



UDESC

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – UDESC OESTE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO MINERAL
INJETÁVEL NO SISTEMA IMUNE DE
VACAS LEITEIRAS NO PERÍODO PÓS-
PARTO**

AMANDA CRISTINA WARKEN

CHAPECÓ, 2018

AMANDA CRISTINA WARKEN

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO MINERAL INJETÁVEL NO
SISTEMA IMUNE DE VACAS LEITEIRAS NO PERÍODO
PÓS-PARTO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração Ciência e Produção Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre em Zootecnia**.

Orientador: Leandro Sâmia Lopes
Co-orientador: Aleksandro Schafer Da Silva

**Chapecó, SC, Brasil
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com
auxílio do programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CEO/UDESC

Warcken, Amanda Cristina
EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO MINERAL INJETÁVEL NO
SISTEMA IMUNE DE VACAS LEITEIRAS NO PERÍODO POS-
PARTO / Amanda Cristina Warcken. - Chapecó, 2018.
50 p. |

Orientador: Leandro Sâmia Lopes Co-orientador:
Aleksandro Schafer Da Silva Dissertação
(Mestrado) - Universidade do Estado
de Santa Catarina, Centro de Educação Superior
do Oeste, Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, Chapecó, 2018.

1. Antioxidante. 2. balanço energético negativo.
3. corpos cetônicos. I. Lopes, Leandro Sâmia. II.
Da Silva, Aleksandro Schafer. .III. Universidade
do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação
Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia. IV. Título.

**Universidade do Estado de Santa Catarina
UDESC Oeste
Programa de pós-graduação em Zootecnia**

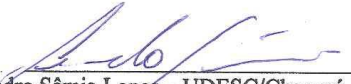
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

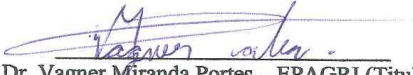
**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO MINERAL INJETÁVEL NO SISTEMA IMUNE DE
VACAS LEITEIRAS NO PERÍODO PÓS-PARTO**

Elaborada por
Amanda Cristina Warken

Como requisito parcial para obtenção de grau de
Mestre em Zootecnia

Comissão Examinadora:


Dr. Leandro Sâmia Lopes – UDESC/Chapecó (Presidente)


Dr. Vagner Miranda Portes – EPAGRI (Titular)


Dra. Karen Doering Brustolin Golin – Unochapecó (Titular)

Chapecó, 22 de fevereiro de 2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por permitir que eu chegasse até aqui.

Agradeço imensamente a minha família por todo apoio em todos os momentos.

Agradeço as minhas amigas Júlia e Juciane pela amizade e apoio em todos os momentos.

Agradeço a UDESC pela oportunidade de estudo e infraestrutura.

Agradeço ao meu Orientador Leandro Sâmia Lopes pela orientação e atenção.

Agradeço ao meu co-orientador Aleksandro Schafer da Silva por toda ajuda e auxílio necessário para que o experimento ocorresse da melhor forma.

Agradeço as graduandas da UDESC Patrícia e Gabriela pela ajuda nas coletas e análises laboratoriais do experimento.

Agradeço ao corpo Discente do programa de pós-graduação da UDESC pelos 2 anos de ensino, dedicação e auxílio na formação dos mestres.

Agradeço aos amigos que fiz aqui.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-graduação em Zootecnia
Universidade do Estado de Santa Catarina

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO MINERAL INJETÁVEL NO SISTEMA IMUNE DE VACAS LEITEIRAS NO PERÍODO PÓS-PARTO

AUTOR: Amanda Cristina Warken

Orientador: Leandro Sâmia Lopes

Chapecó, 22 de fevereiro de 2018

Objetivou-se com este trabalho avaliar o uso da suplementação mineral injetável nos parâmetros metabólicos, resposta imunológica, composição e qualidade do leite de vacas leiteiras no período pós-parto. Foram utilizadas doze vacas holandesas primíparas prenhas, com peso médio de 450 ± 50 kg/PV e com aproximadamente 26 ± 1 meses, divididas em dois grupos: seis animais suplementados com complexo mineral injetável e seis animais no grupo controle. Foi aplicado 10 ml do complexo mineral (magnésio, fósforo, potássio, selênio e cobre) via subcutânea em três momentos: 20 dias pré-parto, no dia do parto e 20 dias pós-parto. O leite foi coletado a cada quinze dias pós-parto até os sessenta dias de lactação (dias 15, 30, 45 e 60) para análise da composição e qualidade. O soro sanguíneo foi coletado nos dias 3, 15, 30, 45 e 60 pós-parto, sendo que nessas amostras foram mensurados os níveis de corpos cetônicos (BHB), proteínas totais, glicose, albumina, globulina, enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), espécie reativa do oxigênio (ERO's) e citocinas ((fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6)). Os animais suplementados com minerais apresentaram menores quantidades de contagem de células somáticas (CCS) ($P < 0,05$) nos dias 30, 45 e 60 do experimento, sem alterar a composição centesimal do leite. Nesse mesmo período, também foi verificado nesses animais menores níveis de BHB quando comparado ao grupo controle ($P < 0,05$). A suplementação também interferiu positivamente no status oxidante/antioxidante, onde as vacas suplementadas tiveram menores níveis de ERO's e maior atividade da enzima SOD ($P < 0,05$). Os níveis de proteínas totais, globulinas e citocinas foram maiores ($P < 0,05$) nas vacas suplementadas com complexo minerais que provavelmente foram consequências da maior atividade do sistema imunológico. Portanto, concluiu-se que a suplementação mineral subcutânea provavelmente melhorou a capacidade do sistema imune e minimizou o estresse oxidativo em vacas leiteiras durante o período de lactação, com efeito benéfico a saúde da glândula mamaria e conseqüentemente redução da CCS.

Palavras-chave: Antioxidante, balanço energético negativo, corpos cetônicos

ABSTRACT

Master's Dissertation

Programa de Pós-graduação em Zootecnia

Universidade do Estado de Santa Catarina

EFFECT OF INJECTABLE MINERAL SUPPLEMENTATION IN THE IMMUNE SYSTEM OF DAIRY COWS IN THE POST-CALVING PERIOD

AUTOR: Amanda Cristina Warken

Orientador: Leandro Sâmia Lopes

Chapecó, 22 February, 2018

The aim of this study was to evaluate the use of injectable mineral supplementation on metabolic parameters, immunological response, composition and milk quality of dairy cows in the postpartum period. Twelve pregnant, primiparous Holstein cows, weighing 450 ± 50 kg/BW and approximately 26 ± 1 months, were separated into two groups: six animals supplemented with injectable mineral complex and six animals in the control group. 10 mL of the mineral complex (magnesium, phosphorus, potassium, selenium, and copper) was applied subcutaneously at three times: 20 days prepartum, at term and 20 days postpartum. The milk was collected every fifteen days postpartum up to sixty days in milk (days 15, 30, 45 and 60) for analysis of composition and quality. The serum was collected on days 3, 15, 30, 45, and 60 postpartum to evaluate the ketone bodies (BHB), total protein, glucose, albumin, globulin, catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), reactive oxygen species (ROS's), and cytokines ((tumor necrosis factor (TNF), interleukin 1 (IL-1) and interleukin 6 (IL-6).) Mineral-supplemented animals had lower somatic cell counts ($P < 0.05$) on days 30, 45 and 60, without changes in the centesimal composition of milk. In the same period, these animals had lower levels of ketone bodies when compared to the control group ($P < 0.05$). Supplementation also interfered positively with oxidant/antioxidant status, in which supplemented cows had lower ROS levels and increased SOD activity ($P < 0.05$). The levels of total proteins, globulins and cytokines were higher ($P < 0.05$) in cows supplemented with mineral complex, probably because of the activity of the immune system. Subcutaneous mineral supplementation probably improved the ability of the immune system and minimized oxidative stress in dairy cows during the lactation period, with effect to in health status of mammary gland and, consequently, to the reduction in SCC.

key words: Antioxidant, negative energy balance, ketone bodies

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	10
REVISÃO DE LITERATURA	10
1 PANORAMA DA BOVINOCULTURA DE LEITE	10
2 DESAFIOS DO PERÍODO DE TRANSIÇÃO	11
3 ESTRESSE OXIDATIVO	13
4 SUPLEMENTAÇÃO MINERAL	15
5 SUPLEMENTAÇÃO MINERAL INJETÁVEL	17
6 OBJETIVOS	19
6.1 OBJETIVO GERAL	19
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
CAPÍTULO II	21
MINERAL SUPPLEMENTATION STIMULATES THE IMMUNE SYSTEM AND ANTIOXIDANT RESPONSES OF DAIRY COWS AND REDUCES SOMATIC CELL COUNTS IN MILK	22
ABSTRACT	23
INTRODUCTION	23
MATERIAL AND METHODS	25
ANIMALS	25
EXPERIMENTAL DESIGN	25
SAMPLING	26
MILK PRODUCTION AND COMPOSITION	26
KETONE BODIES MEASUREMENT	27
BIOCHEMICAL ANALYZES	27
FREE RADICALS AND ANTIOXIDANTS ENZYMES	27
PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES LEVELS	28
STATISTICAL ANALYSIS	28
RESULTS	28
MILK PRODUCTION AND COMPOSITION	28
KETONE BODIES	29
SERUM BIOCHEMISTRY	29
LEVELS OF FREE RADICALS AND ANTIOXIDANTS ENZYMES	29
PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES LEVELS	30
DISCUSSION	30

REFERENCES	34
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	44
REFERÊNCIAS	45
ANEXO 1 Certificado CEUA	49

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1 PANORAMA DA BOVINOCULTURA DE LEITE

A bovinocultura de leite está em constante crescimento em todo mundo sendo considerada uma atividade de interesse econômico com a geração de inúmeros empregos diretos e indiretos. Segundo a EMBRAPA (2017), a produção mundial de leite de vaca em 2016 foi de 659 milhões toneladas. O Estados Unidos é o maior produtor de leite do mundo com uma produção de 96,36 milhões de toneladas em 2016.

O Brasil possui um rebanho de aproximadamente 19,67 milhões de vacas ordenhadas, e ocupou o 4º lugar no ranking mundial com produção de 33,6 milhões de toneladas em 2016 (EMBRAPA, 2017). Este índice evidencia que a produção de leite é baixa em relação ao rebanho existente. Diante disso, o sistema de produção brasileiro precisa ser melhorado para se obter melhores índices de produtividade. No entanto, de acordo com Vilela (2002) seria necessário tornar os animais mais eficientes, através do bom gerenciamento da propriedade, de estratégias nutricionais que atendam a exigência dos rebanhos, da seleção genética e da sanidade dos animais.

A região sul do Brasil tem se destacado na produção de leite. Em 2015 a produção de leite dos três estados desta região foi de aproximadamente 12,32 bilhões de litros, o que a colocou como a maior região produtora de leite do País, ao superar a Região Sudeste (que produziu 11,90 bilhões de litros) (EPAGRI, 2017). Já o Estado de Santa Catarina alcançou o quarto lugar no ranking entre os maiores estados produtores de leite do Brasil. Segundo o IBGE (2016), foi captado 2,44 bilhões de litros pelas indústrias no estado. Do total produzido por Santa Catarina, a região Oeste se destaca com a produção de aproximadamente 75% da produção do Estado.

Segundo a FAO (2015), o consumo de leite e seus derivados cresceu nos últimos anos, em função da melhor condição financeira da população. No ano de 1964 a 1966 o consumo era de 28 quilos per capita no ano, que passou para 45 quilos atualmente e há uma projeção que aumente para 66 quilos até 2030. O aumento no consumo de leite e seus derivados, se justifica pelo papel fundamental na nutrição dos seres humanos, sendo um dos melhores alimentos devido ao alto valor biológico, em função do seu perfil de aminoácidos essenciais. A gordura

além de ser uma fonte de energia, fornece ácidos graxos insaturados como o ácido linoleico conjugado (CLA) e o leite também é fonte de minerais de alta biodisponibilidade para os tecidos corporais como o cálcio, potássio e magnésio (PASSANHA et al., (2011); MUNIZ et al., (2013)).

2 DESAFIOS DO PERÍODO DE TRANSIÇÃO

De acordo com LeBlanc et al., (2006) pelo menos 75% de vacas leiteiras, são afetadas por alguma doença metabólica ou infecciosa durante o período de transição. Porém, existem condições para que esses problemas sejam minimizados, a fim de obter condições favoráveis na produção, reprodução e bem-estar dos animais.

O período de transição (compreendido entre 3 semanas antes do parto e 3 semanas após o parto) é considerado crítico e de importante atenção no manejo nutricional de bovinos leiteiros. São três os principais fatores que podem causar problemas no período de transição: O primeiro seria a adaptação do rúmen a nova dieta de pós-parto, que deverá ser mais energética com intuito de aumentar o crescimento de papilas ruminais para que ocorra maior absorção dos ácidos graxos voláteis (AGVs) (MOTA et al., 2006); o segundo fator seria a manutenção da calcemia sanguínea em função do fornecimento adequado de cálcio para a produção do colostro, com o objetivo de prevenir a hipocalcemia; e o terceiro fator seria a redução do grau de imunossupressão (SIMENEW; WONDU, 2013). Dessa forma, fica evidenciado que no período de transição ocorrem mudanças no sistema metabólico, hormonal, imunológico e alterações que favorecem a incidência de doenças infecciosas e metabólicas (GOFF; HORST, (1997); SORDILLO; RAPHAEL (2013); DRACKLEY; CARDOSO (2014)), já que a vaca sai do período seco e se torna lactante, o que faz com que sua demanda por energia seja aumentada.

Logo após o parto, a vaca apresenta menor capacidade de consumo de matéria seca (CMS) e passa a precisar de grande quantidade de energia para a síntese de leite. Essas condições predispõe o animal a um quadro de balanço energético negativo (ESPOSITO et al., 2014), sendo que os distúrbios metabólicos e as doenças infecciosas que mais acometem as vacas nesse período são: acidose ruminal, cetose, hipocalcemia, retenção de placenta, laminite, deslocamento de abomaso, metrite e mastite ((ESPOSITO et al., (2014); HERDT (2013); SANTOS (2011); SUNDRUM (2015)).

Essas doenças, causam grandes perdas econômicas na cadeia produtiva do leite, devido ao aumento de custos com medicamentos antimicrobianos, vacinas e mão de obra (PRITCHETT et al., 2005). Além disso, ocorre redução na produção de leite, aumento de tempo na recuperação da enfermidade do animal e problemas reprodutivos. No período de transição, a glicose sanguínea é reduzida na tentativa de suprir as exigências energéticas do animal, e concomitantemente a isso inicia-se a mobilização de tecidos corporais (principalmente tecido adiposo) na tentativa de aumentar o aporte energético para o animal. Com isso, a circulação de ácidos graxos não esterificados (AGNE) no sangue é aumentada (SUNDRUM, 2015) e ao chegar no fígado, esses ácidos graxos se acumulam, pois, o órgão não consegue metabolizá-los até seus produtos finais. Em consequência disso, ocorre aumento da quantidade de corpos cetônicos ((beta-hidroxibutirato (BHB), acetoacetato e acetona)) no sangue (BÜHLER et al., 2016), o que pode predispor o animal a uma doença metabólica conhecida como cetose. Para diagnóstico de cetose, existe um limiar de níveis de BHB para saber se o animal está com cetose ou não. Os níveis sanguíneos de BHB de 0,6 mmol/L ou a baixo é indicador de animal sadio, com cetose subclínica níveis entre 0,6 mm/L a 1,18 mm/L e acima de 1,18 mm/L é diagnóstico de cetose clínica. Os AGNE são produzidos pelo organismo na tentativa de equilibrar a demanda de energia necessária para a produção de leite, mas quando em excesso ocorrem os distúrbios metabólicos pela alta produção de radicais livres (TURK et al. 2008).

Shin et al. (2015) avaliaram animais com cetose e animais sadios no pré-parto (4 e 2 semanas) e pós-parto (2, 4, 6 e 8 semanas), além do escore de condição corporal (ECC), e da concentração de metabólitos séricos como os AGNE. Os resultados demonstraram que os animais com cetose e com ECC maior ou igual a 3,5, apresentaram maiores níveis de AGNE circulante até a oitava semana pós-parto e menores níveis de glicose sanguínea. Também foi observado nesses animais uma queda mais acentuada do escore, em relação aos animais com escore baixo. Em consequência disso, os animais com diagnóstico de cetose apresentaram maior quantidade de cistos ovarianos, que são relacionados à ineficiência reprodutiva, principalmente para o estímulo de Hormônio Luteinizante (LH) e ovulação (BUTLER, 2003).

Entretanto, a falta de glicose no sangue reduz a fagocitose dos neutrófilos e a presença do BHB prejudica a capacidade bactericida dessas células de defesa, bem como os AGNE também diminuem a viabilidade destas células de defesa (LITTLE et al., 2016), o que leva a uma menor atividade do sistema imunitário. Moretti et al. (2016) estudaram a concentração de células de defesa no sangue de vacas holandesas no período de transição (7 dias pré-parto, 12h,

48h e 72h após o parto) e a relação com incidência de retenção de placenta. Foi observado menor número de linfócitos antes do parto, baixa contagem de leucócitos e de neutrófilos no parto, diminuição da contagem de monócitos em todos os momentos, nos animais com retenção de placenta, em comparação com o grupo controle. Também houve maior concentração de BHB no sangue tanto no pré-parto como no pós-parto, nos animais que apresentaram retenção de placenta. Dessa forma, foi possível inferir que o BHB possui alguma relação patogênica no desenvolvimento de retenção de placenta.

3 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse causado na vaca durante o período de transição, faz com que o organismo produza compostos químicos conhecidos como espécies reativas do oxigênio (ERO's). Os ERO's são um tipo de radicais livres que são responsáveis pela peroxidação lipídica e que causam danos aos tecidos corporais. Essa alta produção de ERO's é conhecida como estresse oxidativo. O estresse oxidativo é causado pela baixa concentração de glicose na corrente sanguínea no período de pós-parto (ABUELO et al., 2014). A hipoglicemia é uma característica comum que acomete as vacas nesse período, já que praticamente toda glicose é direcionada para a síntese de lactose na glândula mamária (DE KOSTER; OPSOMER, 2013). Entretanto, as células de defesa são sensíveis ao estresse oxidativo pois, na sua membrana contém grande quantidade de ácido graxo poli-insaturado, sendo esses susceptíveis a peroxidação, e que quando estimulados também produzem ERO's (SPEARS; WEISS, 2008).

No entanto, os problemas de saúde ocorrem quando os antioxidantes de defesa são insuficientes e ocorre acúmulo de radicais livres em excesso. Diante disso, macromoléculas como DNA, proteínas e lipídios que fazem parte do metabolismo sejam destruídos (SORDILLO, 2016). O estresse oxidativo está ligado a incidência de mastite (LYKKESFELDT; SVENDSEN, 2007), edema mamário, metrite, retenção de placenta (SORDILLO; AITKEN, 2009) e problemas de casco (ZHAO et al., 2015).

Alterações nos indicadores de estresse oxidativo durante o período de transição são relatados. Em um trabalho realizado por Turk et al. (2013) algumas novilhas apresentaram concentração de BHB no sangue de até 1,0 mmol/L, o que seria um indicativo de cetose subclínica. Os animais também apresentaram redução até a oitava semana pós-parto na concentração de triglicerídeos no sangue, e baixa atividade de PON1 que é um antioxidante

natural do organismo. Esses fatores demonstram que durante o período de transição ocorre forte mobilização lipídica para a geração de energia e produção de leite. Morris et al., (2009) realizaram uma análise da expressão gênica no baço de vacas leiteiras no pós-parto e correlacionaram que balanço energético negativo estava associado com o estresse oxidativo e aumento da apoptose no tecido do baço. Dessa forma, ficou evidente um impacto negativo sobre a função imunológica inata e adaptativa nos animais.

Silanikove et al. (2014) avaliaram a produção e a qualidade do leite de cabras com mastite subclínica, onde se analisou a ação do oxido nítrico como um radical livre e indicador de estresse oxidativo (LYKKESFELDT; SVENDSEN, 2007), bem como proteínas que estão relacionadas com a qualidade do leite e com o processamento do queijo. Ficou demonstrado que os animais infectados com mastite subclínica apresentaram redução na produção de leite diária (1,34 litros para os animais infectados vs 1,63 litros para os animais sadios). Segundo os autores, essa redução na produção de leite foi devido a redução da lactose produzida pelos animais com mastite subclínica (42,1 g/L) em relação aos animais sadios (47,1 g/L). No entanto, nos animais infectados, a ação do oxido nítrico prejudicou a ação das proteínas do leite, através do aumento da atividade de plasmina, pois essa proteína provoca a liberação de peptídeos a partir das micelas de caseína, que, por sua vez, reduzem a secreção de leite e a coagulação de micelas de caseína (LEITER et al., 2011; SILANIKOVE et al., 2012). Em consequência disso, a ação dos peptídeos que são ricos em fosfatos prejudica a disponibilidade de cálcio (Ca^{2+}) no leite, bem como a coagulação do leite, que por sua vez, reduz a qualidade do queijo.

No entanto, Batistel et al. (2016) avaliaram o uso de minerais orgânicos (Zn, Cu, Mn e Co) complexados a aminoácidos durante o período de transição em vacas leiteiras, onde foi avaliado indicadores metabólicos relacionados ao estresse oxidativo. Os autores encontraram que o uso de minerais orgânicos reduziu as concentrações de óxido nítrico (12,3 $\mu\text{mol/L}$ vs 11,2 $\mu\text{mol/L}$), nitrito (6,2 $\mu\text{mol/L}$ vs 5,4 $\mu\text{mol/L}$) e nitrato (7,05 $\mu\text{mol/L}$ vs 5,56 $\mu\text{mol/L}$) no plasma sanguíneo de vacas que receberam minerais orgânicos em relação às vacas que receberam minerais inorgânicos. Os autores também encontraram maiores concentrações de colesterol e albumina, e menores concentração de IL-6 ao longo do tempo nas vacas suplementadas com minerais orgânicos (3,78 mmol/L, 35,9 g/L e 453,4 pg/mL respectivamente) comparado as vacas que receberam minerais inorgânicos (3,44 mmol/L, 34,9 g/L e 548,7 pg/mL respectivamente). Segundo os autores, estes resultados indicam uma redução do estresse oxidativo através do menor grau de inflamação e melhor função hepática.

O mecanismo antioxidante do animal tem capacidade de inativar os ERO's, quando o organismo é ameaçado por algum patógeno invasor ou pelas células imunes. Várias vitaminas e minerais são importantes componentes do sistema de defesa antioxidante e, portanto, qualquer deficiência desses componentes o sistema imunológico fica comprometido (SPEARS; WEISS, (2008); MACHADO et al., (2014)). Sendo assim, no período de transição deve se fornecer a quantidade exigida de MS para os animais nesta fase de produção, mas também atender as exigências de todos os nutrientes via dieta. Portanto, o uso de estratégias de manejo é fundamental para se reduzir o uso de antimicrobianos no tratamento de doenças acometidas por falhas de manejo, minimizar resistência de patógenos pelas drogas e assim, reduzir custos e maximizar a produção.

4 SUPLEMENTAÇÃO MINERAL

Para que as vacas lactantes consigam se recuperar e minimizar os efeitos do estresse causado pelo parto devido ao desequilíbrio metabólico, fisiológico e hormonal (OMUR et al., 2016), o fornecimento de suplementação mineral junto com dieta pode promover uma recuperação mais rápida dos animais, visto que os minerais fazem parte de muitas funções fisiológicas, estruturais, equilíbrio osmótico, bem como no sistema imunitário, metabólico e hormonal.

As deficiências de minerais podem trazer prejuízos a produção, pois em muitas vezes não são vistos já que apresentam sinais subclínicos (MOTTIN et al., 2013). A falta de suplemento mineral e vitaminas no período de transição está associado ao aparecimento de desordens metabólicas como, mastite, metrite e retenção de placenta (ZHAO et al., 2015). Sendo assim, esses elementos são necessários, pois fazem parte de enzimas antioxidantes, células imunes entre outras funções importante para o equilíbrio do sistema imune.

Os minerais são classificados em função da quantidade requerida pelo animal. Existem os macronutrientes minerais: cálcio (Ca), fósforo (P), potássio (K), sódio (Na), cloro (Cl), magnésio (Mg) e enxofre (S), sendo esses requeridos em maior quantidade pelo organismo (maior que 100 ppm) e existem os micronutrientes minerais: ferro (Fe), iodo (I), zinco (Zn), cobre (Cu), selênio (Se), manganês (Mn), cobalto (Co), molibdenio (Mo), cromo (Cr), vanádio (V), flúor (F), sílica (Si), níquel (Ni), arsênio (As) e estanho (Sn), são esses requeridos em menor quantidade pelo organismo (menor que 100 ppm) (PEDREIRA; BERCHIELLI, 2011).

O mineral selênio é componente da enzima glutathiona peroxidase, que atua no sistema antioxidante no processo de remoção dos radicais livres (OVERTON; YASUI, 2014). Dessa forma, tem a função de atuar na integridade da membrana celular e proteção contra danos na molécula de DNA (WINTERGERST et al., 2007).

No trabalho de Wu et al. (2016) a atividade da enzima glutathiona peroxidase (GSH-Px) foi menor (50,19 U/L) nos animais deficientes em selênio comparados aos animais com níveis normais de selênio (60,03 U/L). Os valores de referência nos níveis plasmático de selênio para animais lactantes é 70 µg/L a 100 µg/L (STOWE; HERDT, 1992), sendo que os animais deficientes em selênio apresentaram em média 52,16 µg/L de selênio, enquanto que os animais com níveis normais de selênio apresentaram 80,37 µg/L. Nas interleucinas, mostrou-se que os níveis plasmáticos de IL-2, TNFα e IgG foram menores no grupo deficiente em selênio. Isto sugere que a deficiência desse mineral comprometeu a função imunológica dos animais.

O cobre e o zinco também são minerais que participam de enzimas com ação antioxidante, como a superóxido dismutase (SOD). O cobre exerce função sobre os neutrófilos, monócitos e células T (WINTERGERST et al., 2007). Sharma et al., (2007) avaliaram dois grupos de novilhas búfalas, onde apenas um grupo de animais recebeu suplemento com cobre. Os autores verificaram que os animais suplementados com cobre tiveram maiores níveis de ceruloplamina 30 dias após o tratamento. A ceruloplamina é responsável pela homeostase do ferro, pois converte a forma ferrosa em ferro férrico (BRODERIUS et al., 2010). Por sua vez, o cobre atua na produção dos eritrócitos e sua deficiência causa anemia, já que está ligado ao metabolismo do ferro. Os autores também observaram maiores níveis dos hormônios T3 e T4 nos animais suplementados, já que a deficiência de cobre pode prejudicar a secreção de tirosina e inibir a síntese dos hormônios da tireoide. Outro efeito significativo obtido neste trabalho foi o aumento da atividade fagocítica dos neutrófilos que permaneceu dos 30 dias até os 120 dias (30, 60, 90 e 120 dias) de experimento (0,62 U/10⁷; 0,62 U/10⁷; 0,66 U/10⁷; 0,71 U/10⁷ vs 0,54 U/10⁷; 0,52 U/10⁷; 0,62 U/10⁷ e 0,53 U/10⁷) nos animais suplementados com cobre vs não suplementados respectivamente e conseqüentemente aumento da atividade da enzima SOD no plasma sanguíneo (0,51 U/mg; 0,57 U/mg; 0,69 U/mg e 0,72 U/mg vs 0,35 U/mg; 0,35 U/mg; 0,43 U/mg e 0,44 U/mg) nos animais suplementados com cobre vs não suplementados respectivamente, que está relacionada ao sistema antioxidante. Além disso, a catalase é outra enzima que atua na eliminação dos radicais livres, e essa por sua vez é ativada pelo mineral ferro (SORDILLO, 2016).

5 SUPLEMENTAÇÃO MINERAL INJETÁVEL

Basicamente existem duas formas de suplementação mineral nos sistemas de produção de bovinos de leite. A primeira e mais utilizadas pelos técnicos e produtores é o fornecimento via dieta, através do uso de suplementos minerais prontos. A segunda forma e menos usual, é a suplementação injetável (ABUELO et al., 2014). O fornecimento de minerais via dieta pode acarretar em problemas na absorção e biodisponibilidade devido a interações com outros nutrientes, como fibras e outros minerais antagonistas, ou até mesmo pelo consumo que pode ser diferenciado entre os animais (MACHADO et al., 2013). Diante disso, a suplementação injetável pode ser composta por um único mineral, ou mais minerais, ou ainda combinado com vitaminas (OMUR et al., 2016). Estes minerais são aplicados geralmente pela via subcutânea dos animais e são disponibilizados imediatamente na corrente sanguínea sem sofrer nenhum tipo de interação para sua absorção e biodisponibilidade. Outra vantagem da suplementação mineral injetável é que pode ser fornecida apenas nos animais que necessitam em algum período crítico como no período de transição, sem ter que suplementar todos os animais via dieta (ABUELO et al., 2014).

Teixeira et al., (2014) avaliaram a suplementação mineral injetável com os minerais selênio, cobre, zinco e manganês no desempenho e saúde imunitária de bezerros após o nascimento (com 3 e 30 dias de vida). Os bezerros que receberam os minerais injetáveis apresentaram maior atividade fagocitária dos neutrófilos, bem como maior atividade da enzima glutathione peroxidase (9 mmol/ml vs 7,5 mmol/ml aproximadamente) nos 14 dias de vida. Assim reduziu o estresse oxidativo dos bezerros nas duas primeiras semanas de vida. Também foi observado que os bezerros suplementados reduziram incidência de diarreia (41,7%) em relação aos animais não tratados (49,7%) bem como pneumonia e otite que acometeu (41,6%) dos animais suplementados e (49,1%) dos animais do grupo controle.

Diversos trabalhos na literatura relataram que o uso de minerais injetáveis, reduziram a CCS, a mastite clínica e subclínica, apresentaram menor concentração de corpos cetônicos no sangue, reduziram os índices de retenção de placenta e endometrite, além de melhoria no sistema imune (MACHADO et al., (2013); ESPOSITO et al., (2014); GANDA et al., (2016)).

Por outro lado, outros estudos não encontraram aumento na produção nem melhoria na composição de leite. Nos trabalhos realizados por Machado et al., (2013) e Ganda et al., (2016) foram utilizados suplementos minerais injetáveis que continha selênio, cobre e manganês e em ambos os estudos não houve aumento na produção de leite e nem alteração de sua composição.

Além disso, foi avaliada a suplementação mineral à base de zinco metionina, manganésio metionina, cobre lisina e glucoheptonato de cobalto de vacas primíparas em pastejo e também os autores não encontraram diferença na produção e composição do leite (RAMOS et al., 2012).

Omur et al. (2016) injetaram 10 ml de vitaminas (A, D e E) e 20 ml de minerais (Cu, Mn, Se, Zn) por animais, para avaliar a capacidade antioxidante destes nutrientes durante o período de transição de vacas leiteiras. Foram medidos os níveis de AGNE, BHB, glicose, capacidade oxidante total (TOC) e capacidade antioxidante total (TAC). Estas variáveis foram medidas 3 semanas pré-parto, no dia do parto e 3 semanas pós-parto. Nos animais tratados, os níveis de AGNE foram menores (307,3 mg/L no pré-parto; 310,5 mg/L no dia do parto e 366,6 mg/L no pós-parto), em relação aos animais do grupo controle (408,6 mg/L; no pré-parto, 440,2 mg/L no dia do parto e 484,8 mg/L no pós-parto). O mesmo comportamento aconteceu com os níveis de BHB, sendo menor nos animais tratados (0,66 mmol/L pré-parto; 0,65 mmol/L dia do parto e 0,67 mmol/L no pós-parto) em relação ao grupo controle (0,88 mmol/L no pré-parto; 0,80 mmol/L no parto e 1,08 mmol/L no pós-parto). Também houve efeito significativo para a glicose nos animais tratados (65,5 mg/dL, no pré-parto; 57,7 mg/dL no parto e 54,25 mg/dL no pós-parto) em relação ao grupo controle (58,1 mg/dL no pré-parto; 80,5 mg/dL no dia do parto e 50,7 mg/dL no pós-parto). Os resultados de TOC e TAC também foram significativos, sendo que nos animais tratados a TAC aumentou (1,57 pré-parto; 1,75 no dia do parto e 2,08 pós-parto) durante o período de transição e a TOC reduziu (2,51 pré-parto; 2,26 no dia do parto e 1,99 pós-parto), o que demonstra que os minerais bem como as vitaminas foram capazes de melhorar o sistema antioxidante desses animais, bem como reduzir a peroxidação lipídica com a redução nos níveis de AGNE e BHB.

Machado et al., (2014), avaliaram o fornecimento de minerais na forma injetável (Zn, Mn, Se e Cu), e mediram a atividade da enzima SOD e atividade leucocitária do sangue. Os autores não encontraram diferença para a atividade leucocitária entre os tratamentos, no entanto, houve aumento da atividade da enzima SOD nos animais tratados com o mineral injetável (16,0 U/ml vs 12,7 U/ml) em comparação aos animais do grupo controle, sendo que este aumento permaneceu até os 100 dias de lactação.

Já Soldá et al. (2016), avaliaram o efeito da injeção de um complexo mineral a base de Se, Cu, Mg, P e K, no período de transição de vacas leiteiras. As injeções foram aplicadas no dia 20 pré-parto e no dia do parto e as coletas realizadas nos dias 20 pré-parto, 5 pré-parto, 2 pós-parto e 7 pós-parto. Os autores encontraram efeito significativo no uso dos minerais injetável no sistema imune e antioxidante. Os níveis de radicais livres foram menores nas vacas

suplementadas nos dias 5 pré-parto (500 U UFC/mg de proteína vs 1250 U UFC/mg de proteína), no dia 2 pós-parto (450 U UFC/mg de proteína vs 700 U UFC/mg de proteína) e 7 pós-parto (350 U UFC/mg de proteína vs 700 U UFC/mg de proteína), além de menores concentrações de TBARS no plasma sanguíneo, em comparação aos animais do grupo controle. Segundo os autores, os maiores valores de TBARS encontrados no grupo controle nos dias 5 pré-parto (4,9 Mmol/MDA/ml vs 1,9 Mmol/MDA/ml) e dia 2 pós-parto (3,5 Mmol/MDA/ml vs 1 Mmol/MDA/ml) em relação ao grupo tratado, indicou que os animais passaram por uma peroxidação lipídica mais grave. Além disso, a enzima catalase aumentou sua atividade nos animais que receberam a suplementação mineral injetável em comparação aos animais do grupo controle, no dia 2 pós-parto (6 nmol CAT/mg de proteína vs 3 nmol CAT/mg de proteína). Segundo Barbosa (2010), a catalase é uma enzima responsável pela conversão de peróxido de hidrogênio e superóxido para oxigênio e água, a fim de proteger as membranas celulares contra lesões oxidativas.

Conforme relatado o uso dos minerais injetáveis poderão abrir novas alternativas para minimizar os efeitos causados pelo período de transição em vacas leiteiras. Como a literatura não é unânime, são necessários mais estudos com relação ao uso dos minerais injetáveis. Portanto, objetivamos realizar um estudo para avaliar o uso dos minerais injetáveis nos parâmetros de sistema imune e qualidade do leite de vacas primíparas no pós parto.

6 OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da suplementação mineral injetável na resposta imune de vacas leiteiras durante o período de transição.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Medir produção de leite
- Avaliar qualidade do leite e composição centesimal (CCS, gordura, proteína, lactose)
- Mensurar níveis de corpos cetônicos (BHB)
- Avaliar parâmetros bioquímicos séricos (proteínas totais, glicose, albumina e globulina)

- Analisar atividade das enzimas Catalase e superóxido dismutase
- Analisar espécie reativa de oxigênio (ERO's)
- Mensurar citocinas (fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6))

CAPÍTULO II

Artigo

Os resultados desta dissertação são apresentados na forma de um artigo com sua formatação de acordo com as orientações da revista na qual foi submetido:

Mineral supplementation stimulates the immune system and antioxidant responses of dairy cows and reduces somatic cell counts in milk

Aceito para publicação na revista *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*

Mineral supplementation stimulates the immune system and antioxidant responses of dairy cows and reduces somatic cell counts in milk

Amanda Cristina Warken¹, Leandro Sâmia Lopes¹, Nathieli B. Bottari², Patrícia Glombowsky³,
Gabriela Miotto. Galli³, Vera M. Morsch², Maria Rosa C. Schetinger², Aleksandro Schafer Da
Silva^{1,3}

¹ Graduate Program of Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC),
rua Beloni Trombeta Zanin, bairro Santo Antônio, 89815-630, Chapecó, Brazil.

² Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universidade Federal de Santa Maria,
Santa Maria, Brazil.

³ Department of Animal Science, UDESC, rua Beloni Trombeta Zanin, bairro Santo Antônio,
89815-630, Chapecó, Brazil.

Academy Section: Agrarian Sciences

Corresponding authors: Department of Animal Science, Universidade do Estado de Santa
Catarina, Chapecó, Brazil. leandrosamia@uol.com.br (L.S.Lopes);
dasilva.aleksandro@gmail.com (A.S.Da Silva). Fone: +55 49 20499560.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate whether the use of subcutaneous mineral supplementation would affect metabolic parameters, immunological response, milk quality and composition of dairy cows in the postpartum period. Twelve pregnant primiparous Holstein cows, were divided into two groups: six animals supplemented with the mineral complex (magnesium, phosphorus, potassium, selenium and copper), and six animals used as controls. The mineral complex was applied subcutaneously three times at 20 days prepartum, at partum day and 20 days postpartum. Milk samples were collected every two other week postpartum up to sixty days of lactation to analyze composition and quality. Blood samples were collected on days 3, 15, 30, 45 and 60 postpartum, and the levels of ketone bodies, total proteins, glucose, albumin, and globulin were measured. The catalase and superoxide enzymes, reactive oxygen species, tumor necrosis factor, and interleukins were determined. Animals supplemented with minerals showed lower levels of ketone bodies and somatic cell counts on days 30, 45 and 60 of the experiment, without changes in milk composition compared to the control group. Supplemented cows had lower levels reactive oxygen species and increased superoxide enzymes activity. Total protein, globulin and cytokine levels were higher in cows supplemented with mineral complexes.

Keywords: cattle, ketone bodies, mineral supplementation, somatic cell count

INTRODUCTION

Milk cattle farming is constantly growing and is considered an important activity with economic interest in the world. However, nutritional strategies are necessary to improve animal health and to reduce losses in milk production. The transition period (3 weeks pre-calving to 3 weeks post-calving) is considered a critical period for lactating dairy cows and primary attention should be developed to nutritional management in the post-calving period, since this is

related to low intake of dry matter (DM) and a high energy demand to keep milk production, which may lead to a negative energy balance for the animal (Esposito et al., 2014). The transition period may cause physiological alterations, as the oxidative stress, characterized by high free radical formation in the bloodstream, affecting the normal metabolism (Sordillo, 2016). In the post-calving period, the increase in lipid peroxidation occurs due to a greater mobilization of body fat as a result of the lower intake of dry matter and greater nutritional requirement for milk production (Wathes et al., 2007).

During the transition period there is a normal response to free radical formation in the body through antioxidants enzymes which are regulated by minerals. The minerals play a key role in the immune and reproductive systems and in the growth of dairy cows (Shankar & Prasad, 1998). Selenium, for example, is a mineral with an antioxidant function, capable of reducing the production of free radicals through the activation of the enzyme glutathione peroxidase. Therefore, studies with selenium supplementation demonstrated a reduction in the incidence of mastitis and somatic cell counts (SCC) in cattle (Overton & Yasui, 2014), as well as increased erythrocyte and neutrophil production in the bloodstream (Morgante et al., 1999). Copper is another mineral with an important function in the immune system, acting in several defense cells (neutrophils, monocytes and T cells) and activating the enzyme superoxide dismutase (SOD), an antioxidant enzyme that catalyzes the dismutation of superoxide into oxygen and hydrogen peroxide as a mechanism to reduce free radicals (Wintergerst et al., 2007).

The mineral intake during the transition period is important for cows. In this way, the application of injectable minerals could be an alternative to diet supplementation. Some studies have demonstrated the benefits of injectable minerals in the immune response, reducing β -hydroxybutyrate (BHBA) concentration, increasing SOD enzymatic activity, and promoting the reduction of clinical mastitis and SCC of dairy cows (Machado et al., 2014, Ganda et al., 2016).

In addition, recently our research group found in a previous study that cows supplemented with injectable minerals had stimulation of the immune response and increased activity of antioxidant enzymes (Soldá et al., 2017). Thus, the purpose of this study was to evaluate whether the use of subcutaneous mineral supplementation would affect metabolic parameters, immunological and antioxidant responses, in addition to milk composition and quality of dairy cows in the post-calving period.

MATERIAL AND METHODS

ANIMALS

The study was conducted in a commercial free-stall dairy farm located in Chapecó city, Southern Brazil. The farm had approximately 120 lactating animals, with an average of milk production of 25 liters/day. From these, 12 primiparous Holstein cows, with average weight of 450 ± 50 kg and age of approximately 26 ± 1 months were selected for this study. The diets provided for pre and post-calving cows, as well as the chemical analyses are shown in Table 1. For pre-calving cows the dry matter intake cow/day was 5.91 kg of roughage and 3.76 kg of concentrate (61% and 39%), and for cows post-calving, the dry matter intake cow/day was 8.42 kg of roughage and 8.04 kg of concentrate (51% and 49%) respectively. The animals were fed *ad libitum* twice a day, always after milking. During the experimental period, both groups were housed in a covered shed with free access to water. Pre-calving animals were kept on a picket outside the *free stall*, after delivery were allocated to lots of newborns.

EXPERIMENTAL DESIGN

The experimental design was completely randomized, and the cows were randomly divided into two groups, according to the expected calving day: the supplemented group

(animals treated with the subcutaneous mineral supplement) and the control group (without subcutaneous mineral supplementation). The animals in the supplemented group received a dose of 10 mL/animal (manufacturer's recommended dose) via subcutaneous at three times: approximately 20 days before calving (1st dose), on calving day (2nd dose) and 20 days post-calving (3rd dose). The animals in the control group received 10 ml of saline solution. The mineral complex used in this study is a commercial product (Fosfosal®, Virbac, France) with the following composition per 100 mL: sodium glycerophosphate (5.5H₂O: 14g), monosodium phosphate (2H₂O: 20,1g), copper chloride (2H₂O: 0.4g), potassium chloride (0.6g), magnesium chloride (2.5g) and sodium selenite (0.24g).

SAMPLING

Blood samples were collected after calving on days 3, 15, 45 and 60 of the experiment, when the main disturbances in the transition period were expected to appear. Blood was collected through the caudal vein and stored in non-anticoagulant tubes to obtain serum. The serum was obtained after blood centrifugation (3.500 rpm for 10 minutes), transferred to Eppendorf tubes, and frozen at -20 °C until analyses. In another tube, the blood was collected with anticoagulant (sodium citrate) to measure catalase and superoxide dismutase activities.

MILK PRODUCTION AND COMPOSITION

The volume of milk produced was individually measured using a bucket during milking every fifteen days post-calving (days 15, 30, 45 and 60). After milking, a sample of the milk was collected and transferred to a vial with bronopol and refrigerated at 4 °C until processing. The milk samples were sent to a laboratory accredited to the Brazilian Milk Quality Network. Centesimal composition of fat, protein, lactose, total solids and minerals in milk were analyzed using the infrared method (ISO 9622 - IDF Standart 141C: 2000) and somatic cell counts (SCC)

were evaluated using the flow cytometer method 13366-2 - IDF Standard 148-2: 2006), through the Delta Combiscope FTIR equipment.

KETONE BODIES MEASUREMENT

Levels of blood β -ketone were measured using specific tapes for quantification of ketone bodies (KetoVet Strip TD-4235®). A small hole with a hypodermic needle was performed in the caudal vein of the animal, and one drop of blood was placed on the tape and immediately read using a specific apparatus (KetoVet TD-4235®). The results were expressed as mmol/L.

BIOCHEMICAL ANALYZES

The serum concentration of glucose, total proteins and albumin were measured using a commercial kit (Analisa®, Carlos Prates, Belo Horizonte, Brazil) according to the manufacturer's instructions and the results read by semi-automatic equipment (Bioplus 2000). The globulin levels were obtained by subtracting the albumin from the total protein.

FREE RADICALS AND ANTIOXIDANTS ENZYMES

Free radicals (ROS) levels were determined in serum according to the technique described by Ali et al. (1992). Samples were diluted 1:10 with 10 mM Tris (pH 7.4) and 5 μ l of dichlorofluoresceine diacetate (DCFH-DA) as described in detail by Radavelli et al. (2016).

The activity of superoxide dismutase enzyme in whole blood was based on the spectrophotometric assay as described by McCord & Fridovich (1969), and the results were expressed in U SOD/mg protein. The catalase activity in whole blood was determined by Nelson and Kiesow (1972), and the results were expressed in η mol CAT/mg protein.

PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES LEVELS

Quantification of cytokines (tumor necrosis factor (TNF), and interleukin 1 and 6 (IL-1 and IL-6) was performed using ELISA and commercial kit (Quantikine®, R & D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's recommendations.

STATISTICAL ANALYSIS

The results were submitted to the Shapiro-Wilk test to verify the distribution of the data. The SCC variable did not show normality, and therefore, it was decided to use a non-parametric test, using the independent Kruskal-Wallis test. The other variables were submitted to the Student t-test. The results were considered significant when $P < 0.05$.

RESULTS

MILK PRODUCTION AND COMPOSITION

There were no differences ($P > 0.05$) in milk production between treatments, with a mean of 19.3 vs 22.0 liters (day 15 post-calving), 23.0 vs 24.3 liters (day 30 post-calving), 23.5 vs 24.8 (day 45 post-calving) and 24.2 vs. 26.2 liters (day 60 post-calving) in the cows supplemented with mineral compared to the control group. The centesimal milk composition (fat, lactose, protein, total solids and minerals) did not differ between groups ($P > 0.05$) during the experimental period. The SCC differed between treatments ($P < 0.05$), with lower SCC values in the animals supplemented with minerals on days 30, 45 and 60 of the study. Milk production and composition, and SCC results are shown in Table 2.

KETONE BODIES

Serum concentrations of ketone bodies differed between treatments at different times throughout the experimental period ($P < 0.05$). On days 30, 45 and 60 post-calving serum concentrations of ketone bodies were lower in animals that have received injectable mineral supplementation compared to the control group (Table 3).

SERUM BIOCHEMISTRY

There was a significant difference ($P < 0.05$) in seric levels of total protein and globulin between groups at different sampling time. On days 3, 15 and 30 post-calving seric total protein and globulin were higher in animals that received injectable mineral supplementation compared to control animals. However, glucose and albumin concentrations did not differ between groups ($P > 0.05$) (Table 3).

LEVELS OF FREE RADICALS AND ANTIOXIDANTS ENZYMES

ROS levels differed between groups ($P < 0.05$) where animals supplemented with minerals had lower ROS values on days 15 and 30 post-calving compared to the control animals. Similarly, there was a significant difference ($P < 0.05$) in SOD enzymatic activity on days 3, 15 and 30 post-calving, where animals that received subcutaneous mineral supplementation had higher values. However, levels of the CAT enzyme showed no differences between the groups ($P > 0.05$) (Table 4).

PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES LEVELS

There were significant differences ($P < 0.05$) in TNF and IL-1 cytokines on days 15 and 30 post-calving, where higher levels of these cytokines were found in supplemented animals. IL-6 cytokine levels were higher on days 15, 30 and 45 post-calving in supplemented animals compared to the control group (Table 5).

DISCUSSION

The use of subcutaneous mineral supplementation in this study did not increase milk production, and it did not change milk composition, similarly to that observed by Machado et al. (2013) and Ganda et al. (2016). These studies also used a commercial product containing minerals such as selenium, copper and manganese, also present in the supplement used in this study. Another study conducted by Ramos et al. (2012) also did not find differences on milk production and composition, when tested a zinc-methionine, manganese-methionine, copper-lysine and cobalt glucoheptonate based solution in grazing primiparous cows. Therefore, based on these published studies, using different commercial products, it was possible to verify that the mineral supplementation is unable to change milk production and composition.

However, subcutaneous mineral supplementation showed a positive effect on the health of the udder of primiparous cows, since SCC was lower in animals supplemented on days 30, 45 and 60 of the experiment. This result is due to the greater immune response activated by the minerals present in the supplement (mainly selenium and copper), since studies have shown that both minerals are linked to the reduction of SCC in primiparous and multiparous cows (Kruze et al., 2007; Salman et al., 2009; Machado et al., 2013). According to the literature, primiparous cows with mastitis caused by *E. coli* showed a peak for SCC only at 36h when supplemented with copper sulfate in the peri-calving period, differently from those

unsupplemented cows that had a peak at 18 h, a decline at 24h and another increase at 36h. In another study, researchers found that selenium (via diet or injectable) in primiparous grazing cows had a reduction in SCC in the first day to 28 days post-calving (Ceballos-Marquez et al., 2010). However, in a study by Ramos et al. (2012), there was no reduction in the SCC of primiparous grazing cows until 90 days of lactation even when supplemented with minerals (zinc, manganese, copper and cobalt) in the diet. The divergence of results found in the literature can be explained by some factors such as: animals type, production system adopted, type of the diet provided, environment, herd health, composition and quantity of the product used, as well as by the way the mineral was supplied (organic or inorganic form).

Lower SCC may be related to immunological activation, which occurred in this study, since TNF, IL-1 and IL-6 levels were higher in cows supplemented after 15 days post injection of the minerals. According to the literature, cytokines are soluble mediators and assist in the regulation of the immune response, and are generally produced by macrophages, with TNF and IL-1 being the first to appear in an inflammatory response (Gengelbach and Spears, 1998), as well as the main indicators of infection in the udder of cows. According to researchers, TNF participates in neutrophil chemotactic activity (Waller et al., 2003) and IL-1 during an inflammatory process regulates the expression of adhesion molecules and chemotaxis of neutrophils, as occurred in *E. coli* infection (Yamanaka et al., 2000), one of the main etiologic agents causing mastitis. The subcutaneous mineral supplementation in this study promoted a reduction of total seric ketone bodies (KB). This reduction in KB was only observed after 30 days of lactation, and believe that it did not occur previously due to the high energy requirement that dairy cows have at this stage for milk synthesis, where the body increases the use of glucose for the synthesis of energy and milk production. This can be explained by the numerical reduction of blood glucose in the first 30 days of lactation within the same treatment when compared to other periods. After 30 days of lactation, a gradual increase in blood glucose

concentration was observed in both groups, which may have occurred due to a higher intake of dry matter by the animals after the transition period. According to the literature, low blood glucose is due to increased tissue mobilization (mainly adipose tissue) as an attempt to increase available energy. Thus, with the mobilization of adipose tissue, a greater circulation of non-esterified fatty acids (NEFA) in the blood begins, that upon reaching the liver where are catalyzed. As a consequence, the ketone bodies are released into the bloodstream (Buhler et al., 2016). A recent study has found that a reduction on defense cells occurs in the transition period of Holstein cows in addition to increased concentrations of β -hydroxybutyrate (BHB) in the blood, which is related to placental retention (Moretti et al., 2016). High BHB concentration in the blood promotes lower activity of the immune system, reducing the bactericidal action of neutrophils (Little et al., 2016) and this finding was confirmed in our study, where BHB was higher in non-supplemented cows, as well as globulin levels and cytokines were lower in the same animals.

Total protein levels increased with injectable mineral supplementation in cows as a result of high globulins. It should be noted that globulins have an important role in the immune system, and their increase might be associated with immunological stimulation, since many of the minerals used act as cofactors and/or form part of the protein structure, such as copper and ceruloplasmin, which is a protein involved in distributing copper throughout the body (Overton and Yasui, 2014). In the current study, albumin levels did not differ between groups, being this one of the main indicators of the protein status of a diet (González, 2000).

During the transition period, several disorders can occur at different intensities, such as oxidative stress (Lykkesfeldt and Svendsen 2007), and therefore, in this study, mineral supplementation had a beneficial effect (increased antioxidant and reduced ROS), which minimized this oxidative stress in lactating cows. The subcutaneous mineral supplementation was able to stimulate the SOD enzyme increasing the activity since copper administered in cows

act as a cofactor of this enzyme (Sharma et al., 2007). In similar studies using diet supplementation also reported an increase in SOD activity, when copper was one of the minerals supplemented (Spears and Weiss, 2008; Sordillo and Aitken, 2009; Machado et al., 2014).

The mineral supplementation in this study also increase cytokines levels such as TNF and IL-1 which was also reported in animals that received copper and molybdenum (Gengelbach and Spears, 1998). The IL-1 cytokine is responsible for fever, hypotension, increased circulation of nitrogen oxide levels, recruitment of neutrophils and activation of T cells in the defense of the organism (Volp et al., 2010). IL-6 was also increased in this study, and it is an important cytokine to protect the animal against mastitis agents in dairy cows as described in the literature (Nakajima et al., 1997). Among the biomarkers of inflammation and oxidative status, selenium exerts a protective function and immunostimulant (Volp et al., 2010). In addition, IL-1, along with TNF- α , stimulate IL-6 production by smooth muscle cells and increase the expression of macrophages, and impair the immune response.

In conclusion, the subcutaneous mineral supplementation reduced somatic cell counts in the milk. This result is related to the mineral complex since it was able to minimize the oxidative stress in the post-calving period, as well as to improve animal health due to an stimulation of the immune system and the antioxidant effect by enzymatic activation. The subcutaneous mineral supplementation could be an alternative to minimize losses due to pathologies in cows in the transition period.

Ethics Committee: The present study was approved by the Ethics Committee for Use of Animals (CEUA) of Universidade do Estado e Santa Catarina (UDESC), under protocol number 477713101.

REFERENCES

- ALI S F, LEBEL C P, AND BONDY S C. 1992: Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxico*, v. 113, p. 637-648.
- BASS D A, PARCE J W, DECHATELET L R, SZEJDA P, SEESD M C, THOMAS M F. 1983: cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. **J Immuno**, v. 1130, p. 1910-1917.
- BUHLER S, FRAHM J, TIENKEN R, KERSTEN S, MEYER U, HUBER K AND DANICKE, S. 2016: Influence of energy level and nicotinic acid supplementation on apoptosis of blood leukocytes of periparturient dairy cows. **Vet Immuno And Immunopathol**, [s.l.], v. 179, p.36-45, out. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.07.007>.
- CEBALLOS M A, BARKEMA H W, STRYHN H, WICHTEL J J, NEUMANN J, MELLA A, KRUZE J, ESPINDOLA M S AND WITTWER F. 2010: The effect of selenium supplementation before calving on early-lactation udder health in pastured dairy heifers. **J Dairy Sci**, v. 93, p. 4602-4612.
- CORBELLINI C N. 1998: INTERNATIONAL SEMINAR ON MINERAL DEFICIENCIES IN RUMINANTS: Etiopathogenesis and control of hypocalcaemia and hypomagnesemia in dairy cows. Brazil: Porto Alegre, Ufrgs. 28 p.
- ESPOSITO G, IRONS P C, WEBB E C AND CHAPWANYA A. 2014: Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. **An Reprod Sci**, v. 144, p. 60-71.
- GANDA E k, BISINOTTO R S, VASQUEZ A K, TEIXEIRA G V, MACHADO V S, FODITSCH C, BICALHO M, LIMA F S, STEPHENS L, GOMES M S, DIAS J M AND BICALHO R C. 2016: Effects of injectable trace mineral supplementation in lactating dairy cows with elevated somatic cell counts. **J Dairy Sci**, v. 99, p.7319-7329.

GENGELBACH G P AND SPEARS J W. 1998: Effects of dietary copper and molybdenum on copper status, cytokine production, and humoral immune response of calves. **J Dairy Sci**, v. 81, p.3286-3292.

GONZÁLEZ F H D. 2000: Use of metabolic profile to determine nutritional status in beef cattle. In: GONZÁLEZ, F. H. D.; BARCELLOS, J. O; OSPINA, H.; RIBEIRO, L. A. O. (Eds). *Metabolic profile in ruminants: its use in nutrition and nutritional diseases*. Porto Alegre, Brazil, UFRGS, p. 12.

KRUZE J, CEBALLOS A, STRYHN H, MELLA A, MATAMOROS R, CONTRERAS A, LEYAN V AND WITTEWER F. 2007: Somatic cell count in milk of selenium-supplemented dairy cows after an intramammary challenge with *Staphylococcus aureus*. **J Vet Med. A, physiology, pathology, clinical medicine**, v. 54, p. 478-483.

LITTLE M W, O'CONNELL N E, WELSH M D, BARLEY J, MEADE K G AND FERRIS C P. 2016: Prepartum concentrate supplementation of a diet based on medium-quality grass silage: Effects on performance, health, fertility, metabolic function, and immune function of low body condition score cows. **J Dairy Sci**, v. 99, p.7102-7122.

LYKKESFEKDT J AND SVENDSEM O. 2007: Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. **Vet J**, [s.l.], v. 173, p.502-511. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.06.005>.

MACHADO V S, BICALHO M L S, PEREIRA R V, CAIXETA L S, KNAUER W A, OIKONOMOU G, GILBERT R O AND BICALHO R C. 2013: Effect of an injectable trace mineral supplement containing selenium, copper, zinc, and manganese on the health and production of lactating Holstein cows. **Vet J**, v. 197, p.451-456.

MACHADO V S, OIKONOMOU G, LIMA S F, BICALHO M L S, KACAR C, FODITSCH C, FELIPPE M J, GILBERT R O AND BICALHO R C. 2014: The effect of injectable trace

minerals (selenium, copper, zinc, and manganese) on peripheral blood leukocyte activity and serum superoxide dismutase activity of lactating Holstein cows. **Vet J**, v. 200, p. 299-304.

MCCORD J M AND FRIDOVICH I. 1969: Superoxidase Dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocrupein) **J Biol Chem**, v. 244, p. 6049-6055.

MORETTI P, PROBO M, CANTONI A, PALTRINIERI S AND GIORDANO A. 2016: Fluctuation of neutrophil counts around parturition in Holstein dairy cows with and without retained placenta. **Res Vet Sci**, [s.l.], v. 107, p.207-212. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.06.015>.

MORGANTE M, BEGHELLI D, PAUSELL M, DALL'ARA P, CAPUCCELA M AND RANUCCI S. 1999: Effect of administration of vitamin E and selenium during the dry period on mammary health and milk cell counts in dairy ewes. **J of Dairy Sci**, v. 82, p. 623-631.

NAKAJIMA Y, MIKAMI O, YOSHIOCA M AND MOTOI Y. 1997: Elevated levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and interleukin-6 (IL-6) activities in the sera and milk of cows with naturally occurring coliform mastitis. **Res Vet Sci**, v. 62, p. 297-298.

NELSON D L AND KIESOW L. A. 1972: Entalpy of the composition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C. **Analytical Biochemistry**, v. 49, p. 474-479.

OVERTON T R AND YASUI T. 2014: Practical applications of trace minerals for dairy cattle. **J An Sci**, v. 92, p. 416-426.

RADAVELLI W M, CAMPIGOTTO G, MACHADO G, BOTTARI N B, BOCHI G, MORESCO R N, MORSCH V M, SCHETINGER M R C, BIANCHI A, BALDISSERA M D AND FERREIRA R. 2016: Effect of lactation induction on milk production and composition, oxidative and antioxidant status, and biochemical variables. **Comp Clin Pathol**, [s.l.], v. 25, p.639-648. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00580-016-2243-z>.

- RAMOS J M, SOSA C, RUPRECHTER G, PESSINA P AND CARRIQUIRY M. 2012: Effect of organic trace minerals supplementation during early postpartum on milk composition, and metabolic and hormonal profiles in grazing dairy heifers. **Span J Agri Res**, v. 10, p. 681-689.
- SALMAN S, KHOL-PARISINI A, SCHAFFT H, LAHRSEN-WIEDERHOLT M, HULAN W H, DINSE D, ZENTEK J. 2009: The role of dietary selenium in bovine mammary gland health and immune function. **An H R Res**, v. 10, p. 21-34.
- SHANKAR A H AND PRASAD A S. 1998: Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. **Am J Clin Nutr**, v. 68, p. 447-463.
- SHARMA M C, JOSHI C AND DAS G. 2007: Therapeutic management of copper deficiency in buffalo heifers: Impact on immune function. **Vet R Commun**, [s.l.], v. 32, p. 49-63. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11259-007-9002-1>.
- SOLDÁ N M, GLOMBOWSKY P, CAMPIGOTTO G, BOTTARI N B, SCHETINGER M R C, MORSCH V M, FAVERO J, BALDISSERA M D, SCHOGOR A L B, BARRETA D, MACHADO G AND DA SILVA A S. 2016: Injectable mineral supplementation to transition period dairy cows and its effects on animal health. **Comp Clin Pathol**, [s.l.], v. 26, p. 335-342. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00580-016-2378-y>.
- SORDILO L M AND AITKEN S L. 2009: Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. **Vet Immunology and Immunopathology**, v. 128, p. 104-109.
- SORDILO L M. 2016: Nutritional strategies to optimize dairy cattle immunity1. **J Dairy Sci**, v. 99, p. 4967-4982.
- SPEARS J W AND WEISS W P. 2008: Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. **Vet J**, v. 176, p. 70-76.
- SCALETTI R W, TRAMMELL D S, SMITH B A AND HARMON R J. 2013: Role of dietary copper in enhancing resistance to *Escherichia coli* mastitis. **J Dairy Sci**, v. 86, p. 1240-1249.

VALKO M, LEIBFRITZ D, MONCOL J, CRONIN M T D, MAZUR M AND TELSER J. 2007: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Bio & Cell Bio**, v. 39, p. 444-449.

VOLP A C P, BRESSAN J, HERMSDORFF H H M, ZULET M A AND MARTÍNEZ J A. 2010: Selenium antioxidant effects and its link with inflammation and metabolic syndrome. **R Nutr**, v. 4, p. 581-590.

WALLER K P, COLDTZ I G, LUN S AND OSTENSSON K. 2003: Cytokines in mammary lymph and milk during endotoxin-induced bovine mastitis. **R Vet Sci**, V. 74, p. 31-36.

WATHES D C, FENWICK M, CHENG Z, BOURNE N, LEWELLUN S, MORRIS D G, KENNY D, MURPHY J AND FITZPATRICK J. 2007: Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. **Theriogenology**, [s.l.], v. 68, p. 232-241. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.006>.

WINTERGERST E S, MAGGINI S AND HORNIG D H. 2007: Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function. **Ann Nutr Metab**, v. 51, p. 301-323.

YAMANAKA H, HISAEDA K, HAGIWARA K, KIRISAWA R AND IWAI H. 2000: ELISA for Bovine interleukin-1 receptor antagonist and its application to mastitic sera and whey. **J Vet Med Sc**, v. 6, p. 661-664.

Table 1 Ingredients and chemical composition of the experimental diets.

Composition*	Pre-calving (kg/DM)	Post-calving (kg/DM)
Corn silage	2.81	7.02
Tifton hay	1.31	0.0
Tifton pre-dried	0.0	1.4
Ground corn	0.88	3.08
Soybean meal	2.23	4.46
Wheat bran	1.79	0.0
Mineral	0.20	0.50
Feed Intake (kg/day)	9.67	16.46
Chemical Analysis		
CP (%)	20	20.2
NDF (%)	32.4	31.3
NDT (%)	27.3	72.4
Fat (%)	2.6	2.8
NeL (Mcal/day)	0.64	1.00
Ca (%)	0.5	0.8
P (%)	0.5	0.6
Mg (%)	0.25	0.31
K (%)	1.26	1.34
Se (mg/day)	2.39 ppm	4.5 ppm
Cu	17.64 ppm	25.68 ppm

*Quantity supplied in dry matter (DM). CP, crude protein; NDF, Neutral detergent fiber; NDT, Total digestive nutrients; NeL, net energy for lactation.

Table 2 Mean and standard deviation of milk production, milk composition and somatic cell counts on days 15, 30, 45 and 60 post-calving of dairy primiparous cows supplemented with injectable minerals during the transitional period.

Variable	Days	Supplemented group	Control group	P-value
Milk production (L)	15	19.3 (4.9)	22.0 (3.0)	>0.05
	30	23.0 (2.6)	24.3 (4.1)	>0.05
	45	23.5 (2.5)	24.8 (3.1)	>0.05
	60	24.2 (1.25)	26.2 (5.5)	>0.05
Fat (%)	15	3.8 (1.1)	3.9 (0.5)	>0.05
	30	3.9 (0.8)	4.1 (0.7)	>0.05
	45	3.2 (0.2)	3.4 (0.9)	>0.05
	60	3.0 (0.6)	3.6 (0.7)	>0.05
Protein (%)	15	2.7 (0.22)	3.0 (0.20)	>0.05
	30	2.8 (0.20)	2.9 (0.17)	>0.05
	45	2.8 (0.14)	2.8 (0.22)	>0.05
	60	2.8 (0.23)	3.0 (0.29)	>0.05
Lactose (%)	15	4.6 (0.13)	4.4 (0.42)	>0.05
	30	4.7 (0.86)	4.5 (0.34)	>0.05
	45	4.8 (0.17)	4.4 (0.43)	>0.05
	60	4.8 (0.1)	4.6 (0.20)	>0.05
Somatic cell count (x1000/mL)**	15	220.3 (113)	207.0 (176)	>0.05
	30	49.6 (35)	471.2 (325)	<0.05**
	45	36.6 (8.4)	867.5 (614)	<0.05**
	60	67.7 (55)	497.0 (311)	<0.05**

Significantly ($p < 0.05$). *Student t-test; **independent Kruskal-Wallis test.

Table 3 Mean and standard deviation of ketone bodies, total protein, albumin, globulin and glucose on days 3, 15, 30, 45 and 60 days post-calving of dairy primiparous cows supplemented with injectable minerals during the transitional period.

Variable	Days	Supplemented	Control	P-value
Ketone bodies (mmol/L)	3	0.70 (0.1)	0.78 (0.3)	>0.05
	15	0.88 (0.3)	0.85 (3.0)	>0.05
	30	0.63 (0.1)	0.81 (0.1)	<0.05*
	45	0.65 (0.05)	0.86 (0.2)	<0.05*
	60	0.63 (0.1)	0.92 (0.09)	<0.05*
Total protein (g/dL)	3	5.5 (0.5)	4.6 (0.6)	<0.05*
	15	6.6 (0.4)	5.4 (0.3)	<0.05*
	30	7.0 (0.9)	6.1 (0.4)	<0.05*
	45	6.9 (1.2)	7.1 (1.1)	>0.05
	60	6.1 (0.3)	6.5 (0.6)	>0.05
Globulin (g/dL)	3	3.4(0.4)	2.2 (0.5)	>0.05
	15	4.3 (0.5)	3.2 (0.5)	<0.05*
	30	4.8 (0.7)	3.7 (0.3)	<0.05*
	45	4.7 (0.5)	4.7 (0.4)	>0.05
	60	4.1 (0.6)	4.3 (0.6)	>0.05
Albumin (g/dL)	3	2.1 (0.5)	2.4 (0.4)	>0.05
	15	2.3 (0.3)	2.2 (0.5)	>0.05
	30	2.2 (0.2)	2.4 (0.5)	>0.05
	45	2.2 (0.2)	2.4 (0.5)	>0.05
	60	2.0 (0.2)	2.2 (0.3)	>0.05
Glucose (mg/dL)	3	78.5 (19.2)	69.5 (34.0)	>0.05
	15	88.0 (35.3)	83.2 (34.8)	>0.05
	30	91.4 (15.6)	81.6 (18.1)	>0.05
	45	96.5 (12.5)	96.3 (16.2)	>0.05
	60	95.8 (16.4)	101.8 (23.2)	>0.05

Significantly ($p < 0.05$). *Student t-test.

Table 4 Mean and standard deviation of free radicals, catalase and superoxide dismutase on days 3, 15, 30, 45 and 60 days post-calving of dairy primiparous cows supplemented with injectable minerals during the transitional period.

Variable	Days	Supplemented	Control	P-value
Free radicals (U DCFA/mg)	3	36.9 (4.7)	44.3 (15.3)	>0.05
	15	26.8 (10.7)	37.9 (13.1)	<0.05*
	30	25.7 (9.3)	33.9 (1.8)	<0.05*
	45	25.3 (12.7)	20.7 (10.5)	>0.05
	60	16.6 (7.4)	15.7 (3.2)	>0.05
Superoxide dismutase (UI/mg protein)	3	4.8 (0.4)	4.1 (0.3)	<0.05*
	15	5.7 (0.6)	4.4 (0.3)	<0.05*
	30	5.9 (0.5)	4.3 (0.4)	<0.05*
	45	5.3 (0.5)	5.0 (0.5)	>0.05
	60	4.6 (0.3)	4.7 (0.2)	>0.05
Catalase (nmol/mg protein)	3	25.5 (7.7)	25.4 (8.4)	>0.05
	15	28.7 (5.9)	26.8 (7.3)	>0.05
	30	25.9 (8.4)	27.2 (6.7)	>0.05
	45	26.9 (8.7)	26.9 (6.4)	>0.05
	60	24.2 (6.8)	29.2 (6.0)	>0.05

Significantly ($p < 0.05$). *Student t-test.

Table 5 Mean and standard deviation of cytokines (TNF, IL-1 and IL-6) on days 3, 15, 30, 45 and 60 days post-calving of dairy primiparous cows supplemented with injectable minerals during the transitional period.

Variable	Days	Supplemented	Control	P-value
TNF (pg/mL)	3	10.0 (0.9)	8.7 (0.7)	>0.05
	15	14.9 (1.7)	11.2 (0.9)	<0.05*
	30	14.2 (1.5)	11.7 (0.8)	<0.05*
	45	12.9 (2.2)	12.6 (1.9)	>0.05
	60	12.4 (1.3)	12.5 (2.4)	>0.05
IL-1 (pg/mL)	3	3.78 (0.58)	3.73 (0.49)	>0.05
	15	5.95 (0.71)	4.26 (0.64)	<0.05*
	30	5.90 (0.57)	4.70 (0.54)	<0.05*
	45	5.28 (0.38)	5.02 (0.5)	>0.05
	60	4.73 (0.6)	5.22 (0.51)	>0.05
IL-6 (pg/mL)	3	5.70 (0.6)	5.76 (0.7)	>0.05
	15	8.63 (0.5)	5.96 (0.8)	<0.05*
	30	8.20 (0.6)	6.21 (0.8)	<0.05*
	45	7.18 (0.4)	6.15 (0.3)	<0.05*
	60	6.12 (0.7)	6.06 (0.4)	>0.05

Significantly ($p < 0.05$). *Student t-test.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A bovinocultura leiteira está em constante crescimento e com isso aumenta os diversos desafios, principalmente os ligados a produção. É necessário bom gerenciamento por parte do produtor sempre visando alta produção a baixo custo para melhor lucro na atividade. Sabe-se que esse gerenciamento vai desde alimentação, manejo, sanidade, genética entre outros. Dentre os diversos desafios o que mais afeta a produção leiteira é o período de transição que muitas vezes não é considerado importante por parte do produtor, que por sua vez é onde inicia o problema e o aparecimento de doenças metabólicas de produção, pois neste período a vaca passa a se tornar lactante e ocorre um aumento de exigências para a produção de leite, mas o consumo do animal não acompanha a exigência e é necessário uso de estratégias para minimizar o impacto do balanço energético negativo que ocorre nesse período.

Uma das estratégias que tem se estudado e utilizado durante o período de transição é a suplementação mineral. Os minerais exercem funções no sistema imunológico e contribuem para minimizar os impactos desse período. Uma das formas de uso dos minerais é na forma de complexos injetáveis que com poucos estudos tem-se mostrado eficiente na melhora do sistema imune de diversas espécies animais em diferentes fases de produção. Em alguns trabalhos realizados avaliando o período de transição em bovinos de leite tem aparecido resultados satisfatórios, com melhora na atividade de enzimas antioxidantes, aumento de células de defesa do organismo, reduzindo níveis de radicais livres.

Ainda a muito que pesquisar sobre o uso de minerais injetáveis, pois os estudos são poucos e existem muitos produtos com diferentes composições no mercado que precisam ser explorados e avaliados desde a qualidade a forma de uso, bem como o seu custo para a produção. Através desse trabalho o uso do complexo mineral injetável com os minerais P, K, Mg, Se e Cu, foi possível mostrar efeitos significativos na saúde de novilhas leiteiras no período de pós-parto com redução nos níveis de radicais livres e da β -cetona sanguínea e aumento da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), além disso reduziu a contagem de células somáticas (CCS) no leite, ou seja, estimulou o sistema imune e antioxidante minimizando o estresse oxidativo no pós-parto.

REFERÊNCIAS

- ABUELO, A et al. The importance of the oxidative status of dairy cattle in the periparturient period: revisiting antioxidant supplementation. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 99, n. 6, p. 1003-1016. 2014.
- BARBOSA, K. B. F et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**. 23 p. n. 4, 629-643. 2010.
- BATISTEL, F et al. Immunometabolic status during the peripartum period is enhanced with supplemental Zn, Mn, and Cu from amino acid complexes and Co from Co Glucoheptonate. **Plos One**, v. 11, n. 5, p. 1-19. 2016.
- BUTLER, W. R. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. **Livestock Production Science**, v. 83, n. 2, p. 211-218. 2003.
- BÜHLER, S et al. Influence of energy level and nicotinic acid supplementation on apoptosis of blood leukocytes of periparturient dairy cows. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 179, p. 36-45. 2016.
- BRODERIUS, M et al. Levels of plasma ceruloplasmin protein are markedly lower following dietary copper deficiency in rodents. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology**, v. 151, n. 4, p. 473-479. 2010.
- DE KOSTER, J. D; OPSOMER, G. Insulin resistance in dairy cows. **Veterinary Clinics of North America**, v. 29, n. 2, p. 299-322. 2013.
- DRACKLEY, J. K.; CARDOSO, F. C. Prepartum and postpartum nutritional management to optimize fertility in high-yielding dairy cows in confined TMR systems. **Animal**, v. 8, n. 1, p. 5-14. 2014.
- EMBRAPA. Indicadores de leite e derivados. 2018.
- EPAGRI. **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina**. Florianópolis: Epagri-cepa, 2017. 1 v.
- ESPOSITO, G et al. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 144. n. 3-4. p. 60-71. 2014.
- FAO. **World agriculture 2030: Main findings**. 2015. Disponível em: <http://www.fao.org/english/newsroom/news/2002/7833-en.html>. Acesso em: 26 jun. 2017.
- GANDA, E. K et al. Effects of injectable trace mineral supplementation in lactating dairy cows with elevated somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 9. p. 7319-7329. 2016.
- GOFF, J. P.; HORST, R. L. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 7. p. 1260-1268. 1997.

HERDT, T. H. Metabolic diseases of dairy cattle. **Veterinary Clinics of North America**. v. 29, n. 2, p. 267-468. 2013.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Indicadores da Pecuária. 2016.

LEBLANC, S. J et al. Major advances in disease prevention in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, [s.l.], v. 89, n. 4, p.1267-1279. 2006.

LEITNER, G et al. Effects of glandular bacterial infection and stage of lactation on milk clotting parameters: Comparison among cows, goats and sheep. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 279–285. 2011.

LITTLE, M. W et al. Prepartum concentrate supplementation of a diet based on medium-quality grass silage: Effects on performance, health, fertility, metabolic function, and immune function of low body condition score cows. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 9, p. 7102-7122. 2016.

LYKKESFEKDT, J.; SVENDSEM, O. Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. **The Veterinary Journal**, v. 173, p. 502-511. 2007.

MACHADO, V. S et al. The effect of injectable trace minerals (selenium, copper, zinc, and manganese) on peripheral blood leukocyte activity and serum superoxide dismutase activity of lactating Holstein cows. **The Veterinary Journal**. v. 200, n. 2, p. 299-304. 2014.

MACHADO, V. S et al. Effect of an injectable trace mineral supplement containing selenium, copper, zinc, and manganese on the health and production of lactating Holstein cows. **The Veterinary Journal**. v. 197, n. 2, p. 451-456. 2013.

MORETTI, P et al. Fluctuation of neutrophil counts around parturition in Holstein dairy cows with and without retained placenta. **Research in Veterinary Science**, v. 107, p. 207-212. 2016.

MORRIS, D. G et al. Pleiotropic effects of negative energy balance in the postpartum dairy cow on splenic gene expression: repercussions for innate and adaptive immunity. **Physiological Genomics**, v. 39, n. 1, p.28-37. 2009.

MOTA, M. F et al. Período de transição na vaca leiteira. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, Umuarama, v. 9, n. 1, p. 77-81. 2006.

MOTTIN, C et al. Suplementação com minerais quelatados em bovinos: Uma revisão. **Revista Ciências Exatas e da Terra e Ciências Agrárias**, v. 8, n. 2, p. 59-70. 2013.

MUNIZ, L. C; MADRUGA, S. W; ARAÚJO, C. L. Consumo de leite e derivados entre adultos e idosos no Sul do Brasil: um estudo de base populacional. **Ciência & Saúde Coletiva**, [s.l.], v. 18, n. 12, p. 3515-3522. 2013.

OMUR, A et al. Effects of antioxidant vitamins (A, D, E) and trace elements (Cu, Mn, Se, Zn) on some metabolic and reproductive profiles in dairy cows during transition period. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 19, n. 4, p. 697-706. 2016.

OVERTON, T. R; YASUI, T. Practical applications of trace minerals for dairy cattle. **Journal Animal Science**, v. 92, p. 416-426. 2014.

RAMOS, J. M et al. Effect of organic trace minerals supplementation during early postpartum on milk composition, and metabolic and hormonal profiles in grazing dairy heifers. **Spanish Journal of Agricultural Research**. v. 10, n. 3, p. 681-689. 2012.

SANTOS, J. E. P. Distúrbios metabólicos. In: Berchielli, Telma Teresinha; Pires, Alexandre Vaz; Oliveira, Simone Gisele de. **Nutrição de ruminantes**. 2. ed. Joboticabal: Funep, 2011. Cap. 15. p. 439-471.

SILANIKOVE, N et al. Lipopolysaccharide challenge of the mammary gland in cows induces nitrosative stress that impaired milk oxidative stability. **Animal**, v. 6, p. 1451–1459. 2012

SILANIKOVE, N et al. Subclinical mastitis in goats is associated with upregulation of nitric oxide-derived oxidative stress that causes reduction of milk antioxidative properties and impairment of its quality. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 6, p. 3449-3455, 2014.

SIMENEW, K; WONDU, M. Transition period and immunosuppression: Critical period of dairy cattle reproduction. **International Journal of Animal and Veterinary Advances**, [s.l], v. 2, n. 5, p. 44-57, 2013.

SHARMA, M. C.; JOSHI, C.; DAS GUNJAN. Therapeutic management of copper deficiency in buffalo heifers: Impact on immune function. **Veterinary Research Communications**, v. 32, n. 1, p.49-63. 2007.

SHIN, E. K et al. Relationships among ketosis, serum metabolites, body condition, and reproductive outcomes in dairy cows. **Theriogenology**, v. 84, n. 2, p. 252-260. 2015.

SOLDÁ, M. N et al. Injectable mineral supplementation to transition period dairy cows and its effects on animal health. **Comparative Clinical Pathology**, v. 26, n. 2, p. 335-342. 2016.

SORDILLO, L. M. Nutritional strategies to optimize dairy cattle immunity1. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 6, p. 4967-4982. 2016.

SORDILLO, L. M.; RAPHAEL, W. Significance of metabolic stress, lipid mobilization, and inflammation on transition cow disorders. **Veterinary Clinics of North America**. v. 29, n. 2, 267-278. 2013.

SORDILLO, L. M; AITKEN, S. L. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 128, n. 1, p. 104-109. 2009.

SPEARS, J. W.; WEISS, W. P. Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. **The Veterinary Journal**. v. 176, n. 1, 70-76. 2008.

STOWE, H. D.; HERDT. T. H. Clinical assessment of selenium status of livestock. **Journal of Animal Science** v. 70. p. n. 12, 3928-3933. 1992.

SUNDRUM, A. Metabolic disorders in the transition period indicate that the dairy cows' ability to adapt is overstressed. **Animals**, v. 5, n. 4, p. 978-1020. 2015.

PEDREIRA, M. S.; BERCHIELLI, T. T. Minerais. In: Berchielli, Telma Teresinha; Pires, Alexandre Vaz; Oliveira, Simone Gisele de. **Nutrição de ruminantes**. 2. ed. Cap 12 Piracicaba: Funep, 2011.

PASSANHA, A et al. Caracterização do consumo de leite em idosos. **Revista Brasileira de Crescimento e Desenvolvimento Humano**, v. 21, n. 2, p. 319-326. 2011.

PRITCHETT, J. G.; THILMANY, D. D.; JOHNSON, K. K. Animal disease economic impacts: A survey of literature and typology of research approaches. **International Food & Agribusiness Management Review**, v. 8, n. 1, p. 23–45. 2005.

TEIXEIRA, A. G. V et al. Effect of an injectable trace mineral supplement containing selenium, copper, zinc, and manganese on immunity, health, and growth of dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 7, p. 4216-4226. 2014.

TURK, R et al. Lipid mobilization and oxidative stress as metabolic adaptation processes in dairy heifers during transition period. **Animal Reproduction Science**, v. 141, n. 3-4, p. 109-115. 2013.

TURK, R et al. Influence of oxidative stress and metabolic adaptation on PON1 activity and MDA level in transition dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 108, n. 1-2, p. 98-106. 2008.

VILELA, D. **A importância econômica, social e nutricional do leite**. 2002. Disponível em: <http://www.nupel.uem.br/importancia.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2017.

ZHAO, X. J et al. Effects of chelated Zn/Cu/Mn on redox status, immune responses and hoof health in lactating Holstein cows. **Journal of Veterinary Science**. v. 16. n. 4, p. 439–446. 2015.

WINTERGERST, E. S et al Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function. **Annals Nutrition & Metabolism**, v. 51, p. 301-323. 2007.

WU, L et al. Critical thresholds of antioxidant and immune function parameters for Se deficiency prediction in dairy cows. **Biological Trace Element Research**, v. 172, n. 2, p. 320-325. 2016.

ANEXO



UDESC
UNIVERSIDADE
DO ESTADO DE
SANTA CATARINA

LAGES
CENTRO DE CIÊNCIAS
AGROVETERINÁRIAS

*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos do uso de minerais injetável nos parâmetros de imunidade e produção de leite no pós-parto de vacas leiteiras", protocolada sob o CEUA nº 4777131016, sob a responsabilidade de **Leandro Sâmia Lopes** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilio Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA/UDESC) na reunião de 26/05/2017.

We certify that the proposal "Effects of the use of injectable minerals in immune parameters and milk production in postpartum dairy cows", utilizing 20 Bovines (20 females), protocol number CEUA 4777131016, under the responsibility of **Leandro Sâmia Lopes** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of Santa Catarina State (CEUA/UDESC) in the meeting of 05/26/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **11/2016 a 03/2017** Área: **Zootecnia**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **24 a 30 meses**

N: **20**

Linhagem: **Holandesa**

Peso: **400 a 500 kg**

Resumo: A bovinocultura de leite está em constante crescimento em todo mundo. É considerada uma atividade de interesse econômico e sustento de muitas famílias. No entanto, através do uso de formas e estratégias de gestão e nutrição, pode ser melhorada a saúde afim de reduzir os impactos na perda de produção e eficiência do animal. Principalmente no período de transição em que a vaca está mais propensa a doenças devido ao balanço energético negativo. O estresse oxidativo aumenta no período de transição, devido ao desequilíbrio oxidativo e está associado a distúrbios metabólicos. Com isso o sistema imunológico fica prejudicado. Para que os efeitos desse período sejam minimizados a suplementação de minerais apresenta uma boa estratégia. Os minerais são essenciais no sistema imunológico, participam de diversas funções de defesa e antioxidante. Diante disso o objetivo desse estudo é avaliar o uso de um complexo de minerais injetáveis contendo selênio, magnésio, fósforo, potássio e cobre, sobre parâmetros hematológicos, sistema imunitário (leucograma e globulinas), níveis de corpos cetônicos e glicose, bem como CCS, produção e composição de leite em vacas leiteiras após o parto e ao longo do período de lactação. Serão utilizadas 20 novilhas de primeiro parto, divididas em dois grupos (10 para cada), onde 1 grupo receberá o complexo de mineral injetável e outro somente solução fisiológica via subcutânea. As novilhas suplementadas com minerais receberão as injeções nos dias: 20 dias antes do parto estimulando, no dia do parto e 20 dias pós parto na dosagem de 10ml/animal do produto comercial Fosfosal® (Virbac, França). O sangue e o leite dos animais serão coletados a cada 15 dias para posterior análise. A partir disso, espera-se que os animais tratados com produto apresentem melhores níveis de indicadores imunológicos, mantenha a curva de glicose estável, evite a cetose e uma melhor resposta no metabolismo energético, bem como manutenção da produção leiteira. A fim de minimizar os efeitos do período de transição e melhorar a saúde dos animais no pós-parto.

Local do experimento: O experimento será realizado na propriedade Monte Alegre no município de Chapecó - SC

Lages, 07 de junho de 2017



*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Uirajara'.

Prof. Dr. Uirajara Maciel da Costa
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina

Prof. Dr. Aury Nunes de Moraes
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina