

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**

**Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel**

**Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**



**Dissertação**

**Efeito da suplementação com *Saccharomyces cerevisiae* no perfil metabólico,  
inflamatório e reprodutivo de vacas leiteiras**

**Vanessa Oliveira de Freitas**

**Pelotas, 2015**

**Vanessa Oliveira de Freitas**

**Efeito da suplementação com *Saccharomyces cerevisiae* no perfil metabólico,  
inflamatório e reprodutivo de vacas leiteiras**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Zootecnia

Orientador: Dr. Cássio Cassal Brauner

Co-orientadores: Dr. Márcio Nunes Corrêa

Dra. Raquel Fraga Raimondo

Dra. Viviane Rabassa

Dr. Francisco Burket Del Pino

Pelotas, 2015

**Vanessa Oliveira de Freitas**

**Efeito da suplementação com *Saccharomyces cerevisiae* no perfil metabólico,  
inflamatório e reprodutivo de vacas leiteiras**

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade De Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 10/02/2015

Banca examinadora:

Prof. Dr. Bernardo Garziera Gasperin, Doutor em Fisiopatologia da Reprodução pela UFSM.

Prof. Dr. Luiz Francisco Machado Pfeifer, Doutor em Melhoramento e Reprodução Animal pela UFPel.

Prof. Dr. Rafael da Rosa Ulguim, Doutor em Ciências Veterinárias pela UFRGS.

Prof. Dr. Cássio Cassal Brauner (Orientador), Doutor em Zootecnia pela UFPel.

## **Agradecimentos**

A Deus, por me proporcionar a sabedoria e o discernimento nos momentos mais difíceis, guiando-me pelos melhores caminhos.

Aos meus pais, Jorge e Vânia, pelo amor incondicional, apoio e pelos ensinamentos, incentivando-me sempre em todos os meus objetivos e desafios.

Aos meus irmãos, Vitor e Vitória pela compreensão, amizade e companheirismo de sempre.

As minhas avós, Joaquina e Therezinha, esteios da minha vida, pela preocupação, sabedoria e carinho.

Ao meu noivo, Theodoro, pela cumplicidade, paciência, amor e companheirismo de sempre em todos os momentos.

A família do meu noivo, pela disposição e carinho durante este período.

Ao meu orientador, Cássio Cassal Brauner, pela confiança depositada, pelos ensinamentos e pela amizade construída nesse período, auxiliando-me sempre que necessário.

Ao Professor, Márcio Nunes Correa, pela oportunidade, apoio e profissionalismo em todos os momentos.

As minhas colegas de experimento, Tatiele e Claudia, pela paciência, entendimento e sabedoria compartilhada durante o período de experimento. Pela amizade e confiança construída.

A PNPd Raquel Raimondo, que nos assessorou durante todo o período experimental e muito colaborou para a realização deste trabalho.

A todos os colegas da graduação e pós- graduação do NUPEEC, em especial, a Paula, Josiane, João, Andressa, Mityelle, pela importante colaboração para que este trabalho fosse realizado e pela convivência nestes dois anos de mestrado.

A Granjas 4 Irmãos, por possibilitar a realização deste trabalho, disponibilizando os animais, pela oportunidade e aprendizado.

Ao Eduardo Xavier, gerente da pecuária de leite, pela sua colaboração entendimento para que o experimento fosse realizado.

Ao professor Augusto Schneider, por disponibilizar o seu tempo e conhecimento para concretizar parte das análises laboratoriais.

Ao Repropel, na pessoa da Cristina Sangoi, que disponibilizou seu tempo e conhecimento, auxiliando- me em análises laboratorias essenciais para esse estudo.

Ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia, pela oportunidade de realização do curso e aos professores que contribuíram para a minha formação.

A Vi-Cor, pelo financiamento do projeto e concessão da bolsa de estudos durante esse dois anos.

Aos amigos, Jader e Carol pela parceria, amizade e acolhida desde a chegada em Pelotas.

A todos, que de uma maneira ou outra colaboraram para a realização deste trabalho.

***Dedico este trabalho em memória do meu avô,  
Mário Custódio de Oliveira.***

***“A persistência é o menor caminho para o êxito.  
(Charles Chaplin)***

## Resumo

FREITAS, Vanessa Oliveira de. **Efeito da suplementação com *Saccharomyces cerevisiae* no perfil metabólico, inflamatório e reprodutivo de vacas leiteiras.** 2015.39f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

O objetivo deste estudo foi determinar o efeito da suplementação com cultura de levedura e levedura hidrolisada enzimaticamente (CL- LHE) no desempenho reprodutivo, perfil metabólico e status inflamatório de vacas em um sistema semi-extensivo desde 21 dias pré- parto até 150 dias pós-parto. Foram utilizadas 30 fêmeas multíparas da raça holandês selecionadas pelo número de lactações ( $\geq 3$  lactações) e histórico negativo para doenças clínicas e reprodutivas na lactação anterior. As vacas eram ordenhadas duas vezes ao dia, com uma média de produção de 28 litros/vaca/dia, sendo medido quinzenalmente a produção individual. Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com o tratamento, grupo CL-LHE (n=15) que recebiam 28 g *on top* do produto contendo cultura de levedura e levedura hidrolisada enzimaticamente (Celmanax, Vi-COR, Mason City, IA) uma vez por dia juntamente com a dieta. Já as vacas do grupo controle (n=14) não recebiam o suplemento. As coletas de sangue para análises bioquímicas e metabólicas ocorreram nos dias -21, -14 e -7 em relação ao parto (período pré-parto). Após o parto as coletas ocorreram nos dias: 0, 3, 7, 14, 21, 28, 35 e 42, sendo que do 14º ao 35º dia, coletou-se semanalmente também para níveis séricos de progesterona. Vacas que receberam CL-LHE tiveram menor intervalo parto concepção (IPC) médio, 95,35 dias ( $p=0,02$ ) e maior taxa de concepção, 64,3% ( $p=0,04$ ). Não houve efeito sobre o retorno à ciclicidade ( $p=0,18$ ) e sobre o metabolismo proteico, PUN ( $p=0,66$ ), colesterol ( $p=0,45$ ) e colesterol- HDL ( $p=0,38$ ). O AGNE ( $p=0,55$ ) e BHB ( $p=0,65$ ) não sofreram alteração pelo tratamento. As proteínas de fase aguda também não foram afetadas sendo PON ( $p=0,22$ ), Haptoglobina ( $p=0,53$ ) e Albumina ( $p=0,10$ ). Conclui-se que vacas suplementadas com cultura de levedura mais levedura hidrolisada enzimaticamente (CL-LHE) desde o pré-parto até a primeira metade da lactação não alteram o padrão metabólico, o status inflamatório e a retomada da atividade ovariana. No entanto, a suplementação afeta positivamente o desempenho reprodutivo e a produção de leite com um menor intervalo parto concepção.

Palavras- chave: levedura; *status* inflamatório; metabolismo;

## Abstract

The objective of this study was to determine the effect of supplementation of yeast culture and enzymatically hydrolyzed yeast (CL- LHE) on reproductive performance, metabolic profile and inflammatory status of cows in a semi-extensive system since 21 days pre-calving to 150 days post partum. We used 30 multiparous female Dutch breed selected by the number of lactations ( $\geq 3$  lactations) and negative history for clinics and reproductive diseases in the previous lactation. The cows were milked twice daily, with an average yield of 28 liters / cow / day, measured biweekly crop. The animals were divided into two groups according to treatment, CL IT group (n = 15) received on top 28 g of the product containing yeast culture and enzymatically hydrolysed yeast (Celmanax, Vi-COR, Mason City, IA) once a day with the diet. Have the cows in the control group (n = 14) did not receive the supplement. Blood samples for biochemical and biological analysis occurred on days -21, -14 and -7 for childbirth (pre-partum). After delivery of the samples were collected on days 0, 3, 7, 14, 21, 28, 35 and 42, and the 14th to the 35th day, it also collected weekly serum progesterone levels. Cows receiving CL-LHE had lower birth interval conception (CPI) average, 95.35 days ( $p = 0.02$ ) and higher conception rate, 64.3% ( $p = 0.04$ ). There was no effect on the return of cyclicity ( $p = 0.18$ ) and on protein metabolism, PUN ( $p = 0.66$ ), cholesterol ( $p = 0.45$ ) and HDL-cholesterol ( $p = 0.38$ ). The AGNE ( $p = 0.55$ ) and BHB ( $p = 0.65$ ) were not modified by treatment. Acute phase proteins were not affected and PON ( $p = 0.22$ ), haptoglobin ( $p = 0.53$ ) and albumin ( $p = 0.10$ ). It was concluded that cows supplemented with more yeast yeast culture enzymatically hydrolyzed (CL-LHE) from pre-birth through the first half of lactation did not alter the metabolic pattern, the inflammatory status and the resumption of ovarian activity. However, supplementation positively affects the reproductive performance and the production of milk with a shorter interval delivery design.

Key words: yeast; inflammatory *status*; metabolism;



## Lista de Figuras

Figura 1	Protocolo de IATF, adaptado Heatsynch.....	20
Figura 2	Intervalo Parto Concepção entre grupo CL- LHE e grupo controle.....	22
Figura 3	Efeito da suplementação com cultura de levedura mais levedura hidrolisada enzimaticamente (CL-LHE) desde o pré-parto até os 150 dias pós-parto sobre o intervalo parto-concepção (IPC).....	23
Figura 4	Média da atividade de PON (A; U/mL), Média da concentração de Haptoglobina (B; g/dL), Média da concentração de Albumina (C; g/dL) durante o período avaliado que compreendeu do -21 dias pré- parto até 42 dias pós-parto.....	24
Figura 5	Média da concentração de PUN (D; mg/dL), Média da concentração de Colesterol (E; mg/dL), Média da concentração de HDL (F; g/dL) durante o período avaliado que compreendeu do -21 dias pré- parto até 42 dias pós- parto.....	25
Figura 6	Concentração sérica de BHB (mEq/L) durante o período de transição.....	27
Figura 7	Concentração sérica de AGNE (mEq/L) durante o período de transição.....	27

## Lista de Tabelas

Tabela 1	Estimativa de oferta dos ingredientes da dieta fornecida aos animais desde o pré-parto (-21 dias) até 150 dias pós-parto, para os grupos Controle e CL-LHE.....	18
Tabela 2	Ingredientes e composição da dieta fornecida aos animais desde o pré-parto (-21 dias) até 150 dias pós-parto, para os grupos Controle e CL-LHE.....	18

## Lista de Abreviaturas e Siglas

AGV	Ácidos Graxos Voláteis
AGNE	Ácidos Graxos Não Esterificados
APPs	Proteínas de Fase Aguda
BEN	Balanço Energético Negativo
BHB	$\beta$ Hidroxibutirato
CCS	Contagem de Células Somáticas
CL	Corpo Lúteo
CL- LHE	Extrato de levedura, cultura de levedura e levedura hidrolisada
DG	Diagnóstico de Gestação
EDTA	Anticoagulante �cido etilenodiaminotetracético
HDL	Colesterol de alta densidade
Hp	Haptoglobina
IA	Inseminac�o Artificial
IATF	Inseminac�o Articial em Tempo Fixo
IPC	Intervalo Parto Concepção
LDL	Colesterol de baixa densidade
MOS	Mananoligossacar�deos
N	Nitrogênio
NEFA	�cidos Graxos Não Esterificados (em inglês)
P4	Progesterona
PMN	Polimorfonucleares
PON	Paraoxanase
PUN	Nitrogênio Ur�ico Plasmático
SC	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

## Sumário

<b>1. Introdução Geral .....</b>	<b>13</b>
<b>2. Metodologia.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Local.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2 Animais, dieta e manejo .....</b>	<b>17</b>
<b>2.3 Análises de sangue e coletas séricas.....</b>	<b>19</b>
2.3.1 Avaliação de proteínas de fase aguda .....	19
2.3.2 Avaliação do metabolismo proteico e lipídico.....	20
<b>2.4 Performance Reprodutiva: .....</b>	<b>20</b>
<b>2.5 Análises Zootécnicas: .....</b>	<b>21</b>
<b>2.6 Análise Estatística: .....</b>	<b>22</b>
<b>3. Resultados e Discussão .....</b>	<b>22</b>
<b>4. Discussão.....</b>	<b>28</b>
<b>5. Conclusão .....</b>	<b>34</b>
<b>6. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>35</b>

## 1 Introdução Geral

O desenvolvimento da pecuária leiteira é um importante segmento da pecuária nacional. Em 2013 o Brasil produziu 35 bilhões litros de leite (IBGE, 2013). Aproximadamente 90% dos sistemas de produção de leite são extensivos e nestes, o pasto corresponde a 85% da dieta. No entanto, a falta de manejo e nutrição adequados são os principais responsáveis pelo baixo desempenho produtivo (Mezzadri et al., 2012). Em contrapartida, a região Sul tem se destacado pelo aumento da produção de leite, que cresceu 45% nos últimos cinco anos (3,1 bilhões de litros de leite). Esse aumento, é um exemplo do potencial da cadeia do leite em nível regional e nacional, ao mesmo tempo em que demonstra a capacidade que o país tem para atender o mercado interno (Mezzadri et al., 2012). Neste contexto, a intensificação e tecnificação dos sistemas de produção tornam-se aspectos importantes a serem considerados para maior rentabilidade do produtor a baixo custo (Wittwer et al., 2000a).

A alta exigência nutricional, produtiva e reprodutiva são fatores predisponentes a uma maior incidência de transtornos metabólicos durante a lactação (Goff, 1997 e Buckley, 2003). Durante o período de transição (três semanas que antecedem o parto até a terceira semana de lactação), as vacas passam por um balanço energético negativo (BEN), caracterizado pela redução da ingestão de matéria seca em relação ao pico de produção (Campos et al., 2007). A intensidade do BEN varia de acordo com o manejo realizado durante o pré- parto e as severas adaptações decorrentes dos processos metabólicos do início da lactação (Overton et al., 2004).

Entretanto, o período de transição continua sendo um grande desafio dentro dos rebanhos leiteiros, resultando em importantes perdas econômicas consequentes dos desequilíbrios nutricionais que afetam diretamente o desempenho produtivo e reprodutivo desses animais, pois as alterações metabólicas e fisiológicas se apresentam paralelamente no período da involução uterina e retomada da atividade ovariana (Drackley, 1999 e Hayirli, 2002). Um dos princípios de manejo para atenuar os efeitos deletérios do período de transição é utilizar estratégias e práticas nutricionais. Dentre estas se destacam a utilização de incremento energético da dieta como a gordura protegida (Cervoni et al., 2006), estratégias metafiláticas de aproveitamento energético (Pereira et al., 2013) e a utilização de aditivos e suplementos que melhorem a eficiência ruminal e captação de energia (Yuan et al.,

2015). Outros estudos têm demonstrado que a suplementação com levedura aumenta a ingestão de alimento, produção de leite, produção de ácidos graxos voláteis (AGV) e digestibilidade da matéria orgânica (Desnoyers et al., 2009).

Nesta condição, com o objetivo de complementar o aproveitamento dos alimentos ingeridos pelos animais uma estratégia bastante utilizada na nutrição animal é a suplementação com cultura de levedura e levedura hidrolisada enzimaticamente (CL-LHE). A suplementação de levedura tem demonstrado aumentar a ingestão de alimentos e produção de leite em alguns estudos com vacas leiteiras em lactação precoce, mas os mecanismos de ação pelos quais a levedura age permanecem desconhecidos (Yuan et al., 2015). As leveduras vivas têm sido amplamente utilizadas na nutrição animal, visando melhorar o desempenho produtivo através do estabelecimento do meio anaeróbio para fungos, bactérias e protozoários ruminais. A levedura mais utilizada é a *saccharomyces cerevisiae* (SC), extraída de resíduos de cervejarias e pães. Considerando os efeitos benéficos da levedura em relação ao metabolismo animal (Wallace et al., 1994), ingestão de matéria seca e produção de leite, a resposta pode ser variável em relação aos níveis de suplementação, estágio de lactação e composição das dietas fornecidas (Adams et al., 1995). A atividade respiratória de SC é maior que a concentração de O<sub>2</sub> que entra no fluido ruminal, com isso pequenas quantidades de levedura podem trazer resultados satisfatórios no desempenho de vacas leiteiras (Newbold et al., 1996). Além disso, o pH ideal para o crescimento de leveduras é de 4,5, sendo que o pH ruminal é em torno de 6,4 a 7,0, e a temperatura para o seu crescimento ótimo é ao redor de 25° C, que desfavorece o seu desenvolvimento no ambiente ruminal (39°C), sendo necessário introduzi-la diariamente na dieta.

Enfermidades causadas por disfunções ruminais estão associadas a elevados níveis de proteínas de fase aguda (APPs). Estas são indicadores de distúrbios com consequente resposta inflamatória. A liberação de citocinas pró inflamatórias foi citada por Drackley (2005), com efeito principal na liberação de proteínas de fase aguda, como haptoglobina. Este evento é representado por estresse imunológico, desvio metabólico (Elsasser et al., 2000), podendo estes ser agravados em torno do parto (Jonhson e Frinck, 2001). Citocinas pró inflamatórias também são caracterizadas por menor ingestão de matéria seca, exacerbando assim o balanço energético negativo, bem como menor eficiência reprodutiva e diminuição na produção de leite (Bertoni et al., 2000). Na parede das leveduras estão presentes os

mananos e glucanos, responsáveis por estimular a resposta imune (Franklin et al., 2005). Tem sido sugerido que componentes da parede celular da levedura seriam os responsáveis pela ação local e sistêmica das leveduras sobre o sistema imune. A parede celular compreende de 15% a 30% do peso seco da levedura, sendo constituída por um conjunto de oligossacarídeos denominados de mananoglicosacarídeos (MOS). A composição dos MOS pode variar de acordo com a cepa, as condições de cultivo e a idade da cultura, mas, geralmente, corresponde a 30% a 50% de  $\beta$ -(1,3) glucanos, 10% de  $\beta$ -(1,6) glucanos, de 25% a 50% de mananas e de 1% a 3% de quitina (Lipke e Ovalle, 1998). Os glucanos possuem a habilidade de estimular o sistema imune dos mamíferos, especialmente por meio de respostas inflamatórias. A ativação dos macrófagos pelos  $\beta$ - glucanos aumenta seu tamanho e número, estimulando a secreção de citocinas, aumentando a fagocitose de antígenos e ativando, de maneira inespecífica, o sistema imunológico (Moran et al., 2004).

Estudos demonstraram que a utilização de leveduras e seus produtos durante o período de transição tem efeito no rúmen, estabilizando seu pH, aumentando a digestibilidade da fibra, aumentando a ingestão de matéria seca e tendo consequências no aumento da produção de leite e em seus componentes como a gordura (Desnoyers, 2009 e Yuan, 2015). O desempenho produtivo para produção leiteira é dependente de um correto manejo nutricional nos períodos pré e pós- parto. O diagnóstico de distúrbios metabólicos, ocorridos em consequência da dieta, bem como a correção desta, durante o período de transição tem atraído a atenção de profissionais e produtores com o intuito de aumentar a produtividade dos rebanhos leiteiros. Diante do exposto, diversas doenças assumem considerável importância, sendo que as enfermidades relacionadas ao manejo alimentar influenciam a eficiência produtiva e intervalo entre partos em vacas leiteiras (Lucy, 2007 e Sartori, 2007).

No entanto, trabalhos investigando a suplementação com leveduras e seus produtos em sistemas semi-extensivo de produção de leite e seus impactos no desempenho reprodutivo e respostas inflamatórias ainda são escassos. Nos últimos 60 anos, os pesquisadores indicam uma importante relação, onde o desempenho reprodutivo de vacas de alta produção está sendo negativamente afetado (Butler et al., 2012). Não existe dúvida de que a produção por vaca aumentou consideravelmente, mas não está claro o quanto desse aumento pode explicar a

aparente diminuição na fertilidade (Butler et al., 2012). A medida que se aumenta a seleção genética por produção de leite, aumenta-se o número de inseminações/concepção. O aumento da mobilização de reservas corporais no início da lactação tem marcado efeitos sobre a função ovariana e desempenho reprodutivo (Butler, 2003 e Santos, 2004). Além do período fisiológico de déficit de energia, fatores ambientais que agravam as necessidades energéticas de vacas leiteiras no início da lactação podem comprometer ainda mais o consumo de energia e desempenho reprodutivo (Kalmus et al., 2009).

O objetivo deste estudo foi determinar o efeito da suplementação com cultura de levedura mais levedura hidrolisada enzimaticamente sobre o desempenho reprodutivo, perfil metabólico e status inflamatório de vacas em um sistema semi-extensivo desde 21 dias pré- parto até 150 dias pós-parto. Sendo assim, a hipótese deste trabalho é que vacas leiteiras suplementadas com CL- LHE, durante o peri parto, melhoram o *status* inflamatório, através da resposta imune antecipando a primeira ovulação pós- parto e o desempenho reprodutivo.



## **2. Metodologia**

### **2.1 Local**

O experimento foi conduzido de Julho de 2013 a Fevereiro de 2014, em uma fazenda comercial localizada em Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil (32 ° 16 'S, 52 ° 32' E). A topografia local é tipicamente formada por planícies e por regiões de banhado, que são leves depressões que alagam durante temporadas de chuva. O clima do município é subtropical ou temperado, com verões moderados (temperatura média de 28°C) e invernos frios (temperatura média de 5°C).

### **2.2 Animais, dieta e manejo**

O comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas, sob número de registro 6040, aprovou todos os procedimentos realizados. Foram utilizadas 30 fêmeas multíparas da raça holandês selecionadas pelo número de lactações ( $\geq 3$  lactações) e histórico negativo para doenças clínicas e reprodutivas na lactação anterior. As vacas eram ordenhadas duas vezes ao dia em um intervalo de 12 horas, com uma média de produção de 28 litros/vaca/dia. A média do escore de condição corporal foi de 2,6. Os animais no período pré-parto permaneciam em piquete de campo nativo, recebendo concentrado e volumoso no cocho. Após o parto os animais recebiam a dieta da fase colostro, recebendo concentrado e volumoso após a ordenha até aproximadamente 12 dias quando passavam a receber a dieta da fase de lactação também com fornecimento de concentrado e volumoso após a ordenha onde permaneceram até o final do período experimental. As dietas foram formuladas para exceder ou igualar os requerimentos segundo o NRC, 2001 estão demonstradas na tabela 1.

Tabela 1. Estimativa de oferta dos ingredientes da dieta fornecida aos animais desde o pré-parto (-21 dias) até 150 dias pós-parto, para os grupos Controle e CL-LHE.

<b>Dieta</b>	<b>Itens</b>	<b>Estimativa (kg/dia)</b>
<b>Pós-parto</b>		
	Azevém	7.8
	Pré secado azevém	3
	Concentrado	11.7
<b>Pré-parto</b>		
	Silagem de sorgo	4.8
	Palha de arroz	3.5
	Campo Nativo	5
	Concentrado	4.5

Tabela 2: Ingredientes e composição da dieta fornecida aos animais desde o pré-parto (-21 dias) até 150 dias pós-parto, para os grupos Controle e CL-LHE.

<b>Ingredientes, %MS na dieta</b>	<b>Dieta</b>	
	<b>pré-parto</b>	<b>pós-parto</b>
Concentrado <sup>1</sup>	17,99	52,00
Pré secado	.	13,33
Azevém	.	34,67
Silagem de sorgo	17,27	.
Palha de arroz	10,79	.
Campo nativo	53,96	.
<b>Composição nutricional</b>		
<b>%</b>		
MS	87,14	74,86
Cinzas	8,23	8,47
PB	9,69	10,39
FDN	50,50	53,56
FDA	27,22	28,82
EE	1,92	2,29

<sup>1</sup>Concentrado: casca de soja, farelo de arroz, milho moído, sorgo moído, farelo de soja, calcário, bicarbonato de sódio, premix vitamínico, ureia e NaCl.

## 2.3 Análises de sangue e coletas séricas

As coletas de sangue para análises bioquímicas ocorreram nos dias -21, -14 e -7 dias em relação ao parto (período pré-parto). Após o parto as coletas ocorreram nos dias: 0, 3, 7, 14, 21, 28, 35 e 42. Para avaliar a retomada da atividade ovariana coletou-se sangue semanalmente do 14º dia até o 35º dia pós- parto para mensurar o nível de progesterona (P4) sérica sanguínea circulante neste período, considerando vacas com  $\geq 1\text{ ng/ml}$  em duas coletas consecutivas como animais que retornaram a atividade estral. As coletas foram realizadas através do complexo vascular coccígeo usando tubos tipo *vaccuntainer* contendo o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) com capacidade de 5 mL. Todas as amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos e o soro ou plasma foram separados, acondicionados em microtubos de 1,5mL congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posteriores análises bioquímicas.

### 2.3.1 Avaliação de proteínas de fase aguda

Para determinação da atividade PON foi utilizado um protocolo previamente descrito (Browne et al., 2007). Brevemente, foi utilizado um tampão Tris/HCl 20 mM, contendo 1 mM de cloreto de cálcio e 4mM de fenilacetato como solução de trabalho. As amostras foram diluídas (1:3) em Tampão 20mM Tris/HCl. A leitura foi realizada em espectrofotômetro, adicionando-se 3,3  $\mu\text{L}$  da amostra diluída em 500  $\mu\text{L}$  da solução de trabalho. O comprimento de onda utilizado foi de 270 nm e um tempo de leitura de 1 minuto. A atividade da enzima foi determinada pela seguinte fórmula:  $\Delta$  Absorbância x 115 x 3. A atividade da PON foi expressa em U/mL.

A haptoglobina foi analisada pela técnica colorimétrica descrita por Jones e Mould, 1984 e absorvância realizando a leitura em um leitor de placas (Thermo Plate® TP-Reader, São Paulo, Brasil). As concentrações de albumina foram medidas colorimetricamente utilizando kits comerciais (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, SP, Brasil).

### 2.3.2 Avaliação do metabolismo proteico e lipídico

Os teores séricos de uréia e colesterol foram determinados, através da análise colorimétrica por kit comercial (Labtest, Belo Horizonte, Brasil). Já o Colesterol- HDL (colesterol ligado a proteínas de alta densidade), foi determinado a partir do sobrenadante, obtido após a centrifugação. As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro BioEspectro<sup>®</sup> SP 220 (Bioespectro, Curitiba, Brasil).

Realizou-se através de mensurações dos níveis de ácidos graxos não esterificados (AGNE) e  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB) através de kits comerciais (Wako NEFA-HR, Wako Chemicals EUA <sup>®</sup>, Richmond, EUA e BHBA: Ranbut, Randox <sup>®</sup> Laboratories Ltd, UK) de acordo com o método descrito por Ballou (2009).

### 2.4 Performance Reprodutiva:

A partir dos 37 dias pós-parto as vacas foram submetidas a um exame ginecológico completo e iniciou-se um protocolo de sincronização da ovulação de acordo com o manejo estabelecido pela fazenda. Nos animais que apresentassem corpo lúteo, administrava-se uma dose (25mg/ml) de prostaglandina (Lutalyse<sup>®</sup>, Zoetis) para fazer a lise do CL e a partir deste momento, eram realizadas observações de cio duas vezes por dia para posterior inseminação artificial (IA). Caso contrário, se não houvesse CL, aos 60 dias pós-parto esses animais retornavam para iniciar o protocolo de sincronização e posterior inseminação artificial em tempo fixo (IATF). O protocolo consistia na inserção de um dispositivo intravaginal liberador de progesterona (CIDR<sup>®</sup>; Pfizer Saúde Animal, Brasil) no Dia 0 do protocolo, concomitantemente com a aplicação i.m. de 2mg de Benzoato de Estradiol (Gonadiol<sup>®</sup>, Zoetis, Brasil). No Dia 7 foi realizada a remoção do CIDR, seguido da injeção i.m. de 25 mg de um análogo da prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$  (PG; Lutalyse<sup>®</sup>, Zoetis Saúde Animal, Brasil). Já no dia 8, foi realizada uma aplicação i.m. de 1 mg de cipionato de estradiol (ECP<sup>®</sup>, Zoetis Saúde Animal, Brasil) e 48 horas depois realizada a inseminação dos animais que não foram observados em estro. Animais observados em cio entre os dias 7 e 9 do protocolo eram inseminados 12 horas após a detecção. O diagnóstico de gestação (DG) era realizado por

ultrassonografia, através do aparelho Weeld Wed (3100v), com transdutor linear transretal de frequência 5.5MHz aos 30 e 60 dias após a IA. Através da análise de performance reprodutiva eram gerados e coletados os seguintes dados: intervalo parto-concepção (IPC) e taxa de prenhez. O IPC foi calculado a partir da data da última IA, subtraída da data do último parto, considerando o limite máximo de 150 dias pós-parto. As mensurações das concentrações séricas de progesterona foram determinadas através do método de radioimunoensaio (Coat-A-Count<sup>®</sup>, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA) como descrito em Burke (2003) em um laboratório específico para esta análise na cidade de São Paulo/SP.

Dos 30 animais utilizados no estudo, um deles foi excluído por apresentar endometrite clínica, permanecendo 29 animais, sendo 15 pertencentes ao grupo CL-LHE e 14 ao grupo controle.

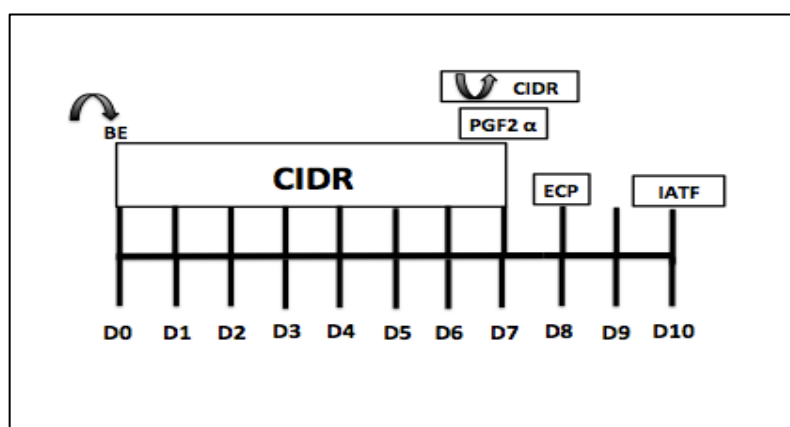


Figura 1. Protocolo de IATF, adaptado Heatsynch.

## 2.5 Análises Zootécnicas:

Os dados de produção de leite por vaca/dia, peso corporal, escore de condição corporal foram coletados semanalmente durante todo o período experimental.

## **2.6 Análise Estatística:**

As variáveis avaliadas foram: 1ª ovulação, IPC, taxa de prenhez, produção de leite, APPs, colesterol, HDL, PUN, AGNE e BHB. Para todas as variáveis foi feito uma análise de variância utilizando um modelo com medidas repetidas no tempo. O modelo incluiu os efeitos fixos de tratamento (grupo CL- LHE e controle), tempo e suas interações, além do efeito casualizado da vaca. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa NCSS 2005. O intervalo entre parto e concepção foi analisado por análise de sobrevivência utilizando o modelo de Kaplan-Meier (Kaplan e Meier, 1958) através do procedimento Kaplan-Meier Survival Curves. Vacas que permaneceram não gestantes aos 150 dias pós-parto foram bloqueadas aos 150 dias. Para o cálculo da média do IPC foi realizada uma análise de variância (ANOVA) utilizando o procedimento no programa. Nas análises de frequências em variáveis qualitativas foi utilizado o teste de qui-quadrado através do procedimento CROSS TABULATION. Em todos os testes o nível de significância utilizado foi de  $P < 0,05$ , valores de  $P$  entre 0,05 e 0,1 foram aceitos como tendência.

## **3. Resultados e Discussão**

### **Performance Reprodutiva**

Em relação ao intervalo parto concepção (IPC), houve diferença ( $p=0,02$ ) entre os grupos, conforme observado na Figura 2. Corroborando com este indicativo, a porcentagem de vacas gestantes até os 150 dias de lactação também foi diferente ( $p=0,04$ ) entre as vacas suplementadas com SC (64,3%) e grupo controle (26,7 %), como pode ser observado na Figura 3.

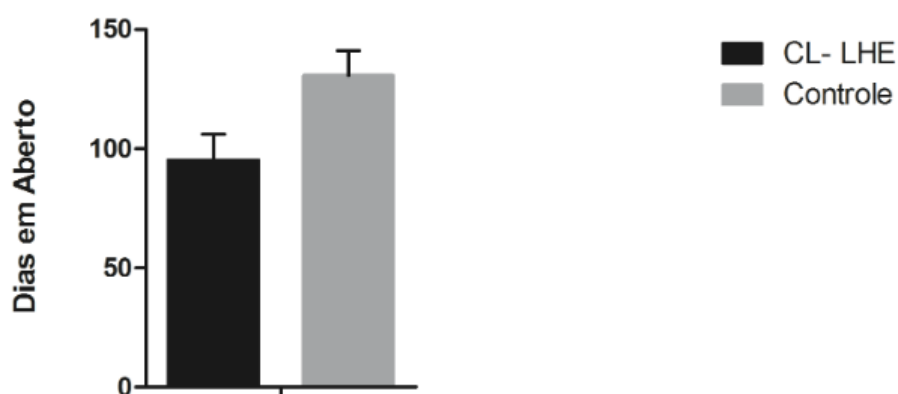


Figura 2. Intervalo Parto Concepção entre grupo CL-LHE e controle ( $p=0,02$ )

Das 29 vacas avaliadas, somente 12 ovularam até os 35 dias e destas, 6 eram do grupo que recebeu suplementação e seis do grupo controle. A média de dias para a primeira ovulação foi de  $23,33 \pm 2,8$  dias no grupo CL – LHE e de  $29,16 \pm 2,8$  dias para o grupo controle, não havendo diferença ( $p=0,18$ ) entre os grupos sobre o retorno à ciclicidade. Todos os animais que apresentassem CL a partir dos 37 dias recebiam uma dose de prostaglandina, podendo ser inseminadas a partir deste momento conforme observado na figura abaixo. Caso isso não ocorresse, aos 60 dias todas as vacas eram submetidas ao protocolo de IATF e observa-se o retorno do cio.

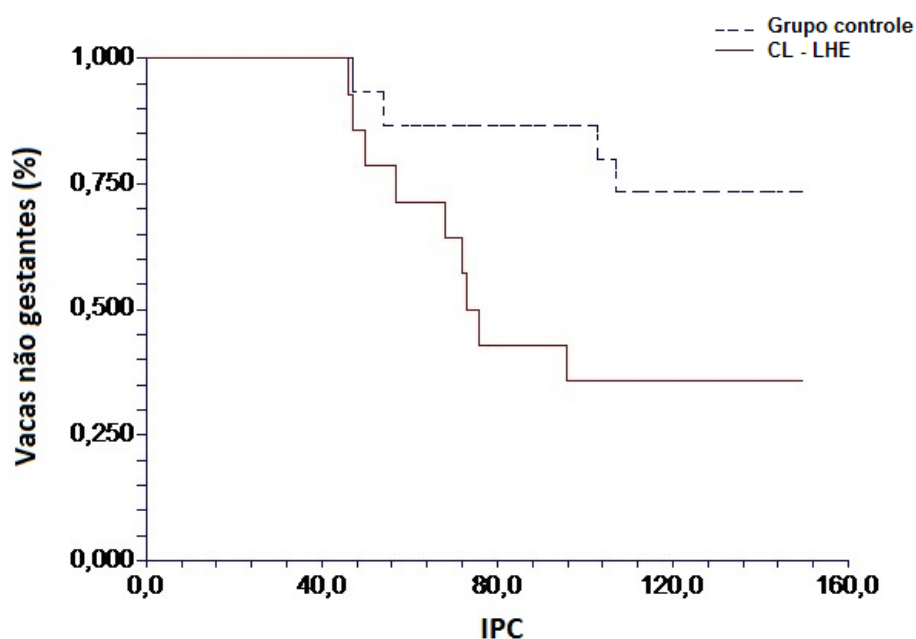


Figura 3. Efeito da suplementação com cultura de levedura mais levedura hidrolisada enzimaticamente (CL-LHE) desde o pré-parto até os 150 dias pós-parto sobre o intervalo parto-concepção (IPC)

### **Proteínas de Fase Aguda**

Em relação as proteínas de fase aguda, não houve diferença ( $p > 0,05$ ) entre os dois grupos estudados, conforme demonstrado na Figura 4.



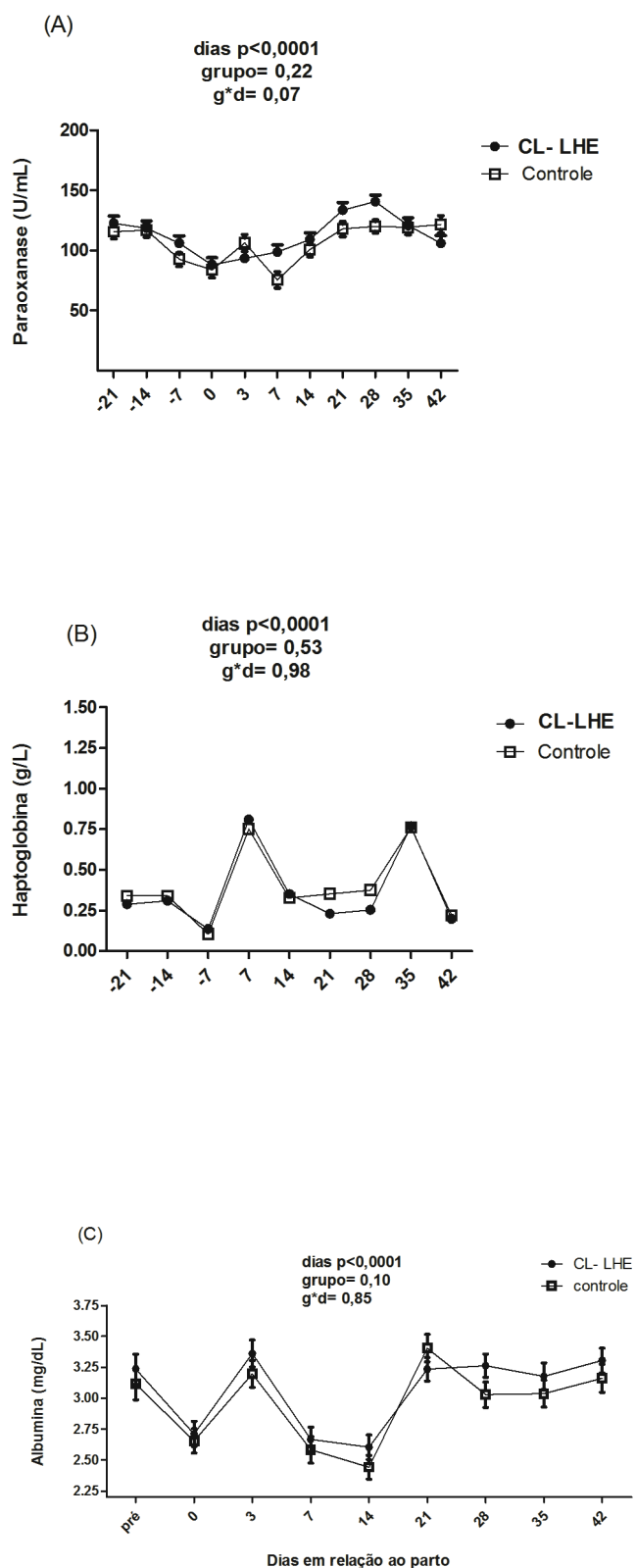


Figura 4. Média da atividade de PON (A; U/mL), Média da concentração de Haptoglobina (B; g/dL), Média da concentração de Albumina (C; g/dL) durante o período avaliado que compreendeu do -21 dias pré- parto até 42 dias pós- parto.

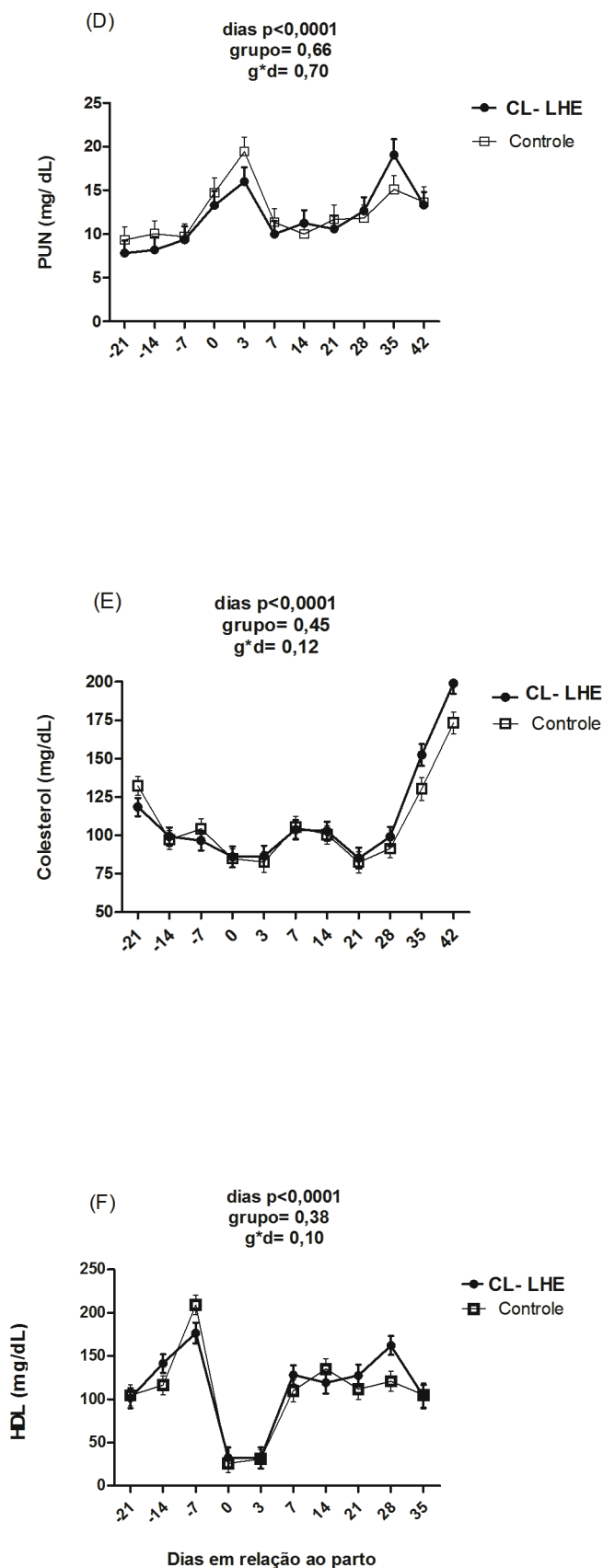


Figura 5. Média da concentração de PUN (D; mg/dL), Média da concentração de Colesterol (E; mg/dL), Média da concentração de HDL (F; g/dL) durante o período avaliado que compreendeu do -21 dias pré- parto até 42 dias pós- parto.

## Metabólitos no Plasma

Avaliou-se, BHB, AGNE (figura 6 e 7 respectivamente), onde não foi encontrado diferenças ( $P>0,05$ ), e também PUN (nitrogênio ureico no plasma) ( $p=0,66$ ) Colesterol ( $p=0,45$ ), onde não houve influência do tratamento sobre os grupos no período avaliado.

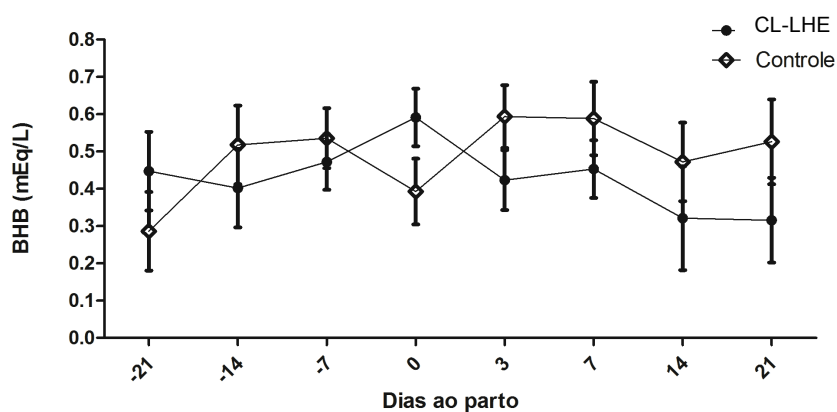


Figura 6: Concentração sérica de BHB (mEq/L) durante o período de transição ( $p=0,65$ ).

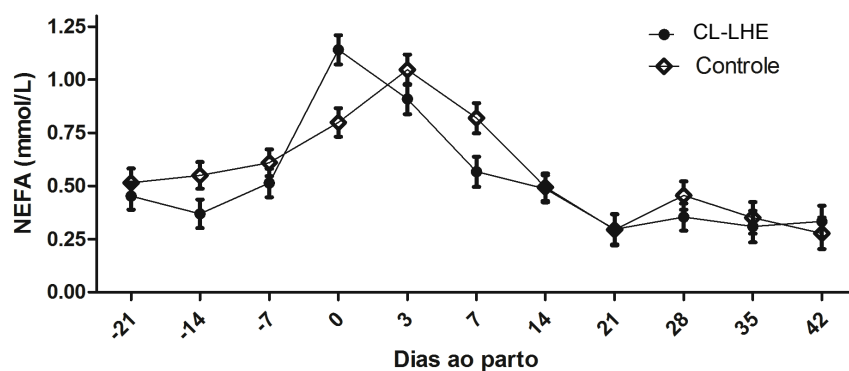


Figura 7: Concentração sérica de AGNE (mmol/L) durante o período experimental avaliado ( $p=0,55$ ).

## **Produção de Leite e ECC**

As vacas suplementadas obtiveram uma produção média de leite de 27,75 litros/vaca/dia, enquanto as vacas do grupo controle 24,98 litros ( $p=0,05$ ) até 150 dias de lactação. Em relação ao ECC, não houve diferença ( $p>0,05$ ), sendo 2,66 para o grupo suplementado e 2,53 para o grupo controle em uma escala de 1 a 5. Embora tenha sido observado um efeito ( $P<0,01$ ) da variação da ECC ao longo do período estudado.

## **4. Discussão**

Em sistemas de produção de bovinos de leite, a variável de maior impacto sobre o desempenho reprodutivo é o intervalo parto-concepção (Lucy et al., 2001). Ainda, esta medida é fundamental para determinar o intervalo entre partos que, considerando-se um período voluntário de espera (PVE) médio de 60 dias, apresentaria como um limite superior aceitável de 85 dias para a re-concepção (Stevenson et al., 2005). Contudo, pode-se aceitar variações economicamente viáveis quando este limite não supera os 110 dias (Jainudeen e Hafez, 2000). Considerando-se então esta variável, o grupo suplementado apresentou desempenho satisfatório em comparação ao grupo controle, apresentando resultado médio abaixo dos 110 dias. Este fato é resultante final de uma série de processos fisiológicos que ocorrem durante o pós-parto, nos quais os sistemas endócrinos, reprodutivo e o metabolismo geral da vaca estão envolvidos (Hess, 2005 e Roche, 2006). Ainda neste sentido, a taxa de prenhez das vacas suplementadas foi maior até os 150 dias de lactação, sendo possível observar o momento de concepção das vacas em cada grupo estudado.

Durante o período avaliado neste estudo (primeira metade da lactação) há o início de uma redução mais acentuada da curva de produção de leite, bem como dentro do manejo da propriedade é o momento em que a dieta das vacas era modificada para atender um momento de menores exigências. Sendo assim, é possível inferir que as vacas suplementadas foram capazes de conceber antecipadamente em um momento de maior desafio metabólico o qual apresentava grandes exigências para a produção de leite e à própria reprodução.

O intervalo parto 1<sup>a</sup> ovulação é um parâmetro reprodutivo de extrema importância, pois segundo Butler (2003), vacas que retornam à ciclicidade mais cedo concebem mais precocemente, uma vez que recuperam os equilíbrios cíclicos e níveis dos hormônios esteróides e ambiente uterino viável à concepção de forma antecipada. No entanto, neste estudo o tratamento não afetou a antecipação da ovulação e, portanto, não foi fator preponderante a influenciar o resultado do IPC e na taxa de gestação. Em um estudo similar, ambos os grupos tiveram uma retomada da atividade ovariana semelhantes, sendo 37 e 35 dias, respectivamente para o grupo suplementado e controle (El- Desouky et al., 2014). Uma possível explicação para os resultados obtidos em nosso trabalho é que possíveis fatores ligados à saúde uterina possam ter determinado a concepção antecipada das vacas suplementadas. É fundamental um ambiente uterino adequado para a fertilização e desenvolvimento embrionário e fetal (Pursley e Martins, 2011).

Krause (2014), estudando vacas leiteiras em condições similares a este atual estudo, observaram que as infecções uterinas podem ter um papel chave sobre a resposta ovulatória e consequente desempenho reprodutivo, pois vacas que possuem maior porcentagem de células polimorfonucleares (PMN) levaram mais tempo para a primeira ovulação e conseqüentemente, houve uma interferência negativa para a concepção. Outra possibilidade de justificativa aos resultados de melhor desempenho reprodutivo observado neste estudo seja o aproveitamento e digestibilidade da dieta oferecida às vacas, uma vez que como observado em estudos recentes o animal suplementado com leveduras se alimenta mais vezes durante o dia em um curto período de tempo, tendo potencial impacto sobre o status metabólico e conseqüentemente inflamatório durante este momento crítico (DeVries e Chevaux, 2014). Embora os mecanismos que interferiram nesta resposta possam ter ocorrido de forma indireta e não estejam bem esclarecidos, alguns aspectos podem ser elucidados por outras vias, como a metabólica ou inflamatória.

Esta pesquisa foi conduzida durante o período de transição, momento fisiológico determinante para vacas leiteiras retornarem à ciclicidade, produzirem leite e prepararem-se para uma nova gestação (Castro et al., 2012). Denominam-se proteínas de fase aguda (APPs), aquelas cuja as concentrações séricas variam quando uma inflamação é detectada. Elas podem ser caracterizadas negativas (Albumina), quando diminuem em resposta a inflamação ou positivas (PON, Haptoglobina) quando aumentam sob o mesmo estímulo inflamatório. Em animais

saudáveis, geralmente as concentrações destas proteínas são baixas ou não detectáveis (Thomas et al., 2010). Dentro da metodologia adotada ao início do experimento, animais com histórico negativo para doenças infecciosas e uterinas na lactação anterior, não esperava-se alteração no *status* inflamatório. Porém, houve efeito de dias em relação ao parto. Em condições fisiológicas, a resposta inflamatória está comprometida neste momento de transição, onde a vaca gestante passa para a condição de lactante e por isso talvez não tenha capacidade de expressar a sua função de forma completa. A levedura possui na sua parede mananos e glucanos, que são responsáveis por ativar citocinas e consequentemente modular a resposta imune com repercussões diretas ou indiretas no desempenho produtivo e reprodutivo (Franklin et al., 2005). Uma série de moléculas sinalizadoras são liberadas pela ativação de células imunes, incluindo mediadores inflamatórios como prostaglandinas e citocinas.

Assim, a CL-LHE, possui uma composição diferenciada de outros produtos já existentes no mercado e por isso, parece controlar melhor a resposta relacionada ao sistema imune através do estabelecimento de mecanismos diretos e indiretos citados anteriormente. Com isso, era esperado que a utilização da suplementação com CL-LHE fosse modificar o padrão geral de concentração e atividades das APPs, o que não foi encontrado. No entanto, conforme pôde ser observado, a atividade da PON não diferiu entre os grupos, porém, houve uma tendência na interação grupo e dias, sendo que a partir dos sete dias após o parto, momento já esperado para o desencadeamento de respostas inflamatórias, a concentração de PON demonstrou um retorno antecipado aos níveis normais no grupo suplementado. Sendo assim, pode-se supor que há um indício de recuperação do parto antecipada no grupo CL-LHE, em relação ao controle nesse momento específico. É importante salientar que a informação em relação a sensibilidade e atividade desta proteína é recente e ainda restrita. Em outros trabalhos, a baixa atividade no plasma da PON no período do periparto, foi associado com o aumento da incidência de metrite no período pós-parto recente (Bionaz et al., 2007), bem como tendeu a ser determinante ao retorno à ciclicidade de vacas leiteiras (Krause et al., 2014).

A Albumina é a principal proteína plasmática sintetizada no fígado, representando de 50 a 65% do total de proteínas séricas. Pode ser considerada como um indicador mais sensível para avaliar o status nutricional protéico do que as proteínas totais. Valores persistentemente baixos de albumina sugerem inadequado

consumo de proteínas (Fournier et al., 2000). A albumina também pode ser considerada uma proteína de fase aguda negativa, quando diminuída no plasma é um indicador de falha na função hepática (Bertoni et al., 2008) e doença uterina (Burke et al., 2010). No presente estudo, nenhuma diferença foi observada em relação a Albumina, sendo um importante biomarcador de status energético e inflamatório em associação com a performance reprodutiva de vacas no pós-parto recente. Contreras (2000) cita que o nível de albumina sofre uma diminuição no início da lactação, a qual começa a se restabelecer desde que o aporte de proteínas na dieta seja adequado. Por outro lado, a haptoglobina é produzida em nível baixo em vacas saudáveis e a produção aumenta quando as vacas são diagnosticadas algum tipo de alteração inflamatória (Huzzey et al., 2009).

A interação entre os sistemas metabólicos, imunológico e endócrino, diminuiu a competência imunológica ao parto aumentando a susceptibilidade do hospedeiro a infecções (Trevisi et al., 2011). Neste estudo não foi observado nenhuma alteração no padrão de haptoglobina. No entanto, no dia 7 pós-parto houve um pico que pode ser explicado em consequência do parto, pois há um comprometimento do sistema imune. Porém aos 35 dias outro aumento foi observado. Deve-se considerar, que esta proteína possui alta sensibilidade para a detecção subclínica de variações relacionadas a processos inflamatórios ou infecciosos nos ruminantes (Eckersall et al., 2001), como também seu aumento pode estar relacionado como resultado da resposta ao cortisol a algum tipo de manejo na propriedade (Thomas et al., 2010). No entanto, não foi possível relacionar o aumento dos níveis da haptoglobina no dia 35 pós-parto com nenhuma modificação no manejo ou ocorrência de alguma possível resposta inflamatória.

Como uma via alternativa, o BHB é sintetizado a partir da oxidação dos ácidos graxos e pode ser utilizado como combustível para energia, mas em concentrações suficientemente elevadas torna-se prejudicial para a função imunitária e metabólica, aumentando o risco de distúrbios metabólicos e infecciosas (Ingvarsen e Moyes, 2013). No período de transição, há uma deficiência energética, o nível de AGNE pode aumentar quando ocorre maior mobilização de lipídeos, regulada por hormônios como o cortisol e glucagon. O aumento de AGNE e BHB também pode ser prejudicial para a função imunológica em vacas no peri parto e está associada ao prolongamento da recuperação uterina (Wathes et al., 2007), entretanto neste experimento este fato parece não ter ocorrido.

Com a suplementação com CL-LHE, esperava-se que houvesse alguma alteração no metabolismo energético e proteico em função da modificação no ambiente ruminal promovida pela levedura, como aumento de bactérias celulolíticas e melhor digestibilidade dos nutrientes, melhorando a produção de proteína microbiana (Miller et al., 2009). Ao mesmo tempo em que ocorre uma redução da produção de ácido lático ou a maior utilização deste pelas bactérias fermentadoras, ocorre a homeostase do pH ruminal, prevenindo distúrbios como acidose metabólica e conseqüentemente aumentando a síntese microbiana no rúmen, melhorando a eficiência alimentar (Chaucheyras-Durand et al., 2008). No entanto como apresentado nas figuras 6 e 7, isso não ocorreu, pois os níveis mantiveram-se estáveis durante o período avaliado. Entretanto, provavelmente o sistema de produção e o nível de produção de leite não foram tão desafiadores aos animais demonstrando assim capacidade de alterar o perfil do metabolismo lipídico, energético e proteico através da modificação ruminal.

Talvez a suplementação com levedura seja mais eficaz no período de transição e no início da lactação, quando o animal encontra-se em estresse mais intenso, relacionado principalmente a um nível de produção de leite mais elevado do que o encontrado neste estudo. Esses resultados estão de acordo com o que foi encontrado por Dann (2000), que avaliou o efeito da suplementação com levedura em dietas para vacas Jersey, primíparas e multíparas dos últimos 21 dias pré-parto até os primeiros 140 dias pós-parto sobre a ingestão de matéria seca e a produção e composição do leite.

O colesterol está diretamente relacionado com a regulação eixo- hipofisário (Kastelic et al., 2004). Esperava-se que a avaliação destes marcadores metabólicos como colesterol, HDL e uréia pudessem compreender a interação metabolismo-reprodução. O colesterol circula no plasma ligado às lipoproteínas de baixa densidade (LDL) ou de alta densidade (HDL). Valores elevados de colesterol em animais de alta produção sugerem que este metabólito pode ser um indicador da habilidade da vaca em produzir leite (Gonzalez e Scheffer, 2002). Neste estudo, não houve influência do tratamento sobre o nível sérico de colesterol e HDL, indicando que esses animais provavelmente tiveram o mesmo padrão metabólico, sem interferência do tratamento.

O metabolismo de N em vacas leiteiras envolve o suprimento de nutrientes para os microorganismos ruminais, assim como para o animal (Clayton et al., 1997).



A amônia ruminal, uréia no sangue ou plasma e uréia no leite estão altamente correlacionadas, podendo ser utilizadas para monitoramento do perfil da dieta correlacionando também com o ambiente uterino, pois segundo Hansen (2003) a fertilidade reduzida está relacionada à quantidade e composição da proteína dietética. Com isso, esperava-se que o nível de PUN pudesse influenciar na taxa de concepção, o que não foi observado, pois o metabolismo protéico também não foi afetado.

### **Produção de Leite e ECC**

A classificação do escore de condição corporal (ECC) é uma medida internacionalmente aceita para avaliar subjetiva e visualmente o estado nutricional das vacas leiteiras e as variações no balanço energético, através das mudanças de condição corporal (Walsh et al., 2011). Durante o período de suplementação a produção de leite foi maior no grupo CL- LHE (27,75 litros) do que em relação ao grupo controle (24,98 litros). Não foi observado diferença entre grupos, embora tenha sido observado um efeito da variação da ECC ao longo do período estudado, o que indica uma recuperação fisiológica ao decorrer do pós- parto recente.

## 5. Conclusão

Vacas suplementadas com cultura de levedura mais levedura hidrolisada enzimaticamente (CL-LHE) desde o pré-parto (-21 dias) até os 150 dias pós-parto não alteram o padrão metabólico, o status inflamatório e a retomada da atividade ovariana. No entanto, a suplementação afeta positivamente a produção de leite e o desempenho reprodutivo diminuindo o intervalo parto concepção.

Sendo assim, a suplementação com 28 gramas de CL-LHE atendeu as necessidades para uma produção de leite relativamente baixa, onde qualquer modificação na eficiência digestiva agiu diretamente na produção de leite.

## 6. Referências Bibliográficas

- Adams, A.L.; Harris J.R.B.; Van Horn, H.H. Effects of varying forage types on milk production responses to whole cottonseed, tallow, and yeast. **J. Dairy Sci.**, v.78, p.573-581, 1995.
- Bertoni, G.; Trevisi E.; Han X.; Bionaz M. Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.91, p. 3300–3310, 2008.
- Bionaz, M.; Trevisi E.; Calamari L.; Librandi F.; Ferrari A.; Bertoni G. Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.90, p.1740–1750, 2007.
- Clayton, M.K.; Broderick G.A. A statistical evaluation of animal and nutritional factors influencing concentrations of milk urea nitrogen. **J.Dairy Sci.**, v.80, p.2964-2971, 1997.
- Browne, R.W.; Koury S.T.; Marion S.; Wilding G.; Muti P.; Trevisan M. Accuracy and biological variation of human serum paraoxonase 1 activity and polymorphism (Q192R) by kinetic enzyme assay. **Clin Chem**, v.53, p.310 – 317, 2007.
- Buckley, F.K.; O'sullivan J.F.; Mee R.D.; Evans P. Relationship among milk yield, body condition, cow weight and reproduction in spring-calved Holstein-Friesians. **J. Dairy Sci.**, v.86, p. 2308-2319, 2003.
- Burke, C.R.; Meier S.; McDougall S.; Compton C.; Mitchell M.; Roche J.R. Relationships between endometritis and metabolic state during the transition period in pasture-grazed dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.93, p.5363– 5373, 2010.
- Butler, W.R. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. **Livest. Prod. Sci.**, v.83, 211–218, 2003.
- Butler, W.R. The Role of Energy Balance and Metabolism on Reproduction of Dairy Cows. **Department of Animal Science**, Cornell University, Ithaca, NY. v.133, p.133-145, 2012.
- Campos R.; González F.; Coldebella A.; Lacerda L. Indicadores do metabolismo energético no pós-parto de vacas leiteiras de alta produção e sua relação com a composição do leite. **Ciênc. Anim. Bras.**, v.8, p.241-249, 2007.
- Castro, N.; Kawashima C.; Van Dorland H.A.; Morel I.; Miyamoto A.; Bruckmaier R.M. Metabolic and energy status during the dry period is crucial for the resumption of ovarian activity postpartum in dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v. 95, p. 5804–5812, 2012.
- Cervoni, J. E. Gordura protegida na alimentação de ruminantes. 2006. Disponível em: <<http://www.limousin.com.br/pages/artigos/vendo.asp?ID=107>>. Acesso em: 11 de fevereiro de 2011.

Chaucheyras-Durand, F.; Walker N.D.; Bachc A. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: past, present and future. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, p. 5-26, 2008.

Contreras, P. Indicadores do metabolismo protéico utilizados nos perfis metabólicos de rebanhos. In: González F.H.D., Barcellos J.O.; Ospina H. (eds.) **Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre**. v.1, p.23-30, 2000.

Dann, H.M.; Drackley J.K.; McCoy G.C.; Hutjens M.F.; Garrett J.E. Effects of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on pre partum intake and post partum intake and milk production of Jersey cows. **J. Dairy Sci.**, v.83, p.123-127, 2000.

Desnoyers, M. Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. **American Dairy Science Association**, v.92, p.5697-5701, 2009.

De Vries, T. J.; Chevaux E. Modification on the feeding behavior of dairy cows through live yeast supplementation. **J.Dairy Sci.** (in press). v. 97, p.1-12, 2014.

Drackley, J.K. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier. **J. Dairy Sci.**, v.82, p. 2259-2273, 1999.

Drackley, J.K.; Dann H.M.; Douglas G.N.; Guretzky N.A.J.; Litherland N.B.; Underwood J.P.; Looor J.J. Prepartum dietary energy intake affects metabolism and health during the periparturient period in primiparous and multiparous Holstein cows. **J. Anim. Sci.**, v.4, p. 323- 344, 2005.

El-Desouky, A.M. Improvement of the Reproductive Performance of Dairy Cows during the transition period. **Alexandria Journal of Veterinary Sciences**, v.41, p.62-67, 2014.

Elsasser, T.H.; Klasing K.C.; Filipov N.; Thompson F. The metabolites consequences of stress: Targets for stress and priorities of nutrients use. In: Moberg, G.P.; Mench, J.A. (EDS.) *The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare*. **New York: CAB International Press**, v.91, p. 77-110, 2000.

Ekersall, P. D.; Young F. J.; McCOMB C.; Gogarth C. J.; Safi S.; Weber A.; McDonald T.; Nolan A. M.; Fitzpatrick J. L. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. **Veterinary Record**, v. 14, p. 35-41, 2001.

Fournier, T.; Medjoubi-N N.; Porquet D. Alpha-1 Acid glycoprotein. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1482, p. 157-171, 2000.

Franklin, S.T.; Newman K.E.; Meek K.I. Immune parameters of dry cows fed mannanoligosaccharide and subsequent transfer of immunity to calves. **J. Anim. Sci.**, v. 88, p.766-75, 2005.

Goff J.P.; Horst R.L. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. **J. Dairy Sci.**, v.80, p.1260-1268, 1997.

Gonzales, F.H.D.; Scheffer J.F.S. Perfil sangüíneo: ferramenta na análise clínica, metabólica e nutricional. Avaliação metabólica-nutricional de vacas leiteiras por meio de fluídos corporais. In: **Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, Gramado. **Anais...** Gramado: v.29, p.5-17, 2002.

Hess, B.W.; Lake S.L.; Scholljegerdes E.J. Nutritional controls of beef cows reproduction. **J.Dairy Sci.**, v.83, p.90-106, 2005.

Hayirli A, Grummer R.R.; Nordheim E.V.; Crump PM (2002) Animal and dietary factors affecting feed intake during the prefresh transition period in Holsteins. **J. Dairy Sci.**, v.85, p.3430–3443, 2002.

Huzzey, J.M. Short communication: Haptoglobin as a nearly indicator of metritis. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2008-1526>>. Acesso em: 27 maio, 2013.doi: 10.3168/jds.2008-1526. **J. Dairy Sci.**, v.92, p.621-625, 2009.

Ingvarsen, K. L.; Moyes K. Nutrition, immune function and health of dairy cattle. **Animal**, v.1, p.112–122, 2013.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Projeção Agropecuária. disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos\\_201303\\_publ\\_completa.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201303_publ_completa.pdf). Acesso em dezembro de 2013.

Jainudeen M.R.; Hafez E.S.E. Cattle and Buffalo. In: **Hafez B, Hafez ESE, eds. Reproduction in Farm Animals**. 7a ed. Philadelphia, United States of America: Lippincott Williams e Wilkins. v.64, p.159-167, 2000.

Johnson R.W.; Finck BN. TNFa and leptin: two players in an animal's metabolic and immunologic responses to infection. **Journal of Animal Science**, v.79 , p.118–127, 2001.

Kalmus, P.; Orro, T.; Waldmann A.; Lindjärv R.; Kask K.Effect of yeast culture on milk production and metabolic and reproductive performance of early lactation dairy cows. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.51, p.1-7, 2009.

Kastelic, J. P. Folliculogenesis in cattle. **Anais do 1º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**.v.1,p.17-25, 2004.

Krause, A.R.T.; Pfeifer L.F.M.; Montagner P.; Weschenfelder M.M.; Schwegler E.; Lima E. M.; Xavier G. E.; Brauner C.C.; Schmitt E.; Del Pino, A.B.F.; Martins, C.; Corrêa M.; Schneider, A. Associations between resumption of postpartum ovarium activity, uterine health and concentrations of metabolites and acute phase proteins during the transition period in Holstein cows. **Animal Reproduction Science**., v.145, p. 8-14, 2014.

Lipke, P. N.; Ovalle R. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 3735-3740, 1998.

Lucy M.C.; Jiang H.; Kobayashi Y. Changes in the somatotrophic axis associated with the initiation of lactation. **J. Dairy Sci.**, v.84, p.113-119, 2001.

Lucy, M. C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? **J. Dairy Sci.**, v. 84, p.1277–1293, 2007.

Mezzadri, F. P. Análise da Conjuntura Agropecuária Ano 2011/2012, SEAB, Curitiba 2012. Disponível em: [http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/leite\\_2012.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/leite_2012.pdf) acesso em 16/12/2014. 2012.

Miller, C.M.; Boulter N.R.; Ikin R.J.; Smith N.C.; The Immunobiology of the Innate Response to *Toxoplasma Gondii*. **Int J. Parasitol**, v.39, p. 23-39, 2009.

Moran, C. A. Functional components of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*: applications for yeast glucan and mannan. In: Annual Symposium of nutritional biotechnology in the feed and food industries. Nicholas ville. **Proceedings of Alltech's...** Nicholasville: Alltech Technical Publications, v.20, p. 283-296, 2004

Newbold, C.J.; Wallace R.J.; F.M. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as feed additive for ruminants. **British Journal of Nutrition**, v.76, p.249-261, 1996.

Hansen P.J.; Ocon O.M. Disruption of bovine oocytes and pre implantation embryos by urea and acidic pH. **J. Dairy Sci.**, v.86, p.1194-1200, 2003.

Overton, T.R. and Waldron, M.R. Nutritional management of transition dairy cows: strategies to optimize metabolic health. **J. Dairy Sci.**, v.87, p.105-119, 2004.

Pereira R.A.; Silveira, P.A.S.; Montagner, P.; Schneider A.; Schmitt E.; Rabassa V.R.; Pfeifer L.F.M.; Del Pino F.A.B.; Pulga M.E.; Corrêa M.N. Effect of butaphosphan and cyanocobalamin on postpartum metabolism and milk production in dairy cows. **Animal**, v.29, p. 1–5, 2013.

Pursley, R.J.; Martins J.P.N. Enhancing fertility of lactating dairy cows. **Michi. Dairy Rev.**, v.16, p.1-3, 2011.

Roche, J. F. The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. **Anim. Reprod. Sci.**, v.96, p.282–296, 2006.

Santos, R.M.; Vasconcelos J.L.M.; Perez G.C.; Maciel A.B.B.; Sá Filho O.G. Serum progesterone concentrations in Nellore x Angus heifers treated with 1.38g or 1.9g CIDR devices. **Journal of Animal Science**. v.82, p. 370, 2004.

Sartori, R. Manejo reprodutivo da fêmea leiteira. **Reprod. Anim.**, v. 31, 153-159, 2007.

Stevenson, J. S. Breeding Strategies to Optimize Reproductive Efficiency in Dairy Herds. **Veterinary Clinics Food Animals**, v.21, p.349-65, 2005.

Thomas, J. S. Overview of plasma proteins. In: Feldman B. F., Zinkl, J. G., Jain N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 891-898, 2010.

Trevisi, E.; Lombardelli R.; De Matteis, L., Ferrari, A., Bertoni, G. Proinflammatory cytokines and acute phase response profiles in periparturient dairy cows. Ital. **J. Anim. Sci**, v.10, p.105, 2011.

Walsh, S. W., Williams, E.J. & Evans, A.C.O. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v.123, p.127-138, 2011.

Wallace, R.J. Rumen microbiology, biotechnology, and ruminant nutrition: progress and problems. **Journal of Animal Science**, v.72, p.2992-3003, 1994.

Wathes, D. C.; Cheng, Z.; Bourne N.; Taylor, V. J.; Coffey, M. P.; Brotherstone, S. Differences between primiparous and multiparous dairy cows in the interrelationships between metabolic traits, milk yield and body condition score in the periparturient period. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 33, p. 203-225, 2007.

Wittner, F. Diagnóstico dos desequilíbrios metabólicos de energia em rebanhos bovinos. In: González, F.H.D.; Barcellos, J.O.; Ospina, H. et al. (Eds.) **Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, v.1, p.9-22,2000a.

Yuan, K. T.; Liang M. B.; Muckey L. G.; Mendonça D.; Hulbert L. E.; Elrod C. C.; Bradford B. J. Yeast product supplementation modulated feeding behavior and metabolism in transition dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.98, p.532-540,2015.