pesos cheios obtidos no d46 da lactação e imediatamente antes à administração do LPS. A temperatura vaginal de cada vaca foi monitorada durante o desafio de LPS a cada 10 minutos, desde 2h antes até 120h após a infusão, através de termômetro coletor de dados (HOBO Water Temp Pro V2, Onset Company, Bourne, MA, Estados Unidos). Cada termômetro foi colado com fita adesiva a um dispositivo intravaginal de liberação controlada de hormônio (CIDR, Zoetis, São Paulo, SP), que não continha hormônios. Um termômetro coletor de dados (HOBO Water Temp Pro V2, Onset Company, Bourne, MA, Estados Unidos) também foi colocado, na sombra, no piquete no qual as vacas foram mantidas durante o desafio de LPS, a fim de obter os dados de temperatura e umidade relativa do ambiente para o cálculo do Índice de Temperatura e Umidade (ITU; Willard et al., 2003). Amostras de sangue foram coletadas a cada hora nos momentos -2h a 8h a partir da infusão, a cada

12h nos momentos 12h a 72h a partir da infusão e a cada 24h nos momentos 96h a 120h a partir da infusão de LPS.

2.5. Análises Laboratoriais

Todas as amostras de sangue foram obtidas da artéria ou veia coccígeas em tubos de coleta de sangue comerciais (Vacutainer, 10 mL; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), centrifugados a 3000 x g a 4°C por 3 minutos para obtenção do plasma. O plasma foi transferido para microtubos do tipo *eppendorf* de 2mL e congelado a -20°C até o momento da análise. As amostras coletadas durante o pré e pós-parto foram analisadas para as concentrações plasmáticas de glicose, AGNE, haptoglobina, IGF-1, cortisol e insulina. As amostras coletadas durante o desafio de LPS foram analisadas para as concentrações plasmáticas de haptoglobina, e TNF- α . Todas as análises laboratoriais deste estudo foram realizadas em laboratório da Oregon State University (Burns, OR, EUA).

2.5.1. Glicose

As concentrações plasmáticas de glicose foram determinadas por meio de espectrofotometria (espectrofotômetro SpectraMax®) utilizando-se kit colorimétrico comercial (Glucose Oxidase #G7521; Pointe Scientific, Inc., Canton, MI, Estados Unidos), método validado por Trinder (1969). Os coeficientes de variação (CV) foram de 4,1% intraensaio e de 5,8% interensaio.

2.5.2. AGNE

As concentrações plasmáticas de AGNE foram determinadas por meio de espectrofotometria (espectrofotômetro SpectraMax®) utilizando-se kit colorimétrico comercial (HR Series NEFA – 2; Wako Pure Chemical Industries Ltd. USA, Richmond, VA, Estados Unidos), método validado por Johnson e Peters (1993). Os CV foram de 6,1% intraensaio e de 9,8% interensaio.

2.5.3. Haptoglobina

As concentrações plasmáticas de haptoglobina foram determinadas por meio de espectrofotometria (espectrofotômetro SpectraMax®) utilizando-se ensaio colorimétrico descrito e validado por Cooke e Arthington, 2013. Os CV foram de 2,5% intraensaio e de 6,8% interensaio.

2.5.4. TNF- α

As concentrações plasmáticas de TNF- α foram determinadas por meio de espectrofotometria (espectrofotômetro SpectraMax®) utilizando-se ELISA comercial especial específico para bovinos (RayBiotech, Inc., Norcross, GA, Estados Unidos). Os CV foram de 2,6% intraensaio e de 0,9% interensaio.

2.5.5. Cortisol, Insulina e IGF-1

As concentrações plasmáticas de cortisol, insulina e IGF-1 foram determinadas por meio de enzimaímunoensaio quimioluminescente utilizando-se equipamento automatizado (Immulite 1000; Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, CA, Estados Unidos). Este tipo de análise foi utilizado previamente para dosagem de cortisol (Phillips et al., 2010; Janßen et al., 2016), insulina (Ellig et al., 2016) e IGF-1 (Falkenberg et al., 2008) em amostras de plasma bovino e obteve aceitação de periódicos relevantes. Os CV foram 4,6% intraensaio e 5,9% interensaio para cortisol, 3,6% intraensaio e 4,6% interensaio para insulina e a concentração plasmática de IGF-1 foi avaliada em um único ensaio e teve CV intraensaio de 6,1%.

2.6. Análise Estatística

Dados binários e quantitativos foram analisados, respectivamente com os procedimentos MIXED e GLIMMIX do SAS (SAS Inst., Inc.; versão 9.3), usando vaca como unidade experimental e vaca(tratamento) como variável aleatória. Os dados

binários (porcentagem de tempo que as vacas tiveram temperatura vaginal $\geq 39,1^{\circ}\text{C}$) foram analisados com distribuição binomial e função *logit link*.

O modelo estatístico usado para análise de PC e ECC (iniciais, finais, após o parto e a diferença – final subtraído o inicial) durante o experimento continha o efeito de tratamento. O modelo estatístico usado para análise de PC e ECC semanais continha os efeitos de tratamento, semana e a interação resultante.

O modelo estatístico usado para análise da produção de leite diária, ingestão diária de concentrado, temperatura vaginal, resultados do *cytobrush* e parâmetros plasmáticos continha o efeito de tratamento, dia (ou hora, no caso do desafio com LPS) e a interação resultante. A produção diária de leite também foi avaliada de acordo com a porcentagem de células PMN durante o experimento e este modelo continha os efeitos de tratamento, classificação da porcentagem de células PMN ($\geq 6\%$ ou $< 6\%$ de células PMN), dia e as interações resultantes. Além disso, a produção de leite equivalente de 305 dias da lactação prévia de cada vaca foi incluída como covariável para todas as análises de produção e composição diárias de leite avaliadas neste estudo (Yasui et al., 2014a, b).

O termo específico para medidas repetidas foi semana para PC e ECC, hora para variáveis do desafio com LPS e dia para as análises remanescentes, tendo vaca(tratamento) como unidade experimental. A estrutura de covariância utilizada para todas as medidas repetidas foi de simetria composta, que se mostrou mais adequada para essas análises segundo os critérios de Akaike.

Os resultados foram expressos ajustados covariavelmente aos quadrados mínimos e separados usando média dos quadrados mínimos. A significância foi considerada quando $P \leq 0,05$ e tendências quando $P > 0,05$ e $\leq 0,10$. Os resultados

foram relatados de acordo com efeitos de tratamento se não houve interação significativa ou de acordo com a maior ordem de interação detectada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram observados casos de distocia, retenção de placenta, mastite clínica, morbidade ou mortalidade durante o experimento.

A concentração plasmática de alguns marcadores foi utilizada neste estudo com o objetivo de avaliar aspectos da fisiologia, metabolismo e sistema imune de vacas leiteiras durante o período de transição. Os resultados e a discussão serão apresentados na forma de itens referentes a estes aspectos.

Revisão sobre a fisiologia e o metabolismo da vaca leiteira periparturiente que justificam a escolha e uso destes marcadores para este estudo pode ser encontradas no Capítulo 1

3.1. Balanço Energético e Status Nutricional

O PC, ECC e as concentrações plasmáticas de glicose, insulina, AGNE e IGF-1 foram os parâmetros utilizados neste estudo para a avaliação do balanço energético e do status nutricional.

Não foram detectadas interações entre tratamento x dia ou tratamento x semana ($P \geq 0,36$) para PC, ECC e para parâmetros plasmáticos (glicose, insulina, AGNE, IGF-1) durante os períodos pré e pós-parto. Não foi detectado efeito significativo de tratamento para os parâmetros de PC ($P \geq 0,15$) e ECC ($P \geq 0,55$) acerca da parição ou em todo o período experimental (Tabela 1). Também não foi detectado efeito de tratamento ($P \geq 0,17$) para as concentrações plasmáticas de glicose, insulina, AGNE, IGF-1 (Tabela 5).

Houve, no entanto, efeito significativo de dia ($P < 0,01$), para todos os parâmetros supracitados, exceto insulina, demonstrando que as vacas utilizadas neste experimento passaram pelas mudanças metabólicas e fisiológicas associadas com o parto e início da lactação (Vazquez-Añon et al., 1994; Jorritsma et al., 2003; Leiva et al., 2015). As mudanças de PC, ECC e nas concentrações plasmáticas de glicose, AGNE, IGF-1, estão apresentadas nas Figuras 1 e 2.

A literatura disponível sobre suplementação de OMN para vacas leiteiras é escassa e não há estudos que avaliaram os efeitos deste suplemento sobre PC, ECC e concentrações plasmáticas dos marcadores nutricionais (glicose, insulina, AGNE, IGF-1) de vacas leiteiras durante o período de transição. Porém, estes resultados sugerem que o tratamento com OMN não causou efeitos sobre os desafios metabólicos e nutricionais gerados pelo parto e início da lactação avaliados neste estudo.

3.2. Produção e Constituintes do Leite

A produção de leite equivalente a 305 dias da lactação anterior não foi uma covariável significativa para produção diária de leite ($P = 0,37$) ou para constituintes ($P \geq 0,51$) no presente experimento e, portanto, foi retirada dos modelos estatísticos.

Vacas recebendo a dieta OMN tiveram maior ($P = 0,02$) produção de leite quando comparadas com as vacas CON (Tabela 6). Não foi observada diferença significativa para concentração de sólidos totais e CCS, embora as vacas do grupo OMN tenham apresentado uma tendência ($P = 0,07$) em maior produção de leite corrigido para sólidos totais a 12%, quando comparadas com as companheiras do grupo CON (Tabela 6).

Esperava-se também analisar estas amostras de leite para as porcentagens de gordura e proteína via espectrometria infravermelha (método 972.16; AOAC, 1999),

porém, problemas técnicos com os ensaios geraram resultados inválidos para uso no estudo.

Aparentemente, não há estudos que avaliaram a produção de leite de vacas leiteiras suplementadas com OMN durante o período de transição. A ausência de interação tratamento x dia ($P = 0,99$) para produção de leite indica que as vacas do grupo OMN produziam mais leite desde o início da lactação (a partir do d0) e essa diferença persistiu até 46 DEL (Figura 4), sugerindo que os benefícios da suplementação de OMN poderiam estar relacionados com a suplementação tanto durante o pós como durante o pré-parto.

É importante ressaltar que a produção de leite é influenciada pela ingestão de alimento (NRC, 2001), dado que não foi plenamente avaliado neste estudo. Apesar de a ingestão de forragem não ter sido mensurada, a silagem de milho foi oferecida diariamente aos animais na mesma quantidade. O concentrado foi oferecido igualmente aos grupos OMN e CON durante o pré-parto, e no pós-parto, a ingestão de concentrado foi semelhante ($P = 0,37$) entre os tratamentos (7,6 vs. 8,0 kg/d de matéria natural para vacas dos grupos CON e OMN, respectivamente; EPM = 0,35). Além disso, as concentrações plasmáticas de glicose, AGNE, insulina e IGF-1, típicos marcadores da ingestão de alimento em gado de leite (Butler, 2003), não apresentaram diferenças significativas entre as vacas dos grupos OMN e CON (Tabela 5), sugerindo que as vacas de ambos os grupos tiveram ingestão de alimento semelhante durante o período experimental.

Em estudo recente de nosso grupo de pesquisa, ao suplementar vacas leiteiras submetidas a estresse térmico com OMN, foi constatado aumento na ingestão de matéria seca no grupo de animais suplementados comparado ao grupo controle (Leiva et al., dados não publicados). Isto sugere que a suplementação com OMN tenha efeito

sobre a ingestão, o que pode ter ocorrido no presente estudo e colaboraria na explicação da maior produção de leite observada em vacas suplementadas com OMN. Embora também seja importante ressaltar que no estudo de Leiva et al. (dados não publicados) foram utilizados animais em meio de lactação, que apresentam regime de ingestão alimentar bastante diferente de vacas durante o periparto (Grummer, 1995). Mais estudos são necessários para avaliar o real efeito da suplementação com OMN sobre a ingestão de matéria seca de vacas leiteiras em diferentes fases da lactação e sua possível interação com o sistema imunológico e as reações de estresse.

Baseando-se, portanto, de forma isolada nos resultados do presente experimento, eles nos permitem sugerir que os efeitos da suplementação com OMN na produção de leite de vacas leiteiras durante o período de transição foram independentes de fatores nutricionais, pois a composição da dieta oferecida aos grupos OMN e CON era idêntica, com exceção da adição de OMN, e não há evidências neste experimento de que a ingestão de alimento tenha diferido entre as vacas dos grupos OMN ou CON.

3.3. Estresse e Resposta de Fase Aguda

Para avaliação do estresse e da RFA neste estudo foram utilizadas as concentrações plasmáticas de cortisol e haptoglobina, respectivamente.

Não foram detectados efeitos de tratamento ($P \geq 0,62$) ou interação tratamento x dia ($P \geq 0,36$) para as concentrações plasmáticas de cortisol e haptoglobina (Tabela 5), mas foi detectado efeito significativo de dia ($P \leq 0,01$) para ambas as variáveis (Figura 3). Associando-se a ausência de efeito significativo de tratamento, de interação tratamento x dia e o efeito significativo de dia na análise estatística das concentrações plasmáticas de cortisol e haptoglobina, sugere-se que as vacas dos dois tratamentos experimentaram as reações corticoesteroides e de fase aguda semelhantes. Essas reações ocorrem durante o período de transição, pois têm origem no estresse, em traumas, lesões

e na inflamação associados ao parto e início da lactação (Hudson et al., 1976; Trevisi e Bertoni, 2008; Cray et al., 2009).

Outros autores (Wang et al., 2007; Wang et al., 2009; Ryman et al., 2013) relataram o efeito de OMN em componentes celulares da resposta imune inata. Wang et al. (2007) ao avaliarem os efeitos da suplementação OMN em ovelhas, observaram elevada expressão de L-selectina e IL-1 β em neutrófilos de animais suplementados, especialmente se estes estivessem imunossuprimidos ou expostos a patógenos. Wang et al. (2009) observaram mudança na expressão de genes de leucócitos associados à sinalização, apoptose, e sensibilidade destas células em vacas leiteiras suplementadas com OMN. Ryman et al. (2013) avaliaram síntese de radicais livres e fagocitose de neutrófilos de novilhas leiteiras expostos a *E. coli* e relataram atividade mais elevada nas células provenientes de novilhas suplementadas com OMN.

Baseando-se nestes relatos hipotetizou-se que a suplementação com OMN, ao modular a resposta celular do sistema imune inato, pudesse também ter efeito na reação de fase aguda experienciada por vacas leiteiras durante o período de transição, o que refletiria em diferenças nas concentrações plasmáticas de haptoglobina e cortisol.

Não foram observadas, porém, diferenças significativas nas concentrações plasmáticas de cortisol e haptoglobina entre os grupos OMN e CON. Isto sugere que os potenciais benefícios gerados pelo tratamento OMN aos parâmetros de imunidade celular relatados por outros autores (Wang et al., 2007; Wang et al., 2009; Ryman et al., 2013) não influenciaram as reações neuroendócrinas e de fase aguda desencadeadas pelo parto e início da lactação neste estudo.

3.4. Endometrite

Vacas recebendo a dieta OMN apresentaram porcentagem significativamente maior ($P = 0,04$) de células PMN na população celular do endométrio quando

comparadas com as vacas do grupo CON (12,2 vs. 3,9%, para OMN e CON respectivamente; EPM = 2,9).

Na literatura, (Kasimanickam et al., 2004; Dubuc et al., 2010) interpreta-se uma porcentagem elevada de PMN no endométrio como endometrite subclínica ou citológica, dado negativamente associado a índices reprodutivos, produção de leite e positivamente associado à elevação nas concentrações plasmáticas de haptoglobina (Burke et al., 2010). Neste experimento, entretanto, as vacas do grupo OMN apresentaram maior produção de leite e concentrações plasmáticas similares de haptoglobina quando comparadas com as vacas do grupo CON, quadro que não condiz com animais apresentado maior incidência de endometrite.

Dentre as funções da reação inflamatória estão a identificação das ameaças ao organismo hospedeiro na forma de padrões moleculares associados a patógenos e a danos (PAMP e DAMP), presentes no sítio da inflamação, e a subsequente migração de leucócitos para este sítio – vide Capítulo 1, item 4. Esses eventos visam eliminar o potencial patógeno e reestabelecer a homeostase.

Um dos benefícios atribuídos à suplementação com OMN para a função imune inata de ruminantes, seria sobre a capacidade dos leucócitos de migrar para estes possíveis sítios inflamatórios, por meio do aumento da expressão de mRNA para L-selectina, relatado por Wang et al. (2007) e Ryman et al. (2013). A L-selectina é uma molécula presente na membrana de leucócitos que possibilita a adesão dessas células aos capilares sanguíneos e posterior migração para os tecidos nos quais foram detectada a presença de potenciais patógenos, para que ocorra então a fagocitose e eliminação da ameaça (Abbas e Lichtman, 2007).

Hipotetizou-se, então, que a maior infiltração neutrofílica observada no endométrio de vacas do grupo OMN – representada pela maior porcentagem de células

PMN – poderia ser um sinal não necessariamente negativo, mas indicador de uma reação inflamatória mais intensa, associada, na verdade, a uma melhor competência do sistema imune, ao invés de indicar simplesmente a ocorrência ou não de endometrite, pois as vacas do grupo OMN não apresentavam queda na produção de leite ou elevação das concentrações plasmáticas de haptoglobina em relação às vacas do grupo CON, fatores previamente associados com a ocorrência da doença (Burke et al., 2010).

Com o objetivo de suportar esta teoria, foi feita uma análise mais detalhada da porcentagem de células PMN em relação à produção de leite dos animais. Para isto, foi calculada uma média das porcentagens de células PMN obtidas nos d30 e 46 para cada animal, e, a partir desta média, as vacas foram subdivididas em quatro grupos: 1) vacas do grupo OMN com porcentagem de células PMN menor que 6% (**OMN + PMN < 6%**); 2) vacas do grupo OMN com porcentagem de células PMN maior ou igual a 6% (**OMN + PMN $\geq$ 6%**); 3) vacas do grupo CON com porcentagem de células PMN menor que 6% (**CON + PMN < 6%**); 2) vacas do grupo CON com porcentagem de células PMN maior ou igual a 6% (**CON + PMN $\geq$ 6%**). A porcentagem de 6% de células PMN no endométrio como limiar para a endometrite citológica foi utilizada anteriormente (Dubuc et al., 2010; Burke et al. 2010).

O desempenho destes quatro grupos de vacas foi então avaliado por meio da produção de leite durante os 46 primeiros dias de lactação. A produção de leite foi o parâmetro escolhido, pois há estudos que relacionam sua diminuição com endometrite (Burke et al. 2010), além disso, considerando-se a pecuária leiteira, é, sem dúvida, a principal fonte de retorno econômico para atividade.

Uma interação significativa ($P = 0,04$) entre tratamento x grupo PMN x dia foi detectada para produção de leite (Figura 5). A partir de 14 DEL, o grupo **CON + PMN $\geq$ 6%** foi o único dentre os quatro cujas vacas apresentaram menor produção de leite ($P =$

0,05) quando comparadas com os outros três grupos (produção média de leite de 14 a 46 DEL = 25,7 kg/d; 29,9 kg/d; 31,4 kg/d e 32,1 kg/d, CON + PMN $\geq$ 6%, CON + PMN < 6%; OMN + PMN $\geq$ 6%; OMN + PMN < 6%, respectivamente; EPM = 1,5, resultados apresentados na Tabela 7). Além disso, a produção de leite das vacas do grupo CON + PMN < 6% foi semelhante ($P \geq 0,21$) quando comparada às produções dos grupos OMN + PMN < 6% e OMN + $\geq$ 6%. Esses resultados indicam que, de alguma forma, a suplementação com OMN teve efeito sobre a relação entre a endometrite e a produção de leite, pois as vacas recebendo o aditivo na dieta não apresentaram queda na produção leiteira quando houve aumento das porcentagens de PMN no endométrio, ao contrário do que foi observado em animais do grupo CON e relatado em outros estudos que avaliaram produção leiteira e porcentagens de PMN endometrial (Lewis, 1997; Sheldon e Dobson, 2004).

Esta hipótese tem suas limitações, pois não foram avaliados neste trabalho outros dados, como por exemplo, pesquisa da carga bacteriana no útero, os próprios marcadores leucocitários avaliados em outros estudos, como a L-selectina (Wang et al., 2007; Ryman et al., 2013) ou mesmo índices reprodutivos destes animais, que poderiam colaborar para a interpretação mais conclusiva das maiores porcentagens de PMN no endométrio de vacas suplementadas com OMN. Porém, os resultados obtidos e apresentados são relevantes na avaliação da eficiência do suplemento com um imunomodulador para vacas leiteiras durante o período de transição e permitem concluir que seu efeito foi positivo sobre produção leiteira e há indícios que, da mesma forma, sobre a resposta imunológica uterina.

3.5.Desafio com LPS

Diante de um estímulo patogênico como o desafio com LPS, o sistema imune inato estimula diversas reações para controlar ou eliminar o agente causador da infecção

(Abbas and Lichtman, 2007). Estas reações incluem a síntese de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , proveniente dos leucócitos, o subsequente aumento na temperatura corporal e a síntese de proteínas de fase aguda, como a haptoglobina (Carroll e Forsberg, 2007).

Conformemente, efeitos significativos de tempo ($P < 0,01$) foram detectados para concentrações plasmáticas de TNF- α e haptoglobina (Hp) e para a temperatura vaginal durante o desafio com LPS (Figura 6). Isto indica que a administração de LPS foi adequada e provocou elevação nas concentrações plasmáticas de Hp e TNF- α , bem como na temperatura corpórea dos animais, como é esperado durante este procedimento (Carroll e Forsberg, 2007), e semelhante ao que foi relatado por outros autores que utilizaram a mesma técnica experimental (Carroll et al., 2009; Rodrigues et al., 2015).

Além disso, uma interação tratamento x hora foi detectada ($P = 0,03$) na qual a concentração plasmática de TNF- α foi significativamente mais elevada ($P \leq 0,04$) para vacas do grupo OMN nos momentos 1h, 2h e 3h em relação à administração do LPS (Figura 6).

Efeito de tratamento foi detectado para concentração plasmática de Hp, que foi significativamente mais elevada ($P = 0,04$) para as vacas do grupo OMN (212 $\mu\text{g/mL}$ vs. 94 $\mu\text{g/mL}$, para OMN e CON respectivamente; EPM = 38). Essa elevação foi detectada no período de 36 a 72h após a infusão de LPS (Figura 6).

As concentrações plasmáticas mais elevadas de TNF- α e Hp observadas para as vacas do grupo OMN sugerem uma resposta inflamatória mais intensa em relação àquela observada nos animais do grupo CON. O conceito de “resposta inflamatória mais intensa” pode, de maneira equivocada, ser exclusivamente associado a um resultado negativo, à ideia de doença com quadro clínico mais grave. Esta é uma interpretação que exige algumas considerações e certa cautela, pois os mecanismos envolvidos no

desencadeamento de uma reação inflamatória e a maneira como eles interagem e modulam a resposta imune inata como um todo são bastante complexos.

Primeiramente é preciso considerar que as concentrações plasmáticas de TNF- α e Hp foram mais elevadas para o grupo OMN apenas por um período, de 1 a 3h após a infusão para TNF- α e de 36 a 72h para a Hp, e que após estes períodos os dois parâmetros voltam a apresentar concentrações semelhantes àsquelas observadas antes da infusão em ambos os grupos, indicando o retorno ao status inicial, prévio à aplicação do LPS. Considerando-se que o desafio com LPS simula a reação inflamatória que seria desencadeada por uma infecção por bactérias gram-negativas, as concentrações plasmáticas mais elevadas, primeiramente, de TNF- α e subsequentemente, de Hp observadas em vacas do grupo OMN sugerem uma melhor capacidade de resposta imune inata dos animais suplementados frente a uma possível infecção bacteriana.

Esta teoria foi elaborada com base em conceitos descritos e discutidos no Capítulo 1 (vide item 4), principalmente nas funções da Hp relacionadas à modulação da resposta inflamatória e controle do crescimento bacteriano (Ceciliani et al., 2012).

Ademais, é preciso considerar outros estudos realizados com este suplemento nos quais foi utilizado o desafio com LPS. Burdick et al. (2012) relataram maiores contagem de leucócitos e linfócitos em novilhas de corte suplementadas com OMN após infusão de LPS. Burdick Sanchez et al. (2014) relataram elevação das concentrações plasmáticas de TNF- α e IFN- γ em bovinos de corte suplementados com OMN e desafiados com LPS. Esses resultados concordam com os que foram relatados neste estudo e com os benefícios ao sistema imune atribuídos à suplementação com OMN descritos por outros autores (Wang et al., 2007; Wang et al., 2009; Ryman et al., 2013).

Assim, formulou-se que a suplementação com OMN para vacas leiteiras durante o período de transição teve efeito nas concentrações plasmáticas de TNF- α e Hp durante desafio com LPS, o que foi interpretado como indicativo de uma resposta imune inata mais eficaz.

3.5.1. Temperatura Vaginal durante o Desafio com LPS

Como mencionado anteriormente, a temperatura vaginal aumentou ($P < 0,01$) para vacas de ambos os tratamentos após a administração do LPS (Figura 6), mas não foram detectadas diferenças ($P = 0,29$) entre as médias dos tratamentos.

Embora a interação tratamento x hora não tenha sido significativa ($P = 0,59$) vacas do grupo OMN tiveram menor ($P \leq 0,05$) temperatura vaginal de 1,5h a 3,5h após a infusão do LPS (Figura 6), quando se espera que a temperatura corporal se eleve acentuadamente em resposta à infusão de LPS (Carroll et al., 2009; Rodrigues et al., 2015). Esses resultados não são coerentes com as diferenças de tratamento nas concentrações plasmáticas de TNF- α e Hp, pois animais do grupo OMN apresentaram concentrações mais elevadas de TNF- α e Hp e a temperatura corporal é estimulada a elevar-se pela influência de citocinas pró-inflamatórias e pela subsequente resposta de fase aguda (Carroll and Forsberg, 2007), logo, esperava-se que as vacas do grupo OMN apresentassem temperatura vaginal mais elevada que as do grupo CON.

Similarmente, Burdick et al. (2012) e Burdick Sanchez et al. (2014) também reportaram menor temperatura corpórea de bovinos recebendo desafio de LPS e suplementados com OMN quando comparadas com companheiros não suplementados, embora esses estudos tenham, da mesma forma que este trabalho, obtido evidências da ocorrência de uma resposta inflamatória mais intensa em animais do grupo OMN.

Na verdade, há relatos de que a suplementação com OMN tenha papel na termorregulação. Hall et al. (2014) observaram menor frequência respiratória, maior consumo de alimento, maior porcentagem de gordura no leite e menor CCS no leite de vacas suplementadas com OMN e submetidas a estresse térmico, quando comparadas com os animais do grupo CON. Esse papel na termorregulação ajudaria a compreender a reduzida temperatura vaginal das vacas do grupo OMN quando comparada com suas companheiras do grupo CON após a administração do LPS.

Dado que a temperatura corporal retorna aos níveis basais 12h após administração de LPS (Reuter et al., 2008; Carroll et al., 2009; Rodrigues et al., 2015), o Índice de Temperatura e Umidade (ITU) e a temperatura vaginal coletados neste experimento a partir de 24 até 120h após a infusão de LPS foram utilizados para endereçar esta teoria. A classificação para estresse térmico foi determinada como animais com temperatura vaginal $\geq 39,1^{\circ}\text{C}$ (Vasconcelos et al., 2011) durante períodos em que o ITU foi > 68 (Zimbleman et al., 2009).

Durante o período do desafio de LPS as vacas de ambos os grupos foram expostas a ITU > 68 por 56,3 horas, durante as quais vacas do grupo OMN passaram menos ($P = 0,05$) tempo com temperatura vaginal $\geq 39,1^{\circ}\text{C}$ quando comparadas com suas companheiras do grupo CON (10,1 vs. 20,2 h, para vacas do grupo OMN e CON, respectivamente; EPM = 3,5). Foram detectadas tendências do efeito de tratamento ($P \leq 0,09$) na temperatura vaginal média (38,84 vs. 39,10 $^{\circ}\text{C}$ para vacas dos grupos OMN e CON, respectivamente; EPM = 0,11) e na porcentagem de tempo durante o qual a temperatura vaginal foi inferior ou igual a $39,1^{\circ}\text{C}$ (18,3 vs. 36,7 % para vacas dos grupos OMN e CON, respectivamente; EPM = 8,0) quando o ITU foi > 68 . Vale pontuar que durante o desafio de LPS todos os animais foram alojados em piquetes com livre acesso à sombra, água e silagem de milho e que as condições de estresse térmico

não foram induzidas ou manipuladas, mas sim ocorreram naturalmente devido ao clima local.

Associados, esses resultados sugerem que a suplementação com OMN possa ter papel na termorregulação de vacas leiteiras lactantes sobre estresse térmico, o que justificaria as diferenças entre tratamentos após 4h da infusão de LPS. Ainda assim, este experimento não foi delineado para devidamente avaliar essas variáveis e mais estudos são necessários para elucidar o potencial termorregulatório do suplemento.

4. CONCLUSÃO

Em conclusão, a suplementação com OMN para vacas leiteiras em período de transição não teve influência sobre as respostas metabólicas e imunológicas desencadeadas pelo parto e início da lactação, mas aumentou significativamente a produção de leite, a porcentagem de células PMN no endométrio e as concentrações plasmáticas de TNF- α e Hp diante do desafio com LPS.

Além disso, há evidências de que a suplementação com OMN apresente efeito na termorregulação de vacas leiteiras sob condições de estresse térmico, embora mais pesquisas sejam necessárias para que esta teoria seja confirmada.

Mais estudos também são necessários para avaliar outros efeitos da suplementação de OMN na saúde, reprodução e parâmetros produtivos de vacas leiteiras em diferentes condições de manejo, como vacas Holandesas puras em sistema de dieta total, por exemplo.

Não obstante, este experimento trouxe dados relevantes sobre os efeitos da suplementação de OMN para vacas leiteiras durante o período de transição. O estudo também levantou importantes questões para pesquisa futura, como, por exemplo, a

interação de metabolismo e sistema imune e o esclarecimento dos mecanismos de ação deste aditivo nutricional, pontos de discussão que ainda carecem esclarecimentos.

Por fim, o estudo mostrou que a suplementação com OMN para vacas leiteiras durante o período de transição parece ser uma estratégia válida para melhora da produtividade de sistemas de produção de leite.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K., e LICHTMAN, A. H. 2007. Cellular and molecular immunology, 6th ed. Saunders Co., Philadelphia, PA.
- AOAC. 1990. Official Method of Analysis. 15th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA.
- AOAC. 1999. Official Method of Analysis. 16th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA.
- BURDICK SANCHEZ, N. C.; BUNTYN, J. O.; CARROLL, J. A.; WISTUBA, T.; DEHANN, K.; SIEREN, S. E.; JONES, S. J.; SCHMIDT, T. B. 2014. Enhancement of the acute phase response to lipopolysaccharide in feedlot steers supplemented with OmniGen-AF. J. Anim. Sci. 92(E-Suppl. 2):37–38.
- BURDICK, N. C.; CARROLL, J. A.; CHAPMAN, J. D.; WELSH, T. H.; VANN, R. C.; RANDEL, R. D. 2012. OmniGen–AF supplementation modulates the physiological and acute phase response of Brahman heifers to an endocrine challenge. J. Anim. Sci. 90(Suppl 3):221.
- BURKE, C. R.; MEIER, S.; MCDUGALL, S.; COMPTON, C.; MITCHELL, M.; ROCHE, J. R. 2010. Relationships between endometritis and metabolic state during the transition period in pasture-grazed dairy cows. J. Dairy Sci. 93:5363–5373.
- BUTLER, W. R. 2003. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. Livest. Prod. Sci. 83:211–218.
- CARROLL, J. A., e FORSBERG, N. E. 2007. Influence of stress and nutrition on cattle immunity. Vet. Clin. Food. Anim. 23:105-149.
- CARROLL, J. A.; REUTER, R. R.; CHASE JR., C. C.; COLEMAN, S. W.; RILEY, D. G.; SPIERS, D. E.; ARTHINGTON, J. D. GALYEAN, M. L. 2009. Profile of

- the bovine acute-phase response following an intravenous lipopolysaccharide challenge. *Innate Immun.* 15:81–89.
- CECILIANI, F.; CERON, J. J.; ECKERSALL, P.D.; SAUERWEIN, H. 2012. Acute phase proteins in ruminants. *Journal of Proteomics* v. 75, p. 4207-4231.
- COOKE, R. F., e ARTHINGTON, J. D. 2013. Concentrations of haptoglobin in bovine plasma determined by ELISA or a colorimetric method based on peroxidase activity. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 97:531-536.
- CRAY, C.; ZAIAS, J.; ALTMAN, N. H. 2009. Acute phase response in animals: A review. *Comp. Med.* 59:517-526.
- DRACKLEY, J. K. 1999. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? *J. Dairy. Sci.* 82:2259–2273.
- DUBUC, J.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E.; WALTON, J. S.; LEBLANC, S. J. 2010. Risk factors for postpartum uterine diseases in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93:5764–5771.
- ELLIG, T. L.; MCLEAN, K. J. ; DAHLEN, C. R.; BOROWICZ, P.; REYNOLDS, L. P.; CATON, J. S. 2016. 412 Concentrations of progesterone, estrogen, and insulin in serum during early pregnancy in crossbred Angus beef heifersConcentrations of progesterone, estrogen, and insulin in serum during early pregnancy in crossbred Angus beef heifers. *J. Anim. Sci.* Vol. 94 No. supplement2, p. 192-193
- FALKENBERG, U.; HAERTEL, J.; ROTTER, K.; IWERSEN, M.; ARNDT, G.; HEUWIESER, W. 2008. Relationships Between the Concentration of Insulin-Like Growth Factor-1 in Serum in Dairy Cows in Early Lactation and Reproductive Performance and Milk Yield. *J. Dairy Sci.* 91:3862–3868.

- GOFF, J. P. e HORST, R. L. 1997. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J. Dairy Sci.* 80:1260–1268.
- GRUMMER, R. R. 1995. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *J. Anim. Sci.* v. 73, p. 2820–2833.
- HALL, L. W.; RIVERA, F. A.; VILLAR, F.; CHAPMAN, J. D.; LONG, N. M.; COLLIER, R. J. 2014. Evaluation of OmniGen-AF[®] in lactating heat-stressed Holstein cows. In: 25th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium, p. 16. Available at: http://dairy.ifas.ufl.edu/rns/2014/2014_proceedings.pdf#page=30. Acessado em 15/10/2015.
- HUDSON, S.; MULLFORD, M.; WHITTLESTONE, W. G.; PAYNE, E. 1976. Bovine plasma corticoids during parturition. *J. Dairy Sci.* 59:744–746.
- JANßEN, S.; WUNDERLICH, C.; HEPPELMANN, M.; PALME, R.; STARKE, A.; KEHLER, W.; STEINER, A.; RIZK, A.; MEYER, U.; DAENICKE, S.; REHAGE, J. 2016. *Short communication*: Pilot study on hormonal, metabolic, and behavioral stress response to treatment of claw horn lesions in acutely lame dairy cows. *J. Dairy Sci.* 99:7481–7488.
- JOHNSON, M. M.; PETERS, J. P. 1993. Technical note: An improved method to quantify nonesterified fatty acids in bovine plasma. *J. Anim. Sci.* 71:753–756.
- JORRITSMA, R.; WENSING, T.; KRUIP, T. A. M.; VOS, P. L. A. M.; NOORDHUIZEN, J. P. T. M. 2003. Metabolic changes in early lactation and impaired reproductive performance in dairy cows. *Vet. Res.* 34:11–26.
- KASIMANICKAM, R.; DUFFIELD, T. F.; FOSTER, R. A.; GARTLEY, C. J.; LESLIE, K. E.; WALTON, J. S.; JOHNSON, W. H. 2004. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology* 62:9–23.

- LEIVA, T., COOKE, R. F.; BRANDÃO, A. P.; MARQUES, R. S.; VASCONCELOS, J. L. M. 2015. Effects of rumen-protected choline supplementation on metabolic and performance responses of transition dairy cows. *J. Anim. Sci.* 93:1896-1904
- LEWIS, G. S. 1997. Uterine health and disorders. *J. Dairy Sci.* 80:984–994.
- LIMA, F. S.; SÁ FILHO, M. F.; GRECO, L. F.; SANTOS, J. E. P. 2012. Effects of feeding rumen-protected choline on incidence of diseases and reproduction of dairy cows. *Vet. J.* 193:140-146.
- MADOZ, L. V.; GIULIODORI, M. J.; MIGLIORISI, A. L.; JAUREGUIBERRY, M.; DE LA SOTA, R. L. 2014. Endometrial cytology, biopsy, and bacteriology for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97:195–201.
- MALLARD, B. A.; DEKKERS, J. C.; IRELAND, M. J.; LESLIE, K. E.; SHARIF, S.; LACEY VANKAMPEN, C.; WAGTER, L. AND WILKIE, B. N. 1998. Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. *J. Dairy Sci.* 81:585–595
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. Natl. Acad. Sci., Washington, DC.
- OVERTON, T. R. e WALDRON, M. R.. 2004. Nutritional management of transition dairy cows: Strategies to optimize metabolic health. *J. Dairy Sci.* 87(Suppl. 13):E105–E119.
- PHILLIPS, C. J. C.; PINES, M. K.; LATTE, M.; MULLER, T.; PETHERICK, J. C.; NORMAN, S. T.; GAUGHAN, J. B. 2010. The physiological and behavioral responses of steers to gaseous ammonia in simulated long-distance transport by ship. *J. Anim. Sci.* 88:3579–3589

- REUTER, R. R.; CARROLL, J. A.; DAILEY, J. W.; COOK, B. J.; GALYEAN, M. L. 2008. Effects of dietary energy source and level and injection of tilmicosin phosphate on immune function in lipopolysaccharide-challenged beef steers. *J. Anim. Sci.* 86:1963–1976.
- RODRIGUES, M. C.; COOKE, R. F.; MARQUES, R. S.; ARISPE, S. A.; KEISLER, D. H.; AND BOHNERT, D. W. 2015. Effects of oral meloxicam administration to beef cattle receiving lipopolysaccharide administration or vaccination against respiratory pathogens. *J. Anim. Sci.* 93:5018-5027.
- RYMAN, V. E.; NICKERSON, S. C.; KAUTZ, F. M.; HURLEY, D. J.; ELY, L. O.; WANG, Y. Q.; FORSBERG, N. E. 2013. Effect of dietary supplementation on the antimicrobial activity of blood leukocytes isolated from Holstein heifers. *Res. Vet. Sci.* 95:969-974.
- SHELDON, I. M., e DOBSON, H. 2004. Postpartum uterine health in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 82–83:295–306.
- SHELDON, I. M.; NOAKES, D. E.; RYCROFT, A.; DOBSON, H. 2001. Acute phase protein responses to uterine bacterial contamination in cattle after calving. *Vet Rec*; 148:172–5.
- TREVISI, E. e BERTONI, G. 2008. *Aspirin and Health Research Progress*. Nova Science Publishers, Hauppauge, NY.
- TRINDER, P. 1969. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem.* 6:24–27.
- VASCONCELOS, J. L. M.; COOKE, R. F.; JARDINA, D. T. G.; ARAGON, F. L.; VERAS, M. B.; SORIANO, S.; SOBREIRA, N.; SCARPA, A. B. 2011. Associations among milk production and rectal temperature on pregnancy maintenance in lactating recipient dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 127:140-147.

- VAZQUEZ-AÑON, M.; BERTICS, S.; LUCK, M.; GRUMMER, R. R.; PINHEIRO, J. 1994. Peripartum liver triglyceride and plasma metabolites in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 77:1521-1528.
- WANG, Y.-Q.; PUNTENNEY, S. B.; BURTON, J. L.; FORSBERG N. E. 2009. Use of gene profiling to evaluate the effects of a feed additive on immune function in periparturient dairy cattle. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition.* 93:66–75.
- WANG, Y. Q.; PUNTENNEY, S. B.; BURTON, J. L.; FORSBERG, J. L.; FORSBERG, N. E. 2007. Ability of a commercial feed additive to modulate expression of innate immunity in sheep immunosuppressed with dexamethasone. *Animal* 1:945–951.
- WILDMAN, E. E.; JONES, G. M.; WAGNER, P. E.; BOMAN, R. L.; TROUTT, H. F.; LESCH, T. N. 1982. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *J. Dairy Sci.* 65:495–501.
- WILLARD, S.; GANDY, S.; BOWERS, S.; GRAVES, K.; ELIAS, A.; WHISNANT, C. 2003. The effects of GnRH administration post-insemination on serum concentrations of progesterone and pregnancy rates in dairy cattle exposed to mild summer heat stress. *Theriogenology* 59:1799–1810.
- YASUI, T.; MCCANN, K.; GILBERT, R. O.; NYDAM, D. V.; OVERTON, T. R. 2014a. Associations of cytological endometritis with energy metabolism and inflammation during the periparturient period and early lactation in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97:2763–2770.
- YASUI, T.; MCART, J. A. A.; RYAN, C. M.; GILBERT, R. O.; NYDAM, D. V.; VALDEZ, F.; GRISWOLD, K. E. OVERTON, T. R. 2014b. Effects of chromium propionate supplementation during the periparturient period and early

lactation on metabolism, performance, and cytological endometritis in dairy cows. J. Dairy Sci. 97:6400–6410.

ZIMBLEMAN, R. B.; RHOADS, R. P.; BAUMGARD, L. H.; COLLIER, R. J. 2009.

Revised temperature humidity index (THI) for high producing dairy cows. J.

Dairy Sci. 92(E-Suppl. 1):347

TABELAS

Tabela 1. Peso Corporal e Escore de Condição Corporal de vacas leiteiras suplementadas com Omnigen-AF (**OMN**; n = 19) ou não (**CON**; n = 19) antes e 46 dias após o parto.^{1,2}

Item	OMN	CON	EPM	Valor de P
<i>Peso Corporal, kg</i>				
PC inicial (d -35), kg	656	628	18	0,25
PC após o parto (d 0), kg	632	598	20	0,22
Diferença de PC (d -35 a 0), kg	-25	-29	11	0,81
PC final (d 46), kg	578	570	14	0,71
Diferença de PC (d 0 a 46), kg	-52	-27	12	0,15
<i>Escore de Condição Corporal³</i>				
ECC inicial (d -35)	3,39	3,29	0,14	0,62
ECC após o parto (d 0)	3,19	3,15	0,12	0,81
Diferença de ECC (d -35 a 0)	-0,19	-0,15	0,09	0,94
ECC final (d 46)	3,00	3,00	0,09	0,99
Diferença de ECC(d 0 to 46)	-0,19	-0,14	0,07	0,55

¹Baseado nas datas reais do parto vacas dos grupos OMN ou CON começaram receber os tratamentos $35,3 \pm 2,3$ e $32,1 \pm 2,2$ dias antes do parto, respectivamente. Omnigen-AF® (56 g/vaca/dia; Phibro Animal Health, Teaneck, NJ, Estados Unidos) foi oferecido sobre o concentrado matinal de cada vaca do grupo OMN.

²Antes do parto, PC e escore de condição corporal foram avaliados semanalmente (d -35, -28, -21, -14, e -7) antes do oferecimento do concentrado matinal (0800h). De acordo com as datas reais do parto PC e escore de condição corporal foram aproximados para a data programada mais próxima. Após o parto, PC e escore de condição corporal foram reportados semanalmente até d 46 da lactação. Os valores estão apresentados como Média dos Quadrados Mínimos, de acordo com os principais efeitos de tratamento, dado que não foi detectada interação tratamento x dia ($P \geq 0,72$).

³De acordo com Wildman et al. (1982), e avaliados por dois técnicos que desconheciam a distribuição das vacas nos tratamentos.

Tabela 2. Composição e perfil nutricional do concentrado oferecido às vacas leiteiras durante o pré-parto e início da lactação.

Item	Pré-parto ¹	Lactação ²
Matéria Seca (%)	90,1	89,0
<i>Composição (% em matéria seca)</i>		
Milho Moído	45,5	56,8
Farelo de Soja	45,5	40,5
Premix mineral do Pré-parto ³	9,0	0,0
Premix mineral de vacas lactantes ⁴	0,0	2,7
<i>Perfil Nutricional (% em matéria seca)</i>		
FDN (%)	12,0	13,0
CNF (%)	58,0	58,0
EM (Mcal/kg)	2,76	2,99
EL _L (Mcal/kg)	1,80	1,92
EL _M (Mcal/kg)	1,91	2,04
PB (%)	24,2	23,1

¹ Durante o pré-parto as vacas recebiam silagem de milho *ad libitum* e eram oferecidas diariamente 3kg/vaca (em matéria natural) do concentrado de pré-parto. Baseado na data real da parição as vacas receberam a dieta pré-parto por $33,7 \pm 1,5$ d.

² Após o parto as vacas recebiam diariamente 35 kg/vaca de silagem de milho (em matéria natural) e eram oferecidas o concentrado de vacas lactantes por 46 dias. A oferta de concentrado era ajustada semanalmente utilizando o software de formulação Spartan Dairy Ration Evaluator/Balancer (versão 3.0; Michigan State University, East Lansing, MI, Estados Unidos), levando em consideração dias em leite, PC, escore de condição corporal, produção de leite e porcentagens de gordura e proteína no leite fixadas em 3,5% e 3,2%, respectivamente.

³ Contendo 25% Ca; 4,7% S; 4,5% Mg; 3,3% Cl; 0,001% Se; 422.000 IU/kg de vitamina A; 21.200 IU/kg de vitamina D3, e 0,211% de vitamina E (Milk Ionic, M. Cassab Tecnologia Animal, São Paulo, SP).

⁴ Contendo 22% Ca; 7,5% P; 6,5% Na; 1,0% K; 3,6% Mg; 2,0% S; 0,003% Co; 0,115% Cu; 0,004% I; 0,220% Mn; 0,003% Se; 0,400% Zn; 400.000 IU/kg de vitamina A; 100.000 IU/kg de vitamina D3; e 0,150% de vitamina E (Milk MAC, M. Cassab Tecnologia Animal, São Paulo, SP).

Tabela 3. Perfil nutricional da silagem de milho oferecida às vacas leiteiras durante o pré-parto e início da lactação.

Item	Silagem de Milho
Matéria Seca (%)	38,4
<i>Perfil Nutricional (% em matéria seca)</i>	
FDN (%)	53,0
CNF (%)	33,0
EM (Mcal/kg)	2,24
EL _L (Mcal/kg)	1,39
EL _M (Mcal/kg)	2,39
PB (%)	8,1

¹ Durante o pré-parto as vacas recebiam silagem de milho *ad libitum* e durante o pós-parto as vacas recebiam 35kg de matéria natural de silagem de milho por dia. A silagem de milho oferecida às vacas durante o pré e pós-parto era a mesma.

Tabela 4. Dados de PC, ECC, número de parições, produção de leite e produção de leite corrigida para sólidos totais a 12% das vacas dos grupos **OMN** (n = 9) e **CON** (n = 9) selecionadas para realização do desafio com LPS no d46.

Item	OMN	COM
PC (kg)	578 ± 17	575 ± 19
ECC (1 a5)	3,00 ± 0,13	3,16 ± 0,19
Parições	5,1 ± 0,7	5,2 ± 0,7
Produção de leite (kg/d)	33,5 ± 1,8	31,3 ± 1,3
Produção de leite corrigida para ST a 12%(kg/d)	36,8 ± 1,8	35,5 ± 1,0

Tabela 5. Parâmetros séricos de vacas leiteiras suplementas (**OMN**; n = 19) ou não (**CON**; n = 19) com Omnigen-AF® antes e 46 dias após o parto.^{1,2}

Item	OMN	CON	EPM	Valor de <i>P</i>
Cortisol, ng/mL	10,9	10,3	0,82	0,62
Glicose, mg/dL	55,6	56,4	0,97	0,56
Haptoglobina, µg/mL	256	226	44	0,64
IGF-I, ng/mL	56,9	68,3	5,8	0,17
Insulina, pmol/l	3,82	0,83	2,01	0,30
AGNE, µEq/L	0,421	0,369	0,036	0,31

¹Baseado nas datas reais do parto vacas dos grupos OMN ou CON começaram receber os tratamentos $35,3 \pm 2,3$ e $32,1 \pm 2,2$ dias antes do parto, respectivamente. Omnigen-AF® (56 g/vaca/dia; Phibro Animal Health, Teaneck, NJ, Estados Unidos) foi oferecido sobre o concentrado matinal de cada vaca do grupo OMN

²Antes do parto as amostras de sangue eram programadas para serem coletas a cada 5 dias, iniciando no d-25 em relação à data esperada para o parto (d -25, -20, -15, -10, and -5), as coletas eram realizadas imediatamente antes ao oferecimento do concentrado matinal (0800h). De acordo com as datas reais do parto as coletas realizadas foram aproximadas para a data programada mais próxima. Após o parto amostras de sangue foram coletadas diariamente do d0 ao d7 da lactação, em dias alternados do d9 ao d21 e a cada 5 dias do d26 ao d46 da lactação, imediatamente antes ao oferecimento do concentrado matinal (0600h). Os valores estão apresentados como Média dos Quadrados Mínimos, de acordo com o os principais efeitos de tratamento, dado que não foi detectada interação tratamento x dia ($P \geq 0,36$).

Tabela 6. Parâmetros de produção de leite de vacas leiteiras suplementadas (**OMN**; n = 19) ou não (**CON**; n = 19) com Omnigen-AF® antes e 46 dias após o parto. ^{1,2}

Item	OMN	CON	EPM	Valor de <i>P</i>
Produção de Leite, kg/d	30,3	27,1	0,9	0,02
Sólidos Totais do Leite, %	14,4	15,0	0,3	0,12
Leite corrigido para sólidos totais a 12%, kg/d	36,1	33,3	1,2	0,07
CCS, células/ml	326	450	114	0,45

¹Baseado nas datas reais do parto vacas dos grupos OMN ou CON começaram receber os tratamentos $35,3 \pm 2,3$ e $32,1 \pm 2,2$ dias antes do parto, respectivamente. Omnigen-AF® (56 g/vaca/dia; Phibro Animal Health, Teaneck, NJ, Estados Unidos) foi oferecido sobre o concentrado matinal de cada vaca do grupo OMN.

²A produção de leite individual foi aferida diariamente até 46 dias de lactação. Amostras de leite foram coletadas diariamente de cada vaca durante ambas as ordenhas e combinadas em uma única amostra diária (50mL proveniente de cada ordenha) as quais foram analisadas para CCS por meio de citometria de fluxo (AOAC, 1990) com o equipamento Somacount 300 (Bentley Instruments Inc.; Chaska, MN, Estados Unidos) e para porcentagem de sólidos totais por meio de espectrometria infravermelha(método 972.16; AOAC, 1999), análises realizadas por laboratório comercial (Clínica do Leite; Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP). Os valores estão apresentados como Média dos Quadrados Mínimos, de acordo com o os principais efeitos de tratamento, dado que não foi detectada interação tratamento x dia ($P \geq 0,64$).

Tabela 7. Produção média diária de leite dos 14 aos 46 DEL de vacas leiteiras suplementadas (**OMN** = 19) ou não (**CON** = 19) com Omnigen-AF® durante o pré e pós-parto. As vacas foram subdivididas de acordo com a porcentagem de células PMN presentes em exame citológico do endométrio. Valores com letras sobrescritas diferentes apresentam diferença estatística significativa ($P < 0,05$)

Item	CON		OMN	
	PMN $\geq$ 6%,	PMN < 6%	PMN $\geq$ 6%	PMN < 6%
Produção Média de Leite, kg/d	25,7 ^b	29,9 ^a	31,4 ^a	32,1 ^a

FIGURAS

Figura 1. Peso Corporal, ECC de vacas leiteiras suplementadas ou não com Omnigen-AF® (n = 38) durante o pré-parto e até 46 dias pós-parto. Efeito de dia ($P < 0,01$) foi detectado para os dois parâmetros.

Figura 2. Concentrações plasmáticas de AGNE, glicose e IGF-1 de vacas leiteiras suplementadas ou não com Omnigen-AF® (n = 38) durante o pré-parto e até 46 dias pós-parto. Efeito de dia ($P < 0,01$) foi detectado para todos os parâmetros.

Figura 3. Concentrações plasmáticas de cortisol e haptoglobina de vacas leiteiras suplementadas ou não com Omnigen-AF® (n = 38) durante o pré-parto e até 46 dias pós-parto. Efeito de dia ($P < 0,01$) foi detectado para os dois parâmetros.

Figura 4. Produção de leite de vacas leiteiras suplementadas (OMN; n = 19) ou não (CON; n = 19) com Omnigen-AF® antes e 46 dias após o parto. Barras de erro representam EPM. Efeito de tratamento foi detectado ($P = 0,02$), e a interação tratamento x dia não foi detectada ($P = 0,99$). Em cada dia, * = $P \leq 0,05$ e † = $P \leq 0,10$.

Figura 5. Produção de leite de vacas leiteiras suplementadas (OMN; n = 19) ou não (CON; n = 19) com Omnigen-AF® antes e 46 dias após o parto, e classificadas de acordo com a porcentagem de células polimorfonucleadas (PMN; $\geq 6\%$ or $< 6\%$; critério para endometrite citológica) numa contagem de 100 células (PMN + células endometriais) de amostras de endométrio coletadas por meio da técnica do *cytobrush* nos d30 e d46 da lactação (de acordo Dubuc et al., 2010). Barras de erro representam EPM. Uma interação tratamento x grupo PMN x dia foi detectada ($P = 0,04$). Em cada dia, vacas do grupo CON + PMN $\geq 6\%$ menor produção de leite quando comparadas a qualquer combinação dos demais grupos apresentaram (* = $P \leq 0,05$; † = $P \leq 0,10$).

Figura 6. Concentrações plasmáticas de Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) e haptoglobina e temperatura vaginal em vacas leiteiras suplementadas (OMN; n = 9) ou não (CON; n = 9) com Omnigen-AF® e que receberam infusão intravenosa de LPS (0,25 $\mu\text{g/kg}$ de PC de lipopolissacarídeo bacteriano –*Escherichia coli* 0111:B4, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) no momento 0 h. Barras de erro representam EPM. Efeito de tempo foi detectado ($P < 0,01$) para todos os parâmetros. Interação tratamento x hora foi detectada para TNF- α plasmático ($P = 0,03$), e efeito de tratamento foi detectado para haptoglobina plasmática ($P = 0,04$), mas não para temperatura vaginal ($P = 0,50$). Em cada hora * = $P \leq 0,05$; † = $P \leq 0,10$.

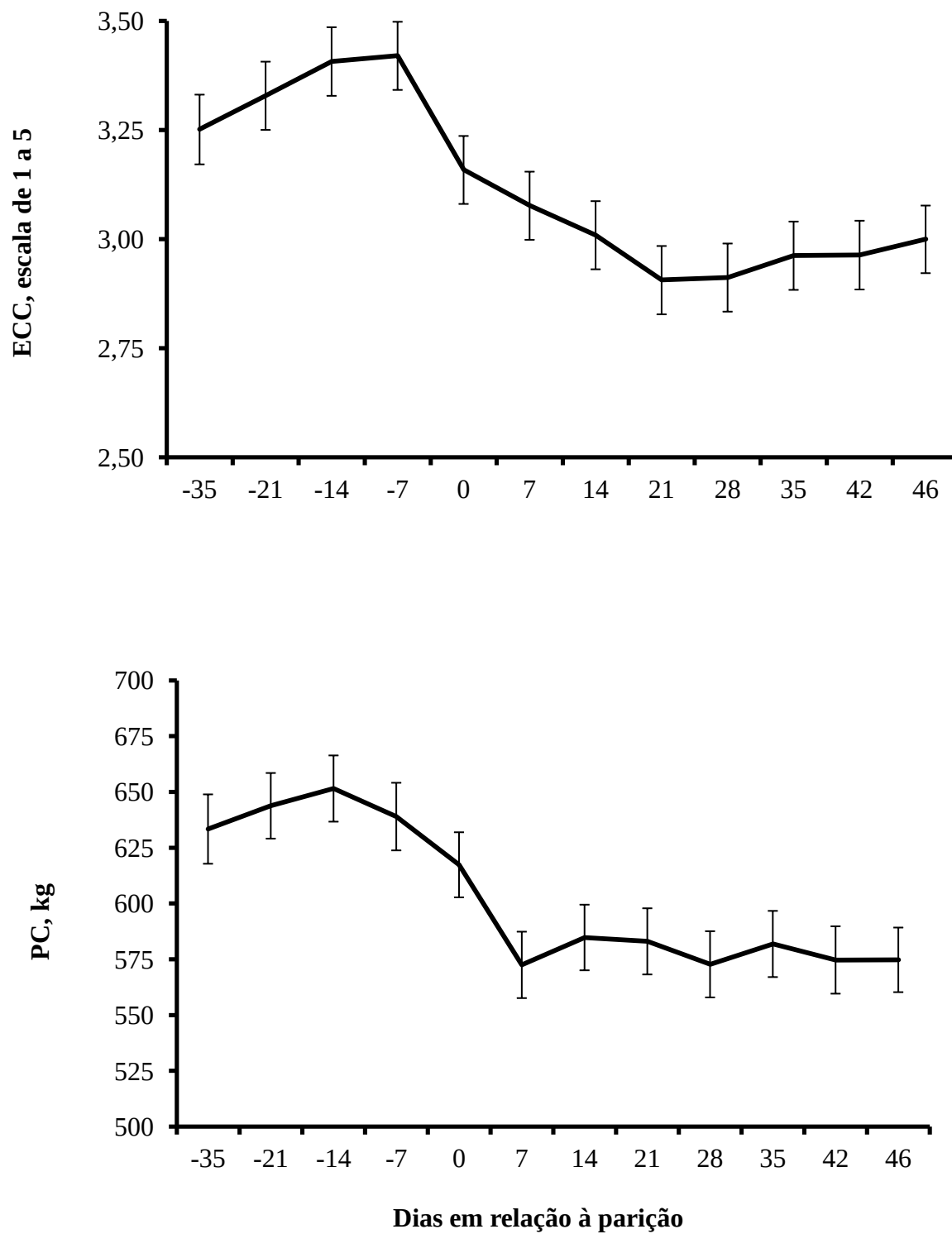


Figura 1.

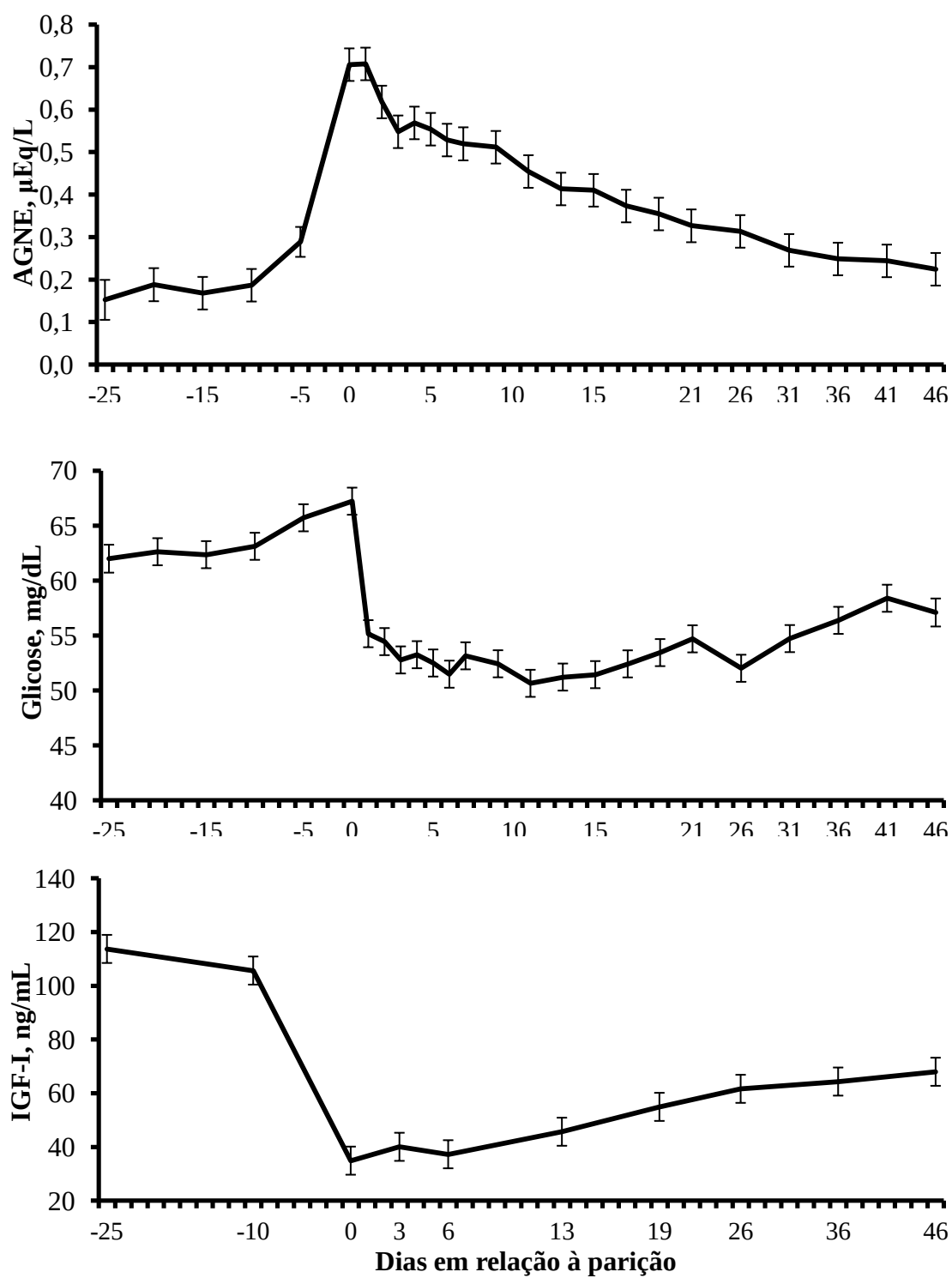


Figura 2.

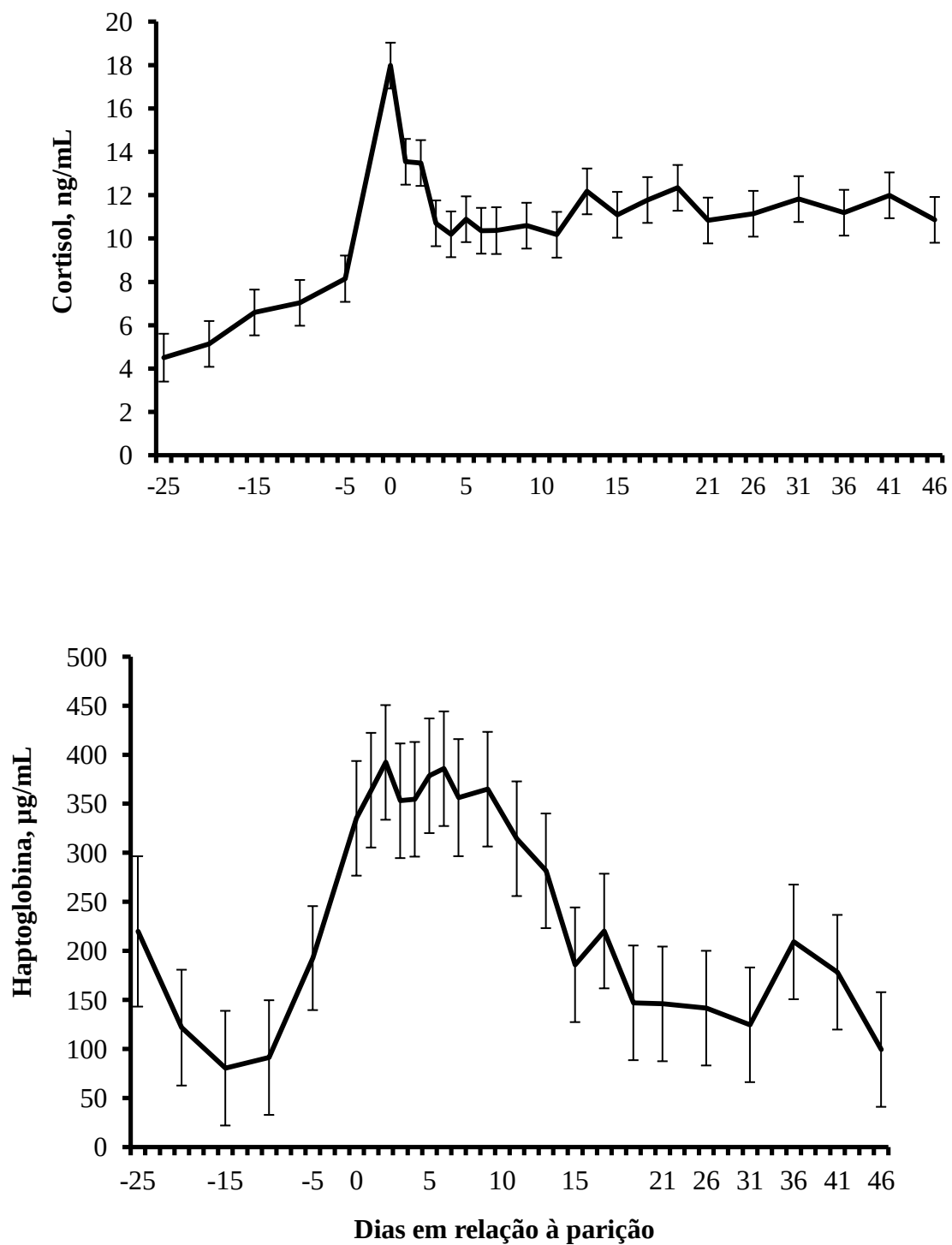


Figura 3.

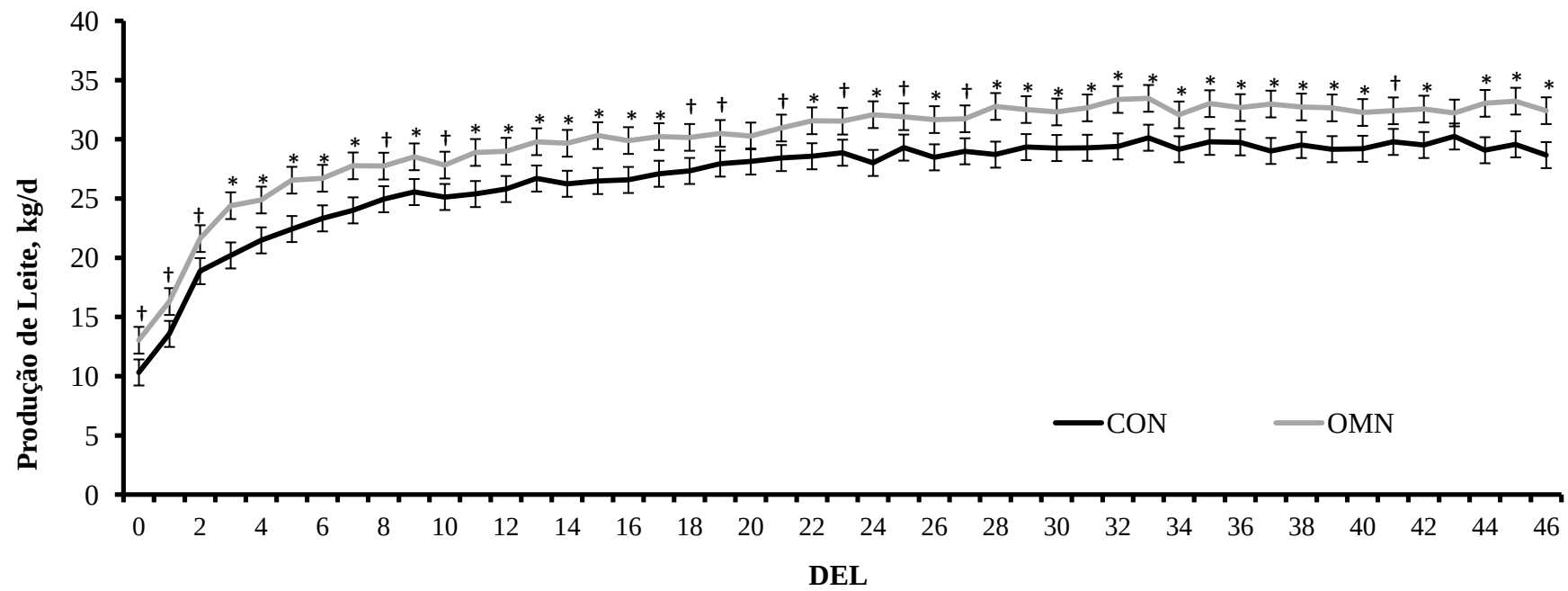


Figura 4.

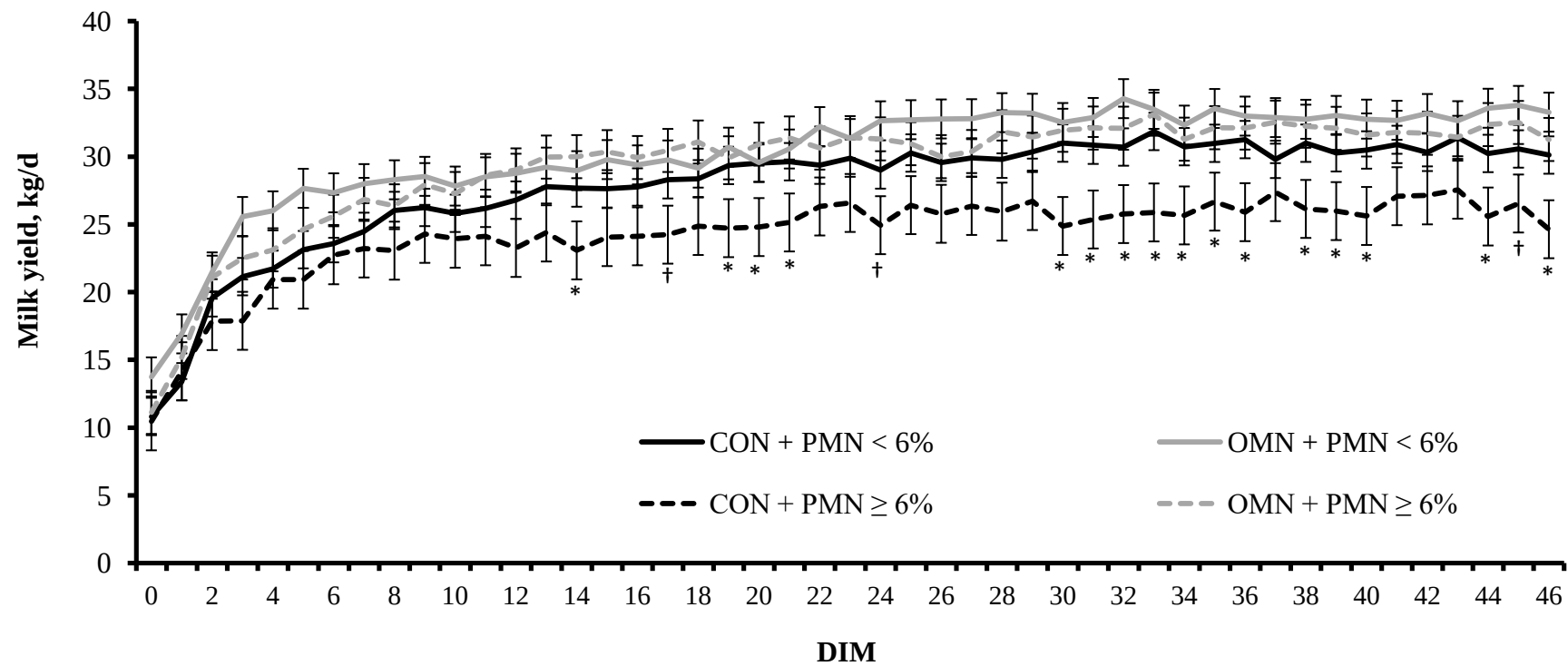


Figura 5.

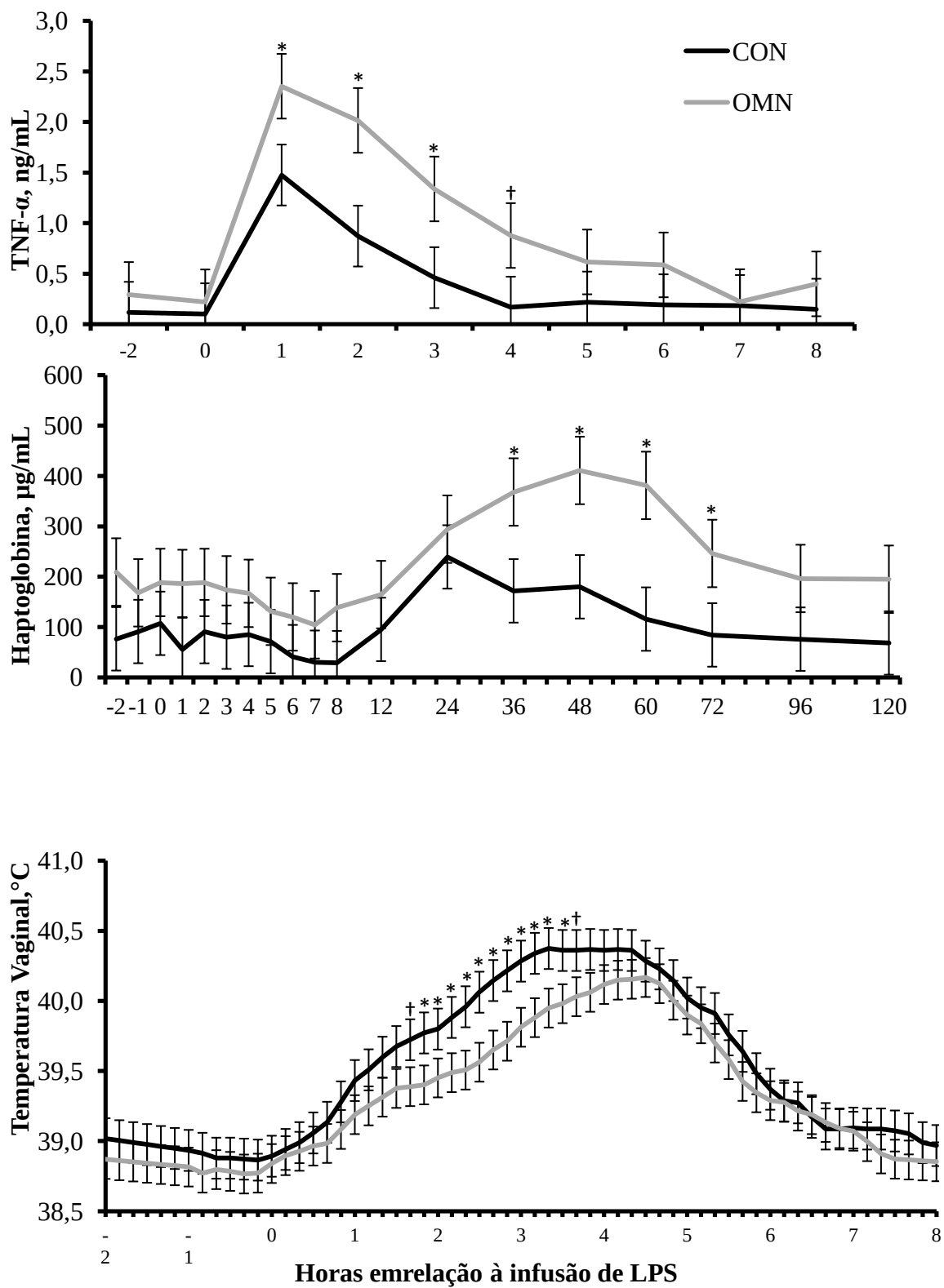


Figura 6.