

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia



Dissertação

**Proteínas de fase aguda e suas relações com o desempenho reprodutivo
e produtivo de vacas leiteiras pós-parto**

ANA RITA TAVARES KRAUSE

Pelotas, 2013

Ana Rita Tavares Krause

Produção Animal: Proteínas de fase aguda e suas relações com o desempenho reprodutivo e produtivo de vacas leiteiras pós-parto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Área do conhecimento: Produção animal: ênfase em reprodução de bovinos).

Orientador: Dr. Luiz Francisco Machado Pfeifer

Co-orientadores: Dr. Cassio Cassal Brauner

Dr. Marcio Nunes Corrêa

Dr. Eduardo Schmitt

Dr. Francisco Augusto Burkert Del Pino

Pelotas, 2013

Dados Internacionais de Publicação (CIP)

K91p

Krause, Ana Rita Tavares

Proteínas de fase aguda e suas relações com o desempenho reprodutivo e produtivo de vacas leiteiras pós-parto / Ana Rita Tavares Krause; Luiz Francisco Machado Pfeifer, orientador; Cássio Cassal Brauner, co-orientador. - Pelotas, 2013.

52 f.; il.

Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2013.

1.albumina. 2.paraoxonase . 3.haptoglobina.
4.período de transição. 5.ovulação. 6.vacas leiteiras.
I. Pfeifer, Luiz Francisco Machado , orient. II.
Brauner, Cássio Cassal , co-orient. III. Título.

CDD: 636.0824

Catálogo na Fonte: Marlene Cravo Castillo CRB:10/744
Universidade Federal de Pelotas

Banca examinadora:

Mara Iolanda Batistella Rubin, Dra., Universidade Federal de Santa Maria

Nelson Jose Laurino Dionello, Dr., Universidade Federal de Pelotas

Rafael Gianella Mondadori, Dr., Universidade Federal de Pelotas

Augusto Schneider, Dr., Universidade Federal de Pelotas (Suplente)

Luiz Francisco Machado Pfeifer, Dr., EMBRAPA Rondônia (Orientador)

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus... pela vida e por todas as oportunidades presentes nela, e por sempre me mostrar o caminho.

Aos meus pais, Luiz Felipe e Marlene, pela confiança, amor e carinho depositados em mim durante estes 2 anos do mestrado e em toda minha vida.

Ao meu irmão Luiz Gustavo, meu exemplo de vida e eterna inspiração e meu irmão Luis Frederico, pelo apoio e amizade, sempre à disposição.

A toda minha família, que de uma forma ou outra, colaborou na execução deste projeto de vida, e que sempre foi e será à base de tudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFPel, pela oportunidade de realizar o mestrado e a CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Dr. Luiz Francisco Pfeifer, pelo exemplo de profissional, pessoa e mestre que foi nesta jornada, apesar do pouco tempo de convivência.

Ao meu co-orientador, Dr. Cassio Brauner, por ter me apoiado sem medir esforços nestes 2 anos, e também pela amizade e companheirismo.

Ao Professor Dr. Marcio Corrêa, por ter acreditado em mim desde o princípio, pelo apoio, amizade e incentivo, desde a minha chegada.

Aos meus amigos e colegas de trabalho do NUPEEC, pela ajuda na execução do projeto, especialmente a Marina Weschenfelder e Paula Montagner, pela amizade, ajuda, incentivo e paciência e ao colega Márcio Lima, por toda colaboração.

Ao Dr. Augusto Schneider, pela atenção, ensinamentos e dedicação em tudo que lhe era solicitado. Ao Dr. Eduardo Schmitt, por todo auxílio e confiança.

A Granja 4 Irmãos, por permitir a realização do experimento com seus animais, especialmente ao gerente da Pecuária Leiteira, Eduardo Xavier, por proporcionar a realização do experimento. Aos funcionários Suelen, João Manuel e Zé, por estarem sempre nos auxiliando no que fosse preciso, bem como a todos que trabalham na leitaria.

As minhas amigas do peito, Izabel Py Crespo, Bianca Siedler e Nathalia Wicpolt, por estarem sempre por perto, e serem meu braço direito sempre que preciso.

*Dedico este trabalho a memória do meu irmão
e melhor amigo Luiz Gustavo.*

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

Chico Xavier

Resumo

KRAUSE, Ana Rita Tavares. **Proteínas de fase aguda e suas relações com o desempenho reprodutivo e produtivo de vacas leiteiras pós-parto**. 2013. 52 f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O período de transição de vacas leiteiras, caracterizado pelo balanço energético negativo (BEN), em que a demanda por nutrientes é maior do que a capacidade de ingestão da vaca, tem sido negativamente correlacionado com a retomada da atividade ovariana pós-parto, bem como condição de saúde da vaca, devido ao estado inflamatório que o BEN produz. Proteínas de fase aguda são marcadores inespecíficos da inflamação e têm sido utilizadas para avaliar o estado inflamatório e a chance de ocorrência de doenças, pois são produzidas na resposta inflamatória sistêmica. O objetivo deste estudo foi avaliar se o momento da ovulação pós-parto está relacionado com a secreção de proteínas de fase aguda, indicadores de lipomobilização e percentagem de células polimorfonucleadas (PMN) na citologia endometrial. Vacas múltiparas da raça Holandês (n = 20), foram selecionadas pelo número de lactações (≥ 3), produção de leite na última lactação (7891 ± 1184 Kg/305 dias) e histórico negativo de enfermidades no último ano produtivo. Amostras de sangue foram coletadas semanalmente do dia -21 relativo ao parto até os 30 dias pós-parto, e também dia do parto e dias 3, 6 e 9 pós-parto, para avaliação da concentração das proteínas de fase aguda: haptoglobina, albumina e paraoxonase, dos metabólitos glicose e ácidos graxos não esterificados (AGNE). Para avaliação do retorno a ciclicidade, amostras de sangue foram coletadas semanalmente do dia 16 ao dia 44 pós-parto para avaliação das concentrações séricas de progesterona. Exames ginecológicos e vaginoscopia foram realizados nos dias 18 ± 2 , 25 ± 3 e 33 ± 2 pós-parto, para avaliação e caracterização de secreção uterina. Citologia endometrial foi realizada aos 37 ± 2 dias pós-parto, para avaliar a saúde uterina, através de lavado uterino de baixo volume. As vacas foram divididas de acordo com o retorno da atividade ovariana pós-parto até os 44 ± 2 dias em Vacas Ovuladas (Grupo VO = 12) e Vacas Anovuladas (Grupo VA = 8). Vacas do grupo VA tiveram menores concentrações de albumina em todo o período pré (P = 0,03) e pós-parto (P = 0,01), maiores concentrações séricas de haptoglobina no pré-parto (P = 0,04) e tenderam a ter menores concentrações de paraoxonase no pós-parto do que o grupo VO (P = 0,09). Não foram observadas diferenças nas concentrações de glicose, AGNE e insulina (P > 0,05) entre os grupos. Vacas do grupo VO tiveram menor contagem de células PMN na citologia endometrial do que vacas que não ovularam (26,3% vs 53,4% PMN; P = 0,05). Aos 25 ± 3 dias pós-parto, apenas 1 vaca do grupo VO apresentou secreção uterina alterada na vaginoscopia, enquanto que 3 vacas do grupo VA apresentaram secreção alterada (P = 0,07). Em conclusão, vacas que retornam mais cedo a atividade ovariana pós-parto apresentam resposta inflamatória sistêmica menos acentuada, não são influenciadas por lipomobilização e tem melhor saúde uterina.

Palavras chave: albumina, haptoglobina, ovulação, paraoxonase, período de transição, vacas leiteiras.

Abstract

KRAUSE, Ana Rita Tavares. **Acute phase proteins and their relationships with the reproductive and productive performance of dairy cows postpartum.** 2013. 52 f. Dissertation (Master). Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The transition period in dairy cows, characterized by negative energy balance (NEB), where the nutrient demand is greater than the cow intake capacity, has been negatively correlated with the resumption of ovarian activity during postpartum, as well as the cow health, due the inflammatory state generated by the NEB state. Acute phase proteins are nonspecific inflammatory markers and have been used to assess the inflammatory state and the risk of disease occurrence, as they are produced in response to systemic inflammatory. The aim of this study was to evaluate if the postpartum ovulation moment is related with the acute phase proteins release, indicators of lipomobilization and polymorphonuclear (PMN) cell percentage in the endometrial cytology. Holstein multiparous cows ($n = 20$), were selected by the number of lactations (≥ 3), milk yield in the last lactation ($7891 \pm 1184/\text{Kg}/305$ days) and negative history of illness in the last year of production. Blood samples were collected weekly from day -21 relative to calving to 30 days postpartum, and also during the calving day, 3rd, 6th and 9th days postpartum to evaluate the concentration of acute phase proteins: haptoglobin, albumin and paraoxonase, glucose and non-esterified fatty acids (NEFA). To evaluate the cyclicity resumption, blood samples were collected weekly from day 16 to day 44 during the postpartum period to evaluate the concentrations of progesterone. Gynecological and vaginoscopic examinations were performed at the days 18 ± 2 , 25 ± 3 and 33 ± 2 during postpartum to evaluation and characterization of uterine secretion. Endometrial cytology was carried out at 37 ± 2 days postpartum, to assess the uterus health, using uterine low volume flushing. Cows were divided according to the postpartum resumption of ovarian activity until 44 ± 2 days in ovulated cows (OV Group = 12, 60%) and cows that did not ovulated (AV = 8, 40%). The cows of the AV group had lower concentrations of albumin during all the pre-partum ($P = 0.03$) and postpartum period ($P = 0.01$), higher pre-partum concentrations of haptoglobin ($P = 0.04$) and tended to have lower postpartum concentrations of paraoxonase than the OV group ($P = 0.09$). No differences were observed in the concentrations of NEFA and glucose ($P > 0.05$) between groups. Cows of the OV group has lower PMN cells count in endometrial cytology than cows that did not ovulate (26.3% vs 53.4%, PMN; $P = 0.05$). At 25 ± 3 days postpartum, only 1 cow in the OV group showed abnormal uterine secretion in vaginoscopy analysis, while 3 cows in the AV group had abnormal secretion ($P = 0.07$). In conclusion, cows that had earlier postpartum ovarian activity resumption showed a less pronounced systemic inflammatory response, the lipomobilization did not affect and had better uterine health.

Key words: albumin, haptoglobin, ovulation, paraoxonase, transition period, dairy cows.

Sumário

1. Introdução Geral	10
2. Projeto Pesquisa	15
2.2 Objetivos e Metas	19
2.2.1 Objetivo geral	19
2.2.2 Objetivos específicos.....	19
2.6 Aspectos Éticos	24
3. Relatório de Trabalho de Campo	27
3.1. Local.....	27
3.2. Animais, dieta e manejo.....	27
3.3. Coleta de amostras de sangue e análises	28
3.4. Exames pós-parto e citologia uterina	28
4. Artigo.....	30
5. Conclusão geral	49
6. Referências bibliográficas.....	50

1. Introdução Geral

O período de transição de vacas leiteiras, que compreende as três semanas que antecedem o parto e as três primeiras semanas da lactação, é caracterizado pelo comprometimento da saúde, no qual a maioria dos problemas metabólicos e a incidência de doenças de rebanhos leiteiros podem ocorrer (Drackley 1999). O principal desafio metabólico enfrentado pelas vacas é o aumento súbito e acentuado da necessidade de nutrientes, para crescimento final do feto, produção do colostro e leite, em um momento que a ingestão de matéria seca (IMS) e o fornecimento de nutrientes não acompanham essa necessidade, caracterizando o balanço energético negativo (BEN). Adaptações adequadas das rotas metabólicas do fígado para as necessidades de energia, drasticamente aumentadas neste período, são importantes para um período de transição bem sucedido (Drackley et al., 2001).

As semanas que antecedem o parto são marcadas pela redução na IMS ocasionada pelo crescimento acelerado do feto no terço final da gestação e por alterações hormonais características do período, que culminam com perda de peso e escore de condição corporal (ECC). Como consequência, ocorre mobilização de tecido adiposo (triacilglicerol - TAG) e deposição de lipídeos no fígado durante o pós-parto (Drackley et al., 2005). A metabolização de lipídeos no fígado, como fonte de energia para a vaca, pode exacerbar a capacidade do órgão e caracterizar a esteatose hepática, distúrbio comum do período de transição, que ocasiona hipofunção do fígado, que acaba por não conseguir produzir a energia necessária para a vaca, agravando o BEN. Corpos cetônicos (betahidroxibutirato – BHBA, acetoacetato e acetona) são produzidos como fonte alternativa de energia, o que pode em excesso, ser prejudicial para a vaca, ocasionando quadros de cetose clínica ou subclínica e pode ser mensurada pelas concentrações séricas de BHBA.

A concentração sérica de ácidos graxos não esterificados (AGNE) é utilizada como uma medida indireta da mobilização do TAG a partir do tecido adiposo, e em vacas leiteiras, o pico de produção de AGNE se dá nas primeiras semanas da lactação (Mashek et al., 2001). Alguns autores citam que vacas com concentrações elevadas de ácidos graxos não esterificados (AGNE)

já no pré-parto, tem o dobro de risco de incidência de distúrbios após o parto, como mastite, deslocamento de abomaso, metrite, enfermidades do casco e cetose, do que vacas com baixas concentrações. Nas primeiras semanas após o parto esse risco quadriplica (Ospina et al., 2010).

As mudanças fisiológicas que envolvem o período tem sido alvo de estudos nos últimos anos e mostram que vacas em período de transição apresentam um processo inflamatório relacionado com o final da gestação e início da lactação (Sordillo et al., 2009), mesmo na ausência de infecções microbianas e/ou patologias (Bionaz et al., 2007). O estresse deste período, com alterações hormonais, metabólicas e de manejo, compromete as defesas imunológicas da vaca e as consequências deste processo inflamatório podem ser observadas através da resposta de fase aguda, na qual indivíduos mostram fenômenos inflamatórios, sem sintomas clínicos, o que pode ser detectado através de proteínas de fase aguda, citocinas pró-inflamatórias, lipomobilização e estresse oxidativo (Bertoni et al., 2006). Uma melhor compreensão das mudanças que ocorrem neste período pode diminuir os problemas de saúde relacionados e aumentar a rentabilidade de vacas leiteiras (Drackley, 1999).

Dados recentes sugerem que o estado inflamatório ocasionado pelo BEN durante o período de transição em vacas leiteiras parece causar prejuízos de ordem inflamatória e metabólica para a vaca, como um atraso no retorno da atividade do fígado, evidenciado pelas baixas concentrações de proteínas de fase aguda negativa como a albumina e paraoxonase, aumento nas concentrações de proteínas de fase aguda positivas como a haptoglobina (Hp) e também pela redução das concentrações séricas de colesterol e glicose no plasma e maiores valores de AGNE e BHBA (Trevisi et al., 2009). Uma clara correlação existe entre a imunossupressão, a ocorrência de doenças, a inflamação e o estresse metabólico, o que exige uma abordagem adequada para desvendar a relação crítica entre a causa e o efeito, bem como o prognóstico do estado de saúde da vaca (Trevisi et al., 2012).

Extremo BEN e acentuada perda de condição corporal, durante o período de transição, também podem coincidir com insucesso no desempenho reprodutivo subsequente (Drackley 1999). Vacas com baixo ECC no parto, ou que tenham perda acentuada do ECC nas primeiras semanas após o parto são

menos propensas a ovular, tem baixa taxa de submissão a primeira inseminação até oito semanas pós-parto e de concepção no primeiro serviço, maior probabilidade de perda de prenhez e aumento do intervalo parto-concepção (Roche et al., 2009). Vacas que estão com elevada condição corporal ao parto também têm comprometimento da fertilidade, pois reduzem mais cedo a IMS antes do parto, e demoram mais para aumentar este consumo após o parto, como consequência tendem a ter uma maior mobilização de gordura e, portanto, um BEN mais grave, redução da função imune e aumento do risco de doenças metabólicas (Roche et al., 2009).

Numerosos estudos tem relatado que o desempenho reprodutivo de vacas leiteiras tem sido comprometido principalmente pela retomada atrasada da atividade ovariana pós-parto (Lamming et al., 1998; Petersson et al., 2006). A deficiência de energia prejudica a responsividade do hipotálamo ao estradiol circulante, resultando em frequência reduzida de liberação de GnRH, com redução de pulsos de LH para seleção folicular e posterior ovulação (Butler, 2003). Quando a primeira ovulação pós-parto ocorre após os 35 dias, já tem sido definida como uma retardada atividade ovariana, com prejuízo no desempenho reprodutivo subsequente, incluindo redução na taxa de prenhez e aumento do intervalo parto-concepção (Gautam et al., 2010). Entretanto, ainda não está claro até quando deve ocorrer a primeira ovulação pós-parto para um melhor desempenho reprodutivo.

A intensa seleção de vacas leiteiras para produção de leite, ignorando fatores como a sanidade, também é um fator que vem diminuindo a fertilidade (Butler, 1998). A causa de infertilidade de vacas leiteiras é multifatorial, mas gira em torno do excesso de energia usada para a produção de leite à custa de outros processos fisiológicos, como a reprodução (Walsh et al., 2011). Taxas de concepção de um único serviço para vacas leiteiras no pós-parto diminuíram cerca de 65 % para 38 % ao longo dos últimos 40 anos, ficando clara a evidência de que o aumento da produção de leite está relacionado à redução da fertilidade (Crowe & Williams, 2012). Shrestha et al. (2004) mostraram que dois terços de vacas de alta produção de um mesmo rebanho tinham a retomada da ciclicidade ovariana pós-parto atrasada, com primeira ovulação tardia e prolongamento da fase lútea como as causas mais comuns de função

ovariana anormal. Infecções uterinas, com descarga cervico-vaginal anormal e involução uterina incompleta até os 35 dias pós-parto, BEN e perda acentuada de ECC pós-parto também foram fatores que influenciaram negativamente a retomada da ciclicidade, formação de cistos ovarianos e de corpo lúteo não funcional.

Um distúrbio comum no pós-parto de vacas leiteiras e que também prejudica a fertilidade subsequente e a retomada da atividade ovariana pós-parto é a endometrite subclínica, onde vacas afetadas não exibem sinais da doença, tornando-a de difícil diagnóstico. Uma das técnicas de diagnóstico para a detecção da inflamação uterina subclínica é a citologia, avaliada através da contagem de células polimorfonucleadas (PMN) em amostras de lavado ou escova uterina, sendo associada com pior desempenho reprodutivo quando realizada após os 35 dias pós-parto (Kaufmann et al., 2009). Williams et al. (2007) forneceram evidências de que a presença de patógenos no útero após o parto afeta a atividade ovariana, e que nos primeiros dias da lactação esses patógenos perturbam o crescimento e a função do folículo ovariano e nos animais que ovulam a primeira onda folicular pós-parto, o corpo lúteo formado produz menores concentrações de progesterona. Galvão et al. (2010) encontraram mesma prevalência de endometrite subclínica entre vacas que ovulam até 21 ou até 49 dias pós-parto, porém em vacas que não ovularam até 49 dias pós-parto, a prevalência de endometrite foi maior.

Aproximadamente 35% das vacas podem ser clinicamente afetadas por infecção uterina nos primeiros 21 dias de lactação, e pelo menos 10 a 20% destas, persistem com a infecção de forma subclínica após esse período (McDougall et al., 2007; Sheldon et al., 2009). Marcadores inespecíficos da inflamação, como as proteínas de fase aguda, têm sido associados com doença uterina e fertilidade reduzida (Sheldon et al., 2004). Burke et al. (2010), observaram que vacas com endometrite subclínica pós-parto, tinham concentrações mais elevadas de haptoglobina (Hp) aos 42 dias pós-parto e concentrações de albumina reduzidas durante todo o período de transição, enquanto que Huzzey et al. (2009), encontraram maiores concentrações de Hp em vacas com doença uterina nas primeiras semanas pós-parto, diagnosticadas pela presença de secreção uterina anormal. Endometrite

subclínica, diagnosticada pela elevada contagem de células PMN, além de estar associada com pior desempenho reprodutivo e atraso na retomada de ciclos estrais normais, contribui para maior taxa de perdas embrionárias devido à inflamação do endométrio (McDougall et al., 2007). Inflamação do endométrio no pós-parto pode comprometer a capacidade uterina de produção de prostaglandina suficiente para causar luteólise (Olson et al., 1984), como resultado, o útero está constantemente sob influência da progesterona, o que favorece ainda mais o crescimento bacteriano (Shrestha et al., 2004).

A primeira ovulação após o parto é geralmente observada dentro de três semanas pós-parto em cerca de 50% das vacas saudáveis (Kawashima et al., 2007), e é aceito que a rápida retomada da função ovariana está relacionada a fertilidade elevada (Staples et al., 1990). No entanto, em quase 50% das vacas, os folículos dominantes não são capazes de ovular e se tornam atrésicos ou císticos (Kawashima et al., 2007). Na maioria das vacas, o tempo médio para primeira ovulação pós-parto é ao redor dos 30 dias (Wiltbank et al., 2006). Vacas criadas á pasto, em média, precisam de 4,2 ondas de crescimento folicular antes da primeira ovulação, sendo este atraso geralmente atribuído ao período de BEN no início da lactação. Concentrações elevadas de AGNE e BHBA antes do parto, tem sido relacionadas com a função imunológica reduzida no periparto e doença uterina (Hammon et al., 2006), que são conhecidos por influenciar negativamente a retomada da ovulação pós-parto (Sheldon et al., 2002).

Baseando-se nessas informações, a investigação da retomada da atividade ovariana pós-parto em vacas leiteiras e sua relação com o status inflamatório do periparto, BEN e saúde uterina se faz necessário, sendo este o objetivo explorado nesta dissertação.

2. Projeto Pesquisa

Universidade Federal de Pelotas
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Departamento de Zootecnia
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia

**Avaliação de proteínas de fase aguda e suas relações com
o desempenho reprodutivo e produtivo de vacas leiteiras
pós-parto**

Ana Rita Tavares Krause – Mestranda
Luiz Francisco Machado Pfeifer – Orientador

Projeto aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (Registro nº4551). Cadastro no COCEPE 5.05.04.122.

Pelotas, 2013

2.1 Caracterização do Problema

Doenças uterinas no pós-parto tem atraído considerável atenção na literatura veterinária, como grandes causas de ineficiência reprodutiva em bovinos de leite (Gilbert et al., 2005; Williams et al., 2005). Diversos trabalhos citam a ocorrência de metrites, endometrites (clínicas ou subclínicas) na ordem de 40%.

O período puerperal na vaca deverá evoluir de forma a permitir que a função reprodutiva da fêmea esteja normalizada entre os 40-60 dias após o parto. Assim, a possibilidade de uma fêmea conceber até os 85 dias pós-parto, permitirá atingir o objetivo econômico da exploração com um parto/vaca/ano. Muitos fatores podem contribuir para que este objetivo não seja atingido. Entre eles incluem-se os que dependem do próprio animal e os que derivam unicamente do sistema de exploração. Por vezes, erros cometidos no manejo dos animais podem constituir causa de doença e interferir com a fisiologia reprodutiva (Sheldon et al., 2006).

No puerpério, o aparelho reprodutivo necessita voltar ao seu estado normal, não gravídico, e este processo ocorre tanto macro como microscopicamente, tendo reflexo direto na função do sistema reprodutivo e endócrino do animal. Este processo engloba a involução uterina propriamente dita, a regeneração do endométrio, eliminação da contaminação bacteriana e o reinício da atividade cíclica ovárica fisiológica, tornando o útero competente para estabelecer uma nova gestação (Sheldon et al., 2008).

Em uma involução uterina fisiológica, aos 15 dias pós-parto o útero deve estar totalmente palpável e dos 14 aos 18 dias já não se deve sentir a presença de fluido (Drost et al., 2002). Em animais saudáveis, o diâmetro dos cornos uterinos atinge os 3 – 4 cm aos 25 - 30 dias pós-parto, enquanto que a cérvix deve ter diâmetro menor que 5 cm aos 40 dias (Mortimer et al., 1997). A regeneração epitelial está completa aos 25 dias pós-parto, mas as camadas mais profundas do útero só regeneram totalmente entre 6 – 8 semanas pós-parto (Sheldon et al., 2006; Sheldon et al., 2008).

O sistema reprodutivo comunica-se com o exterior através da vagina e vulva. Porém, no momento do parto as barreiras físicas são ultrapassadas e

ocorre contaminação bacteriana do trato reprodutivo em mais de 90% das vacas (Sheldon et al., 2002; Sheldon et al., 2006). A infecção do útero é diretamente influenciada pelo equilíbrio entre contaminação bacteriana local e resposta do sistema imune durante a prenhez e em torno do parto. Episódios de retenção de placenta e metrite imediatamente após o parto aumentam as chances de ocorrer endometrites ao longo do período voluntário de espera (até aproximadamente 60 dias pós-parto), aumentando o período de dias em aberto por redução na fertilidade das vacas, ocasionando assim prejuízos econômicos ao sistema de produção de leite (Sheldon et al., 2006; Sheldon et al., 2008).

A debilidade imune de vacas no periparto aumenta a prevalência de doenças infecciosas durante este período. As primeiras células a combater o crescimento bacteriano são os neutrófilos, recrutados da corrente sanguínea. As principais classes de imunoglobulinas (IgM, IgA e IgG), seja por difusão passiva ou de produção local, desempenham importante papel na proteção do útero, agindo como opsoninas para aumentar a fagocitose, estimulando a cascata do complemento, ou bloqueando patógenos de aderir às superfícies mucosas. Para que o organismo reconheça a infecção, existem células específicas no endométrio que possuem receptores Toll like (TLR) com capacidade de reconhecer antígenos bacterianos. A ativação destes receptores dispara uma cascata sinalizadora que mobiliza as células imunes e estimula o fígado a produzir proteínas de fase aguda. O período do peri-parto também é caracterizado por um aumento da secreção de prostaglandinas $F_{2\alpha}$, que aumentam as defesas uterinas (Singh et al., 2008). As proteínas de fase aguda (APP's) são sintetizadas na ocorrência de lesões teciduais e tem função protetora junto ao organismo. São proteínas presentes no soro sanguíneo circulante, sintetizadas no fígado constantemente, podendo aumentar ou reduzir sua produção de 60 a 1000 vezes durante infecções. No presente trabalho serão avaliadas as APP's paraoxonase (PON), haptoglobina (Hp), albumina e apolipoproteínas B100 (ApoB100). A Pon, a albumina e a ApoB100 são proteínas de fase aguda negativas, há evidências de que a síntese de PON é afetada por várias condições fisiopatológicas (como doenças graves, LPS, desafios à citocinas pró-inflamatórias), fenômenos estes que ocorrem

com frequência no período de transição e sugerem que a PON desempenha um papel em torno do parto (Bionaz et al., 2007); a redução de albumina no soro é um indicador de alteração da função hepática (Bertoni et al., 2008), e outros autores demonstraram que esta APP's está relacionada com a incidência de doenças uterinas (Burke et al., 2010; Zerbe et al., 2000). A ApoB100 é um componente essencial do núcleo de proteínas de densidade muito baixa (VLDL) e é necessário para estabilizar esta partícula. ApoB100 sérica é reduzida com a aproximação do parto e redução na síntese e secreção são geralmente relacionados com acúmulo excessivo de gordura no fígado e disfunção hepática (Itoh et al., 1997). Gruffat et al. (1997) relataram uma baixa regulação da síntese hepática de ApoB100 no pós-parto de vacas leiteiras. Hp é uma APP's positivas e tem a função primária de se ligar à hemoglobina livre no plasma, impedindo a excreção renal de ferro e prevenindo os efeitos oxidativos de sua permanência no vaso, também possui habilidades imunomodulatórias.

Epidemiologicamente, cerca de 35% das vacas pós-parto podem ser clinicamente infectadas dentro dos primeiros 21 dias pós-parto e cerca de 10 a 20% apresentam endometrite após esse período (Borsberry & Dobson, 1989; McDougall et al., 2007; Sheldon et al., 2009). A prevalência da endometrite diminui com o tempo pós-parto (McDougall et al., 2007; Gautam et al., 2009) pois, a maioria das vacas infectadas recupera-se espontaneamente. Porém, sabe-se que nesses casos a fertilidade torna-se reduzida (McDougall et al., 2007; Pleticha et al., 2009).

2.2 Objetivos e Metas

2.2.1 Objetivo geral

Avaliar a relação entre as proteínas de fase aguda no período de transição de vacas leiteiras e sua relação com distúrbios uterinos, retomada da atividade ovariana e posterior desempenho reprodutivo.

2.2.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar a ocorrência de distúrbios uterinos no pós-parto de vacas leiteiras em sistema semi-extensivo de produção de leite.
2. Caracterizar a ocorrência de endometrite subclínica no pós-parto de vacas leiteiras, após o período de involução uterina.
3. Avaliar a relação das proteínas de fase aguda com o desenvolvimento de doença uterina no pós-parto de vacas leiteiras.
4. Avaliar a relação entre o acúmulo de gordura corporal no período de transição de vacas leiteiras, caracterizando o balanço energético negativo pós-parto e desempenho reprodutivo.
5. Avaliar a relação de marcadores inflamatórios no pós-parto, através de proteínas de fase aguda e perfil de leucócitos na saúde uterina pós-parto de vacas leiteiras.
6. Avaliar o impacto de distúrbios uterinos sobre o desempenho reprodutivo através de parâmetros como retorno à ciclicidade, intervalo parto/concepção (dias em aberto) e número de inseminações por concepção.

2.3 Metodologia e Estratégia de ação

Instalações: O experimento será realizado no setor da Pecuária Leiteira da Granja Quatro Irmãos, localizada no município de Rio Grande/RS, nas coordenadas 32° 16' S, 52° 32' W. Os animais são mantidos em sistema semi-extensivo de criação, sendo mantidos a pasto e recebendo suplementação no cocho após cada ordenha, todos sob mesmas condições de manejo.

Animais e manejo: Serão utilizadas 20 fêmeas multíparas da raça Holandês, com $3,27 \pm 0,12$ lactações e produção média de $24,64 \pm 5,28$ litros/dia e peso médio de 600 kg entre 250 e 350 dias em lactação (DEL). A seleção dos animais se deu através do número de lactações, produção média em 305 dias da lactação anterior e histórico negativo de enfermidades no último ano produtivo. Semanalmente, as vacas serão pesadas em plataforma de pesagem (Eziwweight5 – TRU-TEST®) durante os períodos pré e pós-parto, quando também foram coletados os dados de condição corporal (ECC). O final da lactação prévia ocorrerá em média por volta de 7 meses de gestação, o animal sendo alimentado exclusivamente a pasto, e transferidos para lote de fêmeas pré-parto aos 8 meses de gestação, onde, além de pastagem, receberão também suplementação específica para a esta categoria uma vez ao dia. Após o parto as fêmeas entrarão para os lotes de vacas em lactação, ficando primeiramente no lote de vacas colostro até 8 dias de lactação (DEL). Após passam para o lote de vacas de maior produção.

Coleta de amostras: A partir dos 250 dias de gestação, até o parto, serão realizadas coletas semanais de sangue (18 ml), através de punção do complexo vascular coccígeo, em sistema do tipo *vaccuntainer* e a amostra dividida em 3 frascos: 1 contendo EDTA 10% (5 ml de sangue), 1 inibidor da via glicolítica (Fluoreto de Potássio 12%, 3 ml de sangue), e 1 frasco contendo apenas o sangue (10 ml). Imediatamente, as amostras de sangue e com Fluoreto de Potássio 12% serão centrifugadas a 3000rpm durante 15 minutos e o soro repassado para tubo eppendorf. As amostras provenientes do sangue serão congeladas a -80°C para posteriores análises bioquímicas e as amostras de Fluoreto serão processadas para avaliação dos níveis de glicose sanguínea

em até 72h através de método colorimétrico em espectrofotômetro. As amostras contendo EDTA 10% serão refrigeradas e enviadas para laboratório para hemograma. As vacas ainda serão coletadas no dia do parto e diariamente até o dia 3 pós-parto, ainda dia 6 e 9, após serão coletadas semanalmente até os 60 dias pós-parto. A partir do 15º dia pós-parto, será avaliada a involução uterina e condição ovariana semanalmente durante 3 semanas, através de exames ginecológicos com os seguintes parâmetros: temperatura retal; presença de secreção vaginal externa, vaginoscopia através de especulo vaginal, para avaliar e caracterizar a presença de secreção e coloração da mucosa cervical (Pleticha et al., 2009), palpação retal para avaliar o diâmetro da cérvix, tamanho do útero, tônus uterino e presença de estruturas ovarianas utilizando-se aparelho ultrassonográfico com transdutor linear transretal de frequência 5.5MHz. Além dos exames ginecológicos, será analisada a concentração de progesterona sérica, a partir do 15º dia pós-parto, semanalmente até 60 DPP para determinação do retorno à ciclicidade das vacas, considerando animais com concentração ≥ 1 ng/ml como aqueles que já apresentam um corpo lúteo funcional e, portanto, considerados cíclicos.

Após o terceiro exame, será realizada citologia uterina, através de lavado uterino de baixo volume, técnica descrita por Gilbert et al. (2005). Esta técnica utiliza 20 ml de solução fisiológica, introduzidos no interior do útero através de pipeta de inseminação equina estéril. Após breve massagem uterina (10 segundos), através de uma seringa de 60 ml é puncionado líquido (2 a 6 ml), sendo este após armazenado em tubos de ensaio, refrigerados e processados em citocentrífuga em até 6h após a coleta. Logo após, são confeccionadas lâminas para posterior contagem de células polimorfonucleadas e através desta contagem ser caracterizada a ocorrência de doença uterina (endometrite subclínica). Endometrite subclínica ou citológica foi definida como um aumento na proporção de células polimorfonucleares em amostras de citologia endometrial obtidas através da técnica de lavagem uterina.

2.4 Resultados e Impactos esperados

Com os resultados obtidos neste projeto, serão caracterizadas as ocorrências de distúrbios uterinos bem como a sua influência futura no desempenho reprodutivo de vacas leiterias em sistema semi-extensivo de produção. Da mesma forma será buscado o entendimento da participação de proteínas de fase aguda na ocorrência de doenças uterinas, bem como quando as mesmas começam a influenciar a ocorrência de distúrbios e se estas poderão ser marcadores dos mesmos.

Com a metodologia de diagnóstico através de lavagem uterina de baixo volume, será testada a viabilidade da utilização da mesma como uma ferramenta diagnóstica para profissionais de campo, como também para futuras pesquisas sobre a mesma temática.

2.5 Cronograma, Riscos e Dificuldades

Descrição	2011		2012		2013
	1º semestre	2º semestre	1º semestre	2º semestre	1º semestre
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X
Reuniões	X	X	X	X	
Coleta de dados a campo		X	X		
Análises bioquímicas e hormonais			X	X	
Organização dos dados			X	X	
Análise estatística			X	X	
Análise dos resultados				X	X
Confecção dos artigos				X	X
Submissão dos artigos					X

Riscos e dificuldades: Aspectos ligados a metodologia do trabalho, envolvendo interferências no manejo dos animais de propriedade comercial e execução das análises bioquímicas e hormonais.

2.6 Aspectos Éticos

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas.

2.7 Referências Bibliográficas

- Bertoni, G., E. Trevisi, X. Han, and M. Bionaz. 2008. Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 91, 3300-3310.
- Bionaz, M., E. Trevisi, L. Calamari, F. Librandi, A. Ferrari, and G. Bertoni. 2007. Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. *Journal of Dairy Science* 90, 1740-1750.
- Borsberry, S. & H. Dobson. 1989. Periparturient diseases and their effect on reproductive performance in five dairy herds. *Vet. Rec.* 124, 217-219.
- Burke, C. R., S. Meier, S. McDougall, C. Compton, M. Mitchell, and J. R. Roche. 2010. Relationships between endometritis and metabolic state during the transition period in pasture-grazed dairy cows. *Journal of Dairy Science* 93, 5363-5373.
- Drost, M., P.G. Thomas, B. Seguin, & M.H. Troedsson. 2002. Female reproductive disorders. In B. P. Smith, *Large Animal Internal Medicine*. St. Louis: Mosby. 1292-1332.
- Gautam, G., T. Nakao, M. Yusuf & K. Koike. 2009. Prevalence of endometritis during the postpartum period and its impact on subsequent reproductive performance in two Japanese dairy herds. *Animal Reproduction Science*, 116, 175-187.
- Gilbert R.O., S.T. Shin, C.L. Guard, H. N. Er & M. Frajblat. 2005. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology*, 64, 1879-88.
- Gruffat, D., D. Durand, Y. Chilliard, P. Williams, D. Bauchart, 1997. Hepatic gene expression of apolipoprotein B100 during early lactation in underfed, high producing dairy cows. *Journal of Dairy Science* 80, 657-666.
- Itoh, H., K. Tamura, Y. Motoi, F. Kawawa, 1997. Serum apolipoprotein B-100 concentration in healthy and diseased cattle. *J. Vet. Med. Sci.* 59, 587-591.
- McDougall, S., R. Macaulay & C. Compton. 2007. Association between endometritis diagnosis using a novel intravaginal device and reproductive performance in dairy cattle. *Animal Reproduction Science*, 99, 9-23.

- Mortimer, R. G., P.W. Farin, & R.D. Stevens. 1997. Reproductive examination of the Nonpregnant cow. In **R. S. Youngquist, *Current Therapy in Large Animal Theriogenology***. Philadelphia: W.B. Saunders Co. 268-275.
- Pleticha, S., M. Drillich & W. Heuwieser. 2009. Evaluation of the Metricheck device and the gloved hand for the diagnoses of clinical endometritis in dairy cows. ***Journal of Dairy Science***, 92, 5429-5435.
- Sheldon, I., E. Williams, A. Miller, D. Nash, & S. Herath. 2008. Uterine diseases in cattle after parturition. ***The Veterinary Journal*** 176, 115-121.
- Sheldon, I., D. Noakes, A. Rycroft, D. Pfeiffer, & H. Dobson. 2002. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. ***Reproduction*** 123, 837-845.
- Sheldon, I., G. Lewis, S. LeBlanc, & R. Gilbert. 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. ***Theriogenology*** , 65, 1516-1530.
- Sheldon, I. M., J. Cronin, L. Goetze, G. Donofrio & H.J. Schuberth. 2009. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. ***Biology Reproduction*** 81,1025-1032.
- Singh, J., R. D. Murray, G. Mshelia & Z. Woldehiwet. 2008. The immune status of the bovine uterus during the peripartum period. ***The Veterinary Journal***, 175, 301-309.
- Williams E.J., D.P. Fischer, D.U. Pfeiffer, G.C.W. England , D.E. Noakes & H. Dobson. 2005. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects bacterial infection and the immune response in cattle. ***Theriogenology***, 63, 102-17.
- Zerbe, H., N. Schneider, W. Leibold, T. Wensing, T. A. Kruij, and H. J. Schuberth. 2000. Altered functional and immunophenotypical properties of neutrophilic granulocytes in postpartum cows associated with fatty liver. ***Theriogenology*** 54, 771-786.

3. Relatório de Trabalho de Campo

3.1. Local

O experimento foi realizado nas dependências de uma fazenda particular, produtora de leite tipo B, localizada no município de Rio Grande/RS, Brasil (32° 16' S, 52° 32' O), no período de dezembro de 2011 a junho de 2012. 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), porém, nos últimos anos o Estado do RS tem passado por alterações climáticas, com verões extremamente quentes, e a temperatura local chegando a 35°C ou mais. A temperatura média anual é de 16,5°C e a precipitação média anual é de 1.196 mm, as chuvas são distribuídas ao longo do ano, com maior frequência durante o inverno.

3.2. Animais, dieta e manejo

Vacas multíparas da raça Holandês (n = 40) de um rebanho de cerca de 900 vacas em lactação, foram selecionadas pelo número de lactações (≥ 3 lactações), produção média em 305 dias na lactação anterior ($\geq 7891 \pm 1184$ kg/305 dias) e histórico negativo de enfermidades no último ano produtivo. As vacas selecionadas foram acompanhadas dos 30 dias anteriores a data prevista do parto até os 60 dias pós-parto, sendo inicialmente selecionadas 40 vacas, onde ao final do experimento foram utilizados apenas os dados de 20 vacas, que se mantiveram saudáveis durante o período experimental, ausentes de doença clínica, dificuldade de parto e retenção de placenta. Os animais foram mantidos em sistema semi-extensivo, ficando á pasto e recebendo suplementação com dieta aniônica comercial no pré-parto e com volumoso e concentrado após cada ordenha durante a fase da lactação. Eram realizadas duas ordenhas diárias, com intervalo de 12 horas. Após o parto, as vacas eram transferidas para os lotes de vacas em lactação, onde permaneciam no lote de vacas colostro até pelo menos 14 ordenhas, sendo transferidas após este período para o lote de vacas multíparas em até 150 dias de lactação (DEL).

Semanalmente durante o período experimental os animais foram conduzidos até plataforma de pesagem (TRU-TEST[®], Farma Tech SA), momento em que também foi registrado o escore de condição corporal (ECC), que foi avaliado por três técnicos em uma escala de 1 a 5, sendo 1 uma vaca muito magra e 5 uma vaca obesa (Wildman et al., 1982) sendo utilizada a média dessas avaliações.

3.3. Coleta de amostras de sangue e análises

Para a coleta das amostras de sangue, os animais foram conduzidos até brete de contenção nas primeiras horas da manhã, sendo coletado sangue do complexo coccígeo, através de sistema *vacutainer*. Foram coletados cerca de 15 mL de sangue de cada animal, que foram centrifugados 30 minutos após a coleta a 3000 rpm durante 15 minutos e o soro proveniente armazenado a -20°C. As análises bioquímicas e hormonais foram realizadas no laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de Pelotas, através de espectrofotometria cinética e colorimétrica e leitura de placa, com exceção da análise de progesterona, que foi realizada através de radioimunoensaio em laboratório na cidade de São Paulo/SP.

3.4. Exames pós-parto e citologia uterina

A partir do 15º dia pós-parto, as vacas foram avaliadas semanalmente através de exame ginecológico por palpação retal, ultrassonografia e vaginoscopia. Após o terceiro exame, foi realizada citologia endometrial, através da técnica de lavagem uterina de baixo volume (Gilbert et al., 2005), onde são introduzidos 20 mL de solução fisiológica no interior do útero, massageado por 10 segundos e o líquido recuperado é processado em citocentrífuga. A lâmina é corada e realizada a leitura através da contagem de 200 células polimorfonucleadas (PMN) e epiteliais. Para a avaliação da saúde uterina, é importante a proporção de células PMN em cada amostra.

3.5. Manejo reprodutivo

As vacas foram observadas quanto a manifestação de cio duas vezes ao dia (07:00 e 16:00 h) por cerca de 1 hora, a partir dos 45 dias em lactação. Vacas detectadas em cio foram inseminadas 12 horas após. As vacas que não apresentaram cio até 60 dias pós-parto foram submetidas a um protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). O protocolo consistia na inserção de um dispositivo intravaginal liberador de progesterona (CIDR®; Pfizer Saúde Animal, Brasil) no Dia 0 do protocolo, concomitantemente com a aplicação i.m. de 25 µg de lecorelina (GnRH; Gestran Plus®, Tecnopec, Brasil). No Dia 7 foi realizada a remoção do CIDR, seguido da injeção i.m. de 25 mg de um análogo da prostaglandina F₂α (PG; Lutalyse®, Pfizer Saúde Animal, Brasil). Já no dia 8, foi realizada uma aplicação i.m. de 1 mg de cipionato de estradiol (CE; ECP®, Pfizer Saúde Animal, Brasil) e 48 horas depois realizada a inseminação dos animais que não foram observados em estro. Animais observados em estro entre os dias 7 e 9 do protocolo eram inseminados 12 horas após a detecção. O diagnóstico de gestação (DG) foi feito aos 32±3 dias pós-IA através de ultrassonografia transretal e confirmação da gestação 30 dias após o primeiro DG (62±5). Animais não prenhes nos DG de 30 e 60 dias eram resincronizados.

4. Artigo

Preparado para ser submetido na revista *Animal Reproduction Science*

1 Retomada da atividade ovariana pós-parto, saúde uterina e
2 proteínas de fase aguda durante o período de transição em vacas
3 leiteiras

4
5 Ana Rita T. Krause,^{1,4}; Paula Montagner^{1,4}; Marina M. Weschenfelder^{1,4}; Elizabeth
6 Schwegler^{1,4}; Márcio E. Lima^{1,4}; Eduardo G.Xavier²; Cassio C. Brauner^{1,4}; Augusto
7 Schneider^{1,4}; Eduardo Schmitt^{3,4}; Francisco A.B. Del Pino^{1,4}; Charles F. Martins^{1,4};
8 Viviane R. Rabassa^{1,4}; Marcio N. Corrêa^{1,4}; Luiz F. M. Pfeifer^{3,4}

9 ¹Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil;

10 ²Granjas 4 Irmãos S.A.

11 ³Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA, Porto Velho, RO, Brasil;

12 ⁴Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC), Universidade Federal de Pelotas,
13 Pelotas, RS, Brasil.

14

15 **Resumo**

16 O restabelecimento da atividade ovariana e um ambiente uterino saudável pós-parto está
17 associado a severidade do balanço energético negativo (BEN) e da secreção de mediadores
18 inflamatórios durante o período de transição. O objetivo deste estudo foi avaliar se o momento
19 da ovulação pós-parto está relacionado com a porcentagem de células polimorfonucleadas
20 (PMN) na citologia endometrial, indicador de mobilização lipídica e a secreção de proteínas de
21 fase aguda. Foram utilizadas vacas multíparas da raça Holandês (n = 20) criadas em um sistema
22 semi-extensivo de produção. Amostras de sangue foram coletadas do Dia -21 ao Dia 44 pós-
23 parto (Dia 0 = parto) para avaliação da concentração sérica de glicose, ácidos graxos não
24 esterificados (AGNE), haptoglobina, albumina, paraoxonase e progesterona. Citologia

25 endometrial foi realizada aos 37 ± 2 dias pós-parto, para avaliação da quantidade de células
26 PMN. As vacas foram distribuídas de acordo com o retorno da atividade ovariana pós-parto em;
27 1) Vacas Ovuladas (Grupo VO = 12) e; 2) Vacas Anovuladas (Grupo VA = 8). Vacas que
28 retornaram a atividade ovariana tiveram menor contagem de células PMN na citologia
29 endometrial do que vacas que não ovularam (26,3% vs 53,4% PMN; $P = 0,05$). Vacas do grupo
30 VA tiveram menores concentrações séricas de albumina no pré- ($P = 0,03$) e pós-parto ($P =$
31 $0,01$), maiores concentrações de haptoglobina no pré-parto ($P = 0,04$) e tenderam a ter menores
32 concentrações de paraoxonase no pós-parto ($P = 0,09$). Em conclusão, vacas que ovulam
33 durante o período voluntário de espera possuem menor contagem de células PMN endometriais
34 e status inflamatório menos acentuado do que vacas que não ovulam.

35 Palavras chave: vacas de leite, haptoglobina, paraoxonase, albumina, útero, ovário.

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52 **Introdução**

53 O período de transição de vacas leiteiras, que compreende as 3 semanas pré- e 3
54 semanas pós-parto, é um momento de extremo desafio metabólico e aumento do risco de
55 incidência de doenças (Drackley et al., 1999). Vacas selecionadas para alta produção de leite
56 sofrem ainda mais os efeitos negativos do período de transição, pois seu elevado mérito
57 genético promove intenso direcionamento de nutrientes para produção de leite, em detrimento
58 de outros processos fisiológicos, como a reprodução (Walsh et al., 2011).

59 A homeostasia e a saúde da vaca leiteira durante o período de transição pode determinar
60 o sucesso reprodutivo logo após o período voluntário de espera (PVE). Para que vacas leiteiras
61 apresentem uma adequada performance reprodutiva é necessário que, durante este período
62 crítico, a fêmea ovule um ovócito competente e forneça ambiente uterino adequado para a
63 fertilização e desenvolvimento embrionário e fetal (Pursley et al., 2011). Vacas leiteiras que
64 retomam a atividade ovariana rapidamente após o parto tem mais chances de conceber mais
65 rapidamente no pós-parto. A dificuldade de se atingir bons índices reprodutivos logo após o
66 PVE pode começar a estabelecer-se mesmo antes do parto, com a ocorrência de adaptações
67 fisiológicas que podem ser prejudiciais a função ovariana.

68 Além dos eventos metabólicos que podem afetar a performance reprodutiva no PVE, a
69 contaminação do útero pode também contribuir para que falhas na concepção ocorram. Cerca de
70 80 a 100 % dos animais apresentam bactérias no lúmen uterino nas primeiras semanas pós-parto
71 (Sheldon et al., 2006). Bactérias patogênicas estão associadas com inflamação do endométrio e
72 secreção vaginal purulenta (Sheldon et al., 2009), o que aumenta consideravelmente a
73 quantidade de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) no endométrio. A maioria das vacas
74 consegue se recuperar de forma natural, entretanto, pelo menos 20 % persistem com a infecção
75 após 3 semanas pós-parto desenvolvendo endometrite. Vacas com endometrite apresentam
76 maior número de dias em aberto e redução de concepção na primeira inseminação (Fourichon et
77 al., 2000).

78 A baixa performance reprodutiva pós-parto pode também estar ligada a alta liberação de
79 mediadores inflamatórios secretados durante o período de transição, as chamadas proteínas de
80 fase aguda (PFA) (Wira and Fahey, 2004), um mecanismo natural de defesa (Hirvonen et al.,
81 1999). Proteínas plasmáticas sintetizadas no fígado têm suas concentrações reduzidas quando o
82 fígado é acionado para dar suporte ao sistema imune durante a resposta inflamatória (Fleck,
83 1989), o que acontece com as concentrações de PON e albumina, que são proteínas de fase
84 aguda negativa. Já o contrário acontece com a Hp, que em processo inflamatório estabelecido
85 tem aumento na sua concentração, sendo portanto, uma proteína de fase aguda positiva. Duas
86 importantes PFA em vacas de leite são a haptoglobina (Hp) e a paraoxonase (PON) (Bionaz et
87 al., 2007). Vários estudos têm registrado a associação do aumento das concentrações de Hp em
88 infecções uterinas pós-parto (Skinner et al., 1991; Smith et al., 1998; Regassa and Noakes,
89 1999; Sheldon et al., 2001), uma vez que a Hp é uma das PFA mais reativas em bovinos
90 (Eckersall and Bell, 2010). Em contraste, concentrações reduzidas de PON e albumina também
91 têm sido associadas com infecções uterinas, pois processos inflamatórios típicos do período de
92 transição podem levar a uma drástica redução da secreção dessas proteínas pelo fígado (Turk et
93 al., 2004; 2005; Burke et al., 2010).

94 Baseado nestas considerações, hipotetizamos que vacas que ovulam durante o PVE tem
95 menor estresse nutricional, alterações na secreção de proteínas de fase aguda e menor
96 contaminação uterina. O objetivo deste estudo foi avaliar se o momento da ovulação pós-parto
97 está relacionado com a: 1) percentagem de células PMN endometriais; 2) mobilização lipídica e;
98 3) secreção de proteínas de fase aguda no período de transição de vacas leiteiras.

99

100 **Materiais e Métodos**

101 **Vacas e desenho experimental**

102 O experimento foi conduzido entre dezembro de 2011 e junho de 2012 em uma
103 propriedade localizada no município de Rio Grande/RS - Brasil (32° 16' S, 52° 32' O). Todos

104 os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da
105 Universidade Federal de Pelotas, sob o número de registro 4551.

106 Inicialmente, 40 vacas leiteiras multíparas (≥ 3 lactações), com escore de condição
107 coporal (ECC) de $3,1 \pm 0,4$ e peso vivo (PV) de $629,77 \pm 42,71$ Kg, da raça Holandês participaram
108 deste estudo. No entanto, 20 vacas foram diagnosticadas com um ou mais distúrbios periparto,
109 incluindo distocia, retenção de placenta, mastite, laminite e hipocalcemia e foram excluídas do
110 experimento. As vacas eram mantidas em sistema semi-extensivo, à base de pastagem e
111 suplementação de concentrado após cada ordenha. A ordenha era realizada duas vezes ao dia,
112 com intervalo de 12 horas. Os animais foram selecionados pelo número de lactações, produção
113 média em 305 dias na lactação anterior ($\geq 7891 \pm 1184$ kg/305 dias) e histórico negativo de
114 enfermidades no último ano produtivo.

115 As vacas foram divididas em dois grupos experimentais de acordo com retorno da
116 atividade luteal no período pós-parto. As fêmeas foram divididas em: 1) Grupo Vacas Ovuladas
117 (VO), vacas que tiveram concentrações de progesterona (> 1 ng/mL) em pelo menos duas
118 coletas de sangue consecutivas entre 16 e 44 dias pós-parto e; 2) Vacas Anovuladas (VA), que
119 não tiveram aumento nas concentrações de progesterona (< 1 ng/mL) até o Dia 44 pós-parto
120 (Stevenson & Britt, 1979).

121 **Coletas de sangue e análises bioquímicas e hormonais**

122 As coletas de sangue para as análises bioquímicas foram realizadas nos dias -21, -14, -7,
123 -3, ao parto (Dia 0), e nos dias 3, 6, 9, 16, 23 e 30. Para avaliação do retorno à ciclicidade foi
124 realizada a mensuração da concentração sérica de progesterona (P4) nos dias 16, 23, 30, 37 e 44
125 pós-parto. O sangue foi coletado por venopunção coccígea utilizando sistema *vacutainer*. As
126 amostras de sangue utilizadas para as análises bioquímicas foram coletadas em tubos contendo
127 ativador de coágulo (16x100mm, 10 ml, Vacuplast®/Shandong/China) e fluoreto de sódio
128 (13x75mm, 4 ml, Vacuplast®, Zhejiang/China), centrifugados em até 30 minutos após a coleta
129 a 3000 rpm durante 15 minutos. O soro foi separado e congelado a -80°C para posterior análise.
130 O soro proveniente do tubo com fluoreto foi refrigerado e destinado para análise de

131 concentração de glicose em até 72 horas. As amostras de sangue para análise de progesterona
132 foram centrifugadas (3000 rpm / 15 minutos) logo após a coleta, sendo que o soro foi
133 armazenado a -20°C.

134 As amostras de soro foram descongeladas em temperatura ambiente antes de cada
135 análise. A técnica de espectrofotometria colorimétrica (Biospectro® SP - 220, Curitiba, PR,
136 Brasil) foi utilizada para avaliação sérica da albumina e glicose através de kits comerciais (Lab
137 Test®, Lagoa Santa, MG). Espectrofotometria cinética UV acoplada a sistema de aquecimento
138 PTC-2 Peltier foi utilizada para análise sérica da paraoxonase utilizando kit comercial
139 (Zeptometrix® Corporation, Buffalo, NY, EUA). Através de leitor de placa (Thermo Plate®, TP
140 Reader, São Paulo, SP, Brasil) foram efetuadas avaliações séricas com kits comerciais de ácidos
141 graxos não esterificados (AGNE - Wako NEFA-HR, Wako Chemicals®, EUA), segundo Ballou
142 et al. (2009) e haptoglobina de acordo com Jones & Mould (1984). A concentração sérica de
143 progesterona (P4) foi determinada, utilizando um kit comercial de radioimunoensaio (Coat-A-
144 Count®, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA) como descrito em Burke et al.
145 (2003).

146 **Exames clínicos e citologia uterina**

147 As vacas foram examinadas aos 18±2, 25±3 e 33±2 dias pós-parto por vaginoscopia
148 para avaliar e caracterizar a presença de secreção e coloração da mucosa cervical (Pleticha et al.,
149 2009). Para a técnica de vaginoscopia, a vulva foi limpa com papel toalha e um espécuro vaginal
150 higienizado foi introduzido no interior do canal vaginal e, utilizando uma fonte de luz, o canal
151 vaginal e a cérvix foram inspecionados e registrada a presença de secreção. A descarga vaginal
152 foi classificada em uma escala de 0 a 3 (0 = muco, 1 = presença de estrias de pus, 2 = ≥50%
153 exsudato purulento, 3 = hemorrágica e/ou com exsudato purulento), adaptado de Williams et al.
154 (2005) e Sheldon et al. (2006).

155 Para contagem de células polimorfonucleares (PMN) do útero, citologia uterina foi
156 realizada através de lavado uterino de baixo volume (Gilbert et al., 2005) aos 37±4 dias pós-
157 parto. Foram utilizados 20 mL de solução salina isotônica, introduzidos no interior do útero

158 através de pipeta de inseminação artificial equina estéril por meio de uma seringa acoplada na
159 pipeta. Após breve massagem do útero por palpação retal (10 segundos), o fluido foi recuperado
160 para a mesma seringa, armazenado em tubo de ensaio, refrigerado e processado em
161 citocentrífuga (Citocentrífuga CT 14 TekLab[®]) até 6 horas após a coleta. O volume de fluido
162 recuperado variou de 2 a 6 mL de fluido foram recuperados. Lâminas com o lavado foram
163 confeccionadas e coradas através de kit comercial (Panótico Rápido®, Laborclin, Pinhais, PR).
164 Foi realizada a leitura de 200 células por lâmina, para contagem de células polimorfonucleadas
165 (PMN), mononucleadas e epiteliais em microscópio óptico (aumento de 100 vezes) e efetuar a
166 proporção de células PMN na amostra.

167 **Análise Estatística**

168 Todas as análises estatísticas foram realizadas com o SAS 9.0 (SAS Institute Inc., Cary,
169 NC, USA). Para variáveis de medidas repetidas (e.g. paraoxonase, haptoglobina, albumina,
170 ácidos graxos não esterificados e glicose), análise de variância (ANOVA) utilizando o MIXED
171 procedure, foi usado para avaliar os principais efeitos do grupo, coleta e sua interação,
172 separando as coletas em pré e pós-parto. A proporção de células PMN aos 37±4 dias pós-parto
173 foram analisadas através de análise de variância ONE-WAY ANOVA. Para avaliação da saúde
174 uterina via vaginoscopia, a presença de secreção uterina aos 18±2, 25±3 e 33±2 DPP foi
175 comparada entre os grupos pelo teste do Qui-quadrado e pelo teste de Fisher, quando pertinente.

176 Em todos os testes o nível de significância utilizado foi de $P < 0,05$, valores de P entre
177 0,05 e 0,1 foram aceitos como tendência.

178

179 **Resultados**

180

181 Doze vacas (60%) ovularam e 8 (40%) não ovularam até 44±2 dias pós-parto. Vacas
182 que apresentaram atividade luteal tiveram menor contagem de células PMN (26,3 %) do que
183 vacas que não ovularam (53,4 %; $P = 0,05$). Entre as 8 vacas do Grupo VO e 5 vacas do Grupos
184 VA examinadas ginecologicamente no 25±3 dias pós-parto, apenas uma vaca do Grupo VO

185 apresentou secreção alterada, enquanto que 3 vacas do Grupo VA apresentaram secreção
186 anormal ($P = 0,07$).

187 Vacas Anovuladas tiveram concentrações séricas de albumina menores do que vacas
188 ovuladas, no pré ($P = 0,03$) e no pós-parto ($P = 0,01$) (Figura 1A). Vacas do Grupo VA tiveram
189 aumento ($P = 0,04$) de concentrações séricas de haptoglobina no período pré-parto (Figura 1B),
190 mas não foram observadas diferenças entre os grupos ($P > 0,05$) nas concentrações séricas de
191 paraoxonase. No entanto, vacas do Grupo VA tenderam a ter menor ($P = 0,09$) concentração
192 sérica de paraoxonase (Figura 1C) do que vacas do Grupo VO no período pós-parto (Figura
193 1C). Não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) nas concentrações de AGNE e glicose entre os
194 Grupos (Figura 2).

195

196 **Discussão**

197

198 O objetivo principal deste estudo foi explorar as associações entre a ocorrência de
199 endometrite e perfil metabólico durante o período de transição em relação ao retorno da
200 ciclicidade pós-parto. Os resultados demonstraram que a hipótese foi parcialmente comprovada,
201 pois o retorno da ciclicidade pós-parto foi relacionado à redução da percentagem de neutrófilos
202 PMN no útero, aumento das concentrações séricas de albumina, redução de haptoglobina no
203 pré-parto e aumento de paraoxonase no pós-parto. Entretanto, mobilização lipídica
204 aparentemente não influenciou no momento de retorno a ciclicidade pós-parto.

205 O maior comprometimento da saúde uterina de vacas após o parto, determinado através
206 da percentagem de células PMN no lavado uterino foi associado com atraso na primeira
207 ovulação pós-parto, evidenciando que a persistência da inflamação do endométrio após a
208 involução uterina é prejudicial para o retorno a ciclicidade. A falta de atividade ovariana pós-
209 parto pode prejudicar a eliminação de patógenos do útero e contribuir para a persistência da
210 infecção uterina (Shrestha et al. 2004). Burke et al. (2010) utilizando um limite de 6% para
211 determinar vacas com alta e baixa contagem de células PMN no útero, observaram que vacas

212 com baixas contagens de células PMN, ovularam antes dos 63 dias pós-parto, quando
213 comparadas com vacas com alta contagem de células. A contaminação uterina pode afetar o
214 desenvolvimento folicular pela liberação exacerbada de citocinas pró-inflamatórias pelas células
215 endometriais o que reduz a esteroidogênese das células granulosa (Spicer & Alpizar, 1994). A
216 pior saúde uterina relacionada às vacas do Grupo VA, foi ainda evidenciada pela presença de
217 secreção vaginal alterada detectada no exame de vaginoscopia, entre os dias 22 e 28 pós-parto.
218 Deve-se tomar nota que devido a problemas logísticos de conciliar o manejo da propriedade
219 com as necessidades de nosso estudo, no exame vaginoscópico apenas 13 das 20 vacas foram
220 avaliadas. Além do atraso na primeira ovulação, vacas com aumento de PMN podem apresentar
221 subfertilidade devido ao aumento no intervalo entre ciclos estrais, o que influencia o recomeço
222 da ciclicidade pós-parto (Dobson et al., 2008). Em vacas com contaminação e/ou inflamação
223 uterina o primeiro folículo dominante pós-parto tem um crescimento retardado e produz
224 menores concentrações de estradiol, e quando ovula, forma um corpo lúteo pequeno que produz
225 menores concentrações de progesterona (Sheldon et al., 2002; Williams et al. 2007; 2008). A
226 presença de contaminação bacteriana no útero também pode modificar a capacidade de síntese
227 de prostaglandinas e perturbar os mecanismos de luteólise, interferindo na produção de
228 prostaglandinas, prolongando a fase luteínica e formação de cistos (Williams et al., 2008).

229 Como observado anteriormente (Huzzey et al., 2009; Burke et al., 2010), o presente
230 trabalho detectou a associação entre as proteínas de fase aguda, a saúde uterina e o retorno da
231 atividade ovariana pós-parto. Foram detectadas diferenças nas concentrações séricas de
232 haptoglobina, paraoxonase e albumina entre vacas que ovularam e que não ovularam durante o
233 PVE. Entretanto, surpreendentemente, somente no período pré-parto as concentrações séricas de
234 haptoglobina foram diferente entre os grupos, demonstrando que vacas que apresentam função
235 ovariana comprometida pós-parto, já apresentam certo grau de inflamação no período pré-parto,
236 e conseqüentemente atrasam a ovulação pós-parto. Em um estudo, Huzzey et al. (2009)
237 mostraram que vacas com metrite pós-parto tinham maiores concentrações de Hp do que vacas
238 saudáveis entre o parto e 12º dia pós-parto, sendo que o pico de Hp ocorreu nos dias 3 e 6 pós-

239 parto. Similarmente, no presente estudo o pico de Hp ocorreu no mesmo período. Sendo o parto
240 um evento caracterizado pela alta secreção de proteínas de fase aguda, podemos inferir que
241 devido à alta produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias, não foi possível detectar
242 diferenças entre os grupos no período pós-parto, pois tanto vacas que ovularam quanto as que
243 não ovularam tiveram altas concentrações séricas de Hp. Por outro lado, o marcador de
244 inflamação PON, demonstrou diferenças entre os grupos no período pós-parto. Como a PON é
245 uma proteína que apresenta-se com níveis reduzidos durante a resposta inflamatória em modelos
246 animais (Costa et al., 2005), podemos afirmar que em momentos de alto grau de inflamação,
247 como nos primeiros dias após o parto, a PON pode apresentar-se como melhor marcador para
248 distinguir vacas que terão comprometimento reprodutivo do que a Hp. Entretanto, para provar
249 essa afirmação, mais estudos direcionados a essa questão devem ser conduzidos. Evidências
250 indicam que baixas concentrações de PON no período periparto estão associados ao aumento do
251 risco de alterações uterinas no período pós-parto precoce (Bionaz et al., 2007). A PON está
252 associada com o stress oxidativo, sendo correlacionados negativamente, o que significa que
253 vacas com menores concentrações de PON tem maior estresse oxidativo (Bionaz et al., 2007) e,
254 portanto, maior predisposição a doenças, que quando não se manifestam de forma clínica,
255 aparecem na forma subclínica, como a endometrite. A resposta inflamatória sistêmica de fase
256 aguda e sua associação com as concentrações de Hp, albumina e PON, que ocorre no período
257 periparto, está bem descrita (Turk et al., 2004; Turk et al., 2005; Humblet et al., 2006; Drillich
258 et al., 2007; Bionaz et al., 2007; Burke et al., 2010; Antoncic-Svetina et al., 2011; Bossaert et
259 al., 2012). No presente estudo, as concentrações séricas de albumina foram menores durante
260 todo o período pré- e pós-parto nas vacas anovuladas. Green et al. (2011), encontraram menores
261 concentrações de albumina em vacas com alta contagem de células PMN no útero, utilizando
262 valores de PMN acima de 18% aos 21 dias pós-parto, enquanto Bionaz et al. (2007), registraram
263 menores concentrações de albumina na primeira semana pós-parto de vacas leiteiras anovuladas,
264 aumentando nas semanas subsequentes. No entanto, vacas que tiveram concentrações mais
265 baixas de paraoxonase até os 63 dias pós-parto, as concentrações de albumina se mantiveram

266 mais baixas (Bionaz et al., 2007). No presente estudo a maior queda nas concentrações de
267 albumina ocorreu na segunda e terceira semana pós-parto, enquanto que nas concentrações de
268 PON, ocorreu na primeira e início da segunda semana pós-parto, entre os dias 3 e 9. Estas
269 quedas foram mais evidentes nos grupos de vacas anovuladas, com aumento gradual nas
270 concentrações de albumina a partir da segunda semana pós-parto nas vacas ovuladas. Estes
271 resultados sugerem que a albumina pode representar um marcador interessante para avaliar
272 processos inflamatórios associados aos processos reprodutivos pós-parto. Devido às proteínas
273 de fase aguda serem marcadores inespecíficos da inflamação, a associação destas com
274 inflamação uterina diagnosticada por secreção vaginal ou citologia endometrial se torna de
275 difícil interpretação. Entretanto, na tentativa de evitar qualquer interpretação errada destes
276 resultados, somente foram envolvidas neste estudo vacas que se mantiveram clinicamente
277 saudáveis durante todo o experimento. Devido ao período de transição de vacas leiteiras ser
278 altamente crítico, o estudo destas proteínas surge como uma forma de se avaliar e prever o
279 risco de doenças. Bionaz et al. (2007) observaram que a redução na capacidade do fígado para
280 lidar com o aumento da demanda metabólica próximo ao parto pode ser diagnosticada através
281 de mudanças nas concentrações séricas de PON, onde a medida que aumentam as concentrações
282 de PON, a frequência de inflamação grave diminui sendo a PON correlacionada negativamente
283 com Hp e positivamente com albumina. No entanto, com relação aos índices metabólicos
284 indicadores de BEN e lipomobilização, não foram encontradas diferenças entre os grupos,
285 resultado semelhante ao apresentado em nosso estudo, em que as vacas apresentam condição
286 inflamatória característica do periparto, não sendo influenciadas por lipomobilização.

287 Vários trabalhos tem relacionado o BEN com a primeira ovulação pós-parto (Reist et
288 al., 2000; Wiltbank et al., 2006; Bossaert et al., 2008; Santos et al., 2009; Burke et al., 2010;
289 Giuliadori et al., 2011; Castro et al., 2012). Apesar de as concentrações de AGNE serem
290 fortemente associadas com a duração do intervalo anovulatório pós-parto (Butler, 2003;
291 Wiltbank et al., 2006), no presente estudo, não houve diferença nos níveis de AGNE entre os
292 grupos. Vacas criadas em sistema de pastejo precisam em média de 4,2 ondas foliculares antes

