

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

AMANDA VANZETTO

**MELATONINA EM VACAS HOLANDESAS NO
PERÍODO DE TRANSIÇÃO NO PÓS-PARTO: EFEITO PROFILÁTICO
SOBRE ENDOMETRITE SUBCLÍNICA**

CHAPECÓ

2022

AMANDA VANZETTO

**MELATONINA EM VACAS HOLANDESAS NO
PERÍODO DE TRANSIÇÃO NO PÓS-PARTO: EFEITO PROFILÁTICO
SOBRE ENDOMETRITE SUBCLÍNICA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Zootecnia pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.
Orientador: Prof. Dr. Rogério Ferreira.

CHAPECÓ

2022

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

Vanzetto, Amanda

Melatonina em vacas holandesas no período de transição
no pós-parto : efeito profilático sobre endometrite subclínica /
Amanda Vanzetto. -- 2022.
42 p.

Orientador: Rogério Ferreira

Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste,
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Chapecó, 2022.

1. Útero. 2. Estresse oxidativo. 3. Período de transição. 4.
Bovino. I. Ferreira, Rogério. II. Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste,
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

AMANDA VANZETTO

**MELATONINA EM VACAS HOLANDESAS NO
PERÍODO DE TRANSIÇÃO NO PÓS-PARTO: EFEITO PROFILÁTICO
SOBRE ENDOMETRITE SUBCLÍNICA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Zootecnia pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.
Orientador: Prof. Dr. Rogério Ferreira

BANCA EXAMINADORA

Membros:

Rogério Ferreira, Dr.

Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Monique Tomazele Rovani, Dra.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Joabel Tonello dos Santos, Dr.

Instituto Federal Farroupilha - IFFar

Chapecó, 03 de fevereiro de 2022.

Aos familiares, amigos, professores,
colegas e demais pelo apoio de sempre!

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Eliane A. C. Vanzetto e Mario Vanzetto, e as minhas irmãs Leticia e Liliane Vanzetto.

Agradeço ao meu companheiro Jardel Rogeri, e minhas duas amadas filhas Helena e Heloísa Rogeri, que sempre me apoiam e me estimulam a ser alguém melhor a cada dia!

Deixo um agradecimento especial ao meu orientador Rogério Ferreira por ter acreditado em mim e ao professor Murilo Farias Rodrigues, que sempre esteve a disposição para auxiliar no decorrer do projeto.

Meu sincero agradecimento a UDESC por ter me proporcionado a estrutura necessária para que pudesse crescer academicamente e pessoalmente.

Agradeço aos produtores da família Demartini e Orsolin pelo apoio e por conceder os animais para realização do experimento.

A todos meu mais sincero obrigada!

RESUMO

No período de transição em vacas leiteiras ocorrem diversas alterações fisiológicas, desafios metabólicos e maior produção de radicais livres. Mais recentemente, a administração exógena da melatonina tem sido utilizada em bovinos como antioxidante e anti-inflamatório. Este trabalho teve por objetivo avaliar a hipótese do efeito profilático da melatonina como potencial anti-inflamatório e antioxidante no período pós-parto sobre a endometrite subclínica (citológica) em vacas leiteiras. Vacas holandesas em lactação (n=38) no pós-parto imediato foram utilizadas. Os animais foram aleatoriamente alocados em dois grupos, as que receberam apenas solução fisiológica (n=19), e o outro grupo em que as vacas receberam 4,64mg/animal de melatonina por aplicação (n=19). A primeira aplicação foi realizada dentro dos primeiros 4 dias de pós-parto, e repetidas com o intervalo de 7 dias, totalizando 4 aplicações por vaca, por via de administração subcutânea. A coleta de material para citologia uterina foi realizada 16±1,3 (Citologia 1) e 30±1,3 dias pós-parto (Citologia 2), com o uso de escova ginecológica, as lâminas foram coradas pelo método do panóptico rápido e depois analisadas. Não foi verificada diferença no percentual de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) entre os tratamentos, tanto na Citologia 1 quanto na Citologia 2. No entanto, administração de melatonina promoveu uma diminuição na porcentagem de PMN. Aos 30 dias pós-parto, a prevalência de endometrite subclínica para as vacas foi de 32% no grupo controle e 16% no grupo tratado com melatonina. Não foi verificada variância estatística quando analisado a diferença para TBARS, ERO e FRAP entre o grupo tratado e controle, entretanto houve tendência de redução de nitrito nos animais tratados com melatonina. Tendo em vista os aspectos observados, considera-se que os resultados sugerem uma melhora na resposta inflamatória com a utilização da suplementação da melatonina durante o período pós-parto. Como o pós-parto é um período de desafio imunológico, a suplementação com melatonina pode ser uma ferramenta para melhora da saúde e da eficiência reprodutiva. É possível concluir que a suplementação com melatonina durante o pós-parto determina diminuição na porcentagem de PMN no endométrio após resposta aguda.

Palavras-chave: Útero; Estresse oxidativo; Período de transição; Bovino.

ABSTRACT

During the transition period in dairy cows, several physiological and metabolic changes occur as well as an increase production of free radicals. Recently, the melatonin supplementation has been used in cattle as an antioxidant and anti-inflammatory treatment. This study intended to evaluate the prophylactic effect of melatonin as anti-inflammatory and antioxidant in postpartum period hypothesis on subclinical (cytological) endometritis in dairy cows. Lactating Holstein cows (n=38) in the immediate postpartum period were evaluated. The animals were randomly allocated into two groups, those that received only saline solution (n=19), or the group receiving 4.64 milligrams of melatonin per animal (n=19). The first application was performed via subcutaneous administration within the first 4 days postpartum and then reapplied with a 7 days' interval, totaling 4 applications per cow. The material gathering for uterine cytology was performed with a gynecological brush at 16 ± 1.3 (Cytology 1) and 30 ± 1.3 days postpartum (Cytology 2). At time of Cytology 2, blood samples were collected for evaluation of reactive oxygen species (ROS), nitrite, thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and total antioxidant potential (FRAP). The percentage of polymorphonuclear neutrophils (PMN) at two moments (Cytology 1 and Cytology 2) did not differ between groups. However, melatonin treatment promoted a higher reduction in the percentage of PMN's from Cytology 1 to Cytology 2. At 30 days postpartum, the prevalence of subclinical endometritis was 32% and 16% in control and melatonin-treated groups, respectively ($P>0.05$). Melatonin treatment did not affect TBARS, ROS and FRAP ($P>0.05$). However, melatonin-treated cows tended to have lower nitrite concentration ($P=0.07$). Therefore, melatonin supplementation during the postpartum period leads to an improvement in the inflammatory response. As the postpartum is a period of immunological challenge, the supplementation with melatonin can be an instrument to improving both health and reproductive efficiency. It can be concluded that during the postpartum period, melatonin supplementation generates a reduction of PMN percentage in the endometrium after a severe response.

Key words: Uterus; Oxidative stress; Transition period; Cow.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Porcentagem de polimorfonucleares (PMN) no endométrio de vacas submetida a citologia pareada aos $16\pm 1,3$ (Citologia 1) e $30\pm 1,3$ dias (Citologia 2) pós-parto, após a administração de solução fisiológica (Controle; n=19) ou 4,64 mg de melatonina (Melatonina; n=19). O boxplot representa o intervalo interquartis e mediana; e as hastes inferior e superior representam o percentil 10 e 90. ns: não significativo. 24
- Figura 2 - Variação dos 16 aos 30 dias pós-parto na porcentagem de polimorfonucleares (PMN) no endométrio de vacas após a administração de solução fisiológica (Controle; n=19) ou 4,64 mg de melatonina (Melatonina; n=19). Asterisco (*) indica diferença estatística entre os tratamentos ($p < 0,05$). 25
- Figura 3 – Diferenças de atividade geradora de Nitrito nos $30\pm 1,3$ dias, em animais com administração de solução fisiológica (Controle, n=19) ou 4,64 mg de melatonina (Melatonina; n=19). Hashtag (#) indica tendência entre os tratamentos ($p > 0,05$). 26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BEN	Balanço energético negativo
CAT	Catalase
DEL	Dias em lactação
ERO's	Espécies reativas de oxigênio
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
GPx	Glutathione peroxidase
IMS	Ingestão de matéria seca
NF-kB	Fator nuclear kappa B
PMN	Leucócitos polimorfonucleares
SOD	Superóxido dismutase
NOx	Oxidases de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
TBARS	Substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico
FRAP	Habilidade do plasma para redução férrica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	PERÍODO DE TRANSIÇÃO EM VACAS LEITEIRAS.....	15
2.2	ENDOMETRITE	16
2.3	MELATONINA.....	18
3	ARTIGO: MELATONINA EM VACAS LEITEIRAS NO PERÍODO DE TRANSIÇÃO PÓS-PARTO: EFEITO PROFILÁTICO SOBRE ENDOMETRITE SUBCLÍNICA	20
3.1	INTRODUÇÃO	21
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.2.1	Animais, local e tratamento.	22
3.2.2	Estresse oxidativo	22
3.2.3	Citologia	23
3.2.4	Análise estatística	23
3.3	RESULTADOS.....	23
3.4	DISCUSSÃO	26
3.5	CONCLUSÃO	29
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	30
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
6	ANEXO A – COMPROVANTE DO CEUA	41

1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura de leite é uma atividade econômica de grande importância para a agropecuária brasileira, apresentando um elevado caráter social no país (KEMER; GLIENKE; BOSCO, 2020). No Brasil se faz presente desde a colonização, estabelecendo marcas no processo de desenvolvimento do país, partindo de uma base técnica rudimentar para a atual, mais técnica (BATISTELLA; ANDRADE; BOLFE, 2011). Nas últimas duas décadas o leite aumentou em torno de 80% sua produção com a mesma quantidade de vacas ordenhadas devido à elevação da produtividade do rebanho, além de outras mudanças que ocorreram no setor de produção leiteiro (ROCHA; CARVALHO; RESENDE, 2020). Segundo a FAO (FAO, 2020), o Brasil se encontra como terceiro maior produtor mundial de leite, estando atrás dos Estados Unidos e da Índia.

Em 2021 o valor bruto da produção primária de leite atingiu R\$ 51 bilhões, estando em terceiro lugar dentre os produtos agropecuários nacionais e com perspectiva de alcançar valor bruto de aproximadamente R\$ 56 bilhões em 2022 (BRASIL, 2021). O estado de Santa Catarina se encontra em terceiro lugar no ranking de produção dos estados brasileiros, estando atrás somente de Minas Gerais e Rio Grande do Sul (IBGE, 2021). Os números mostram a importância de um setor produtivo que vem ganhando destaque no decorrer dos últimos anos. Atualmente o número de produtores apresenta uma tendência de queda mas em contrapartida se intensificou a produtividade animal.

O ranking de produtividade animal (produção/vaca/ano) é liderado pela região Sul do Brasil, pela ordem de Santa Catarina (3.799 litros), Rio Grande do Sul (3.441 litros) e Paraná (3.225 litros), colocando a produtividade animal da região Sul superior à verificada na Argentina (3.000 litros) e no Uruguai (2.645 litros), que são exportadores de lácteos para o Brasil atualmente (ROCHA; CARVALHO; RESENDE, 2020). O uso de animais especializados foi essencial para aumentar a produtividade, como das raças Holandesa e Jersey que são predominância na região Sul, onde possui clima temperado e subtropical (NETO; RODRIGUES; CÓRDOVA, 2013). Também ocorreu um aumento de produtores especializados que investem em tecnologia, com maior volume produzido e

qualidade alcançada, usufruindo das economias de escala (BATISTELLA; ANDRADE; BOLFE, 2011).

A longevidade da vaca em um rebanho é de extrema importância, sendo determinada pela saída do animal do rebanho, por fatores como acometimento a saúde, produção, eficiência reprodutiva, desejo de melhorar genética do rebanho, abate e outros motivos que levam o animal ao descarte (RILANTO *et al.*, 2022). Doenças uterinas do período pós-parto, especialmente metrite e endometrite, têm uma importante influência na economia da fazenda leiteira, e seu surgimento coincidiu com o aumento da produção leiteira dos últimos 50 anos (DRUKER *et al.*, 2022a; SHELDON; CRONIN; BROMFIELD, 2019). A prevenção de distúrbios, principalmente do período periparto, são de extrema importância dentro da bovinocultura leiteira, pois podem determinar a permanência ou não de um animal na propriedade. O desempenho reprodutivo de um rebanho está fortemente ligado à saúde nas semanas que antecedem o parto e após (LEBLANC, 2008). Segundo (DAROS *et al.*, 2017), alguns fatores ambientais e práticas de manejo estão relacionados ao aumento de doenças do período de transição.

Após o parto, para que a vaca retorne à ciclicidade e se encontre apta a conceber e permanecer no rebanho, é preciso que variados processos ocorram, sendo eles a involução uterina, a regeneração do endométrio e a eliminação do conteúdo bacteriano do útero (SHELDON *et al.*, 2008). Vacas com endometrite subclínica são menos propensas a conceber no primeiro serviço em comparação com vacas sadias, possuindo impactos duradouros na manutenção da prenhez, fatores que favorecem o descarte do animal (EDELHOFF *et al.*, 2020a; GOBIKRUSHANTH *et al.*, 2016a). Portanto, estabelecer manejos precoces de diagnósticos de endometrite subclínica é importante para minimizar os efeitos negativos no desenvolvimento reprodutivo (OSAWA, 2021).

A melatonina é uma molécula que possui ação anti-inflamatória, antioxidante e um modulador imunológico de relevância, podendo aumentar os mecanismos de defesa pela estimulação de várias vias pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e alterações celulares que favorecem o sistema imunológico (HARDELAND, 2018, 2019; TAMURA *et al.*, 2020a). A administração de melatonina exógena demonstrou uma diminuição da resposta inflamatória e

efeito anti-apoptótico, este depende de sua capacidade de otimizar a função mitocondrial pelos mecanismos antioxidantes (CHITIMUS *et al.*, 2020; EL-SHENAWY *et al.*, 2002). A cultura de embriões em meio condicionado por endométrio inflamado determinou qualidade inferior dos embriões, enquanto a qualidade embrionária e a taxa de implantação são melhoradas com a suplementação com melatonina em modelos experimentais humanos (ARJMAND *et al.*, 2016; HILL; GILBERT, 2008). O objetivo deste trabalho foi testar o efeito profilático da melatonina como potencial anti-inflamatório e antioxidante no período pós-parto sobre a endometrite subclínica em vacas leiteiras.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PERÍODO DE TRANSIÇÃO EM VACAS LEITEIRAS

O período de transição se resume especificamente às três semanas que antecedem o parto e três semanas após. Este período carece de maior atenção no manejo da vaca leiteira, pois a ocorrência de distúrbios metabólicos é mais frequente (DRACKLEY, 1999). Entretanto, as alterações metabólicas podem iniciar mais cedo, no período seco, e têm efeitos colaterais prolongados após o parto (CAIXETA; OMONTESE, 2021). Neste período, a glândula mamária da vaca se remodela e se regenera em preparação para a próxima lactação (PUTMAN *et al.*, 2018).

O mecanismo envolvido na homeostase da vaca em transição é de extrema relevância, pois atualmente o desafio é manter a saúde e a produtividade do rebanho (RUPRECHTER *et al.*, 2018). As vacas que buscam menos o alimento durante o pré-parto têm maior probabilidade de ser diagnosticadas com metrite e hiperce-tonemia pós-parto (SAHAR *et al.*, 2020). No período pós-parto ocorre uma alta demanda energética que não acompanha o pico de IMS, levando o animal a um BEN. O BEN é uma característica de grande relevância para as vacas de transição e é um mecanismo adaptativo normal em animais leiteiros de alta produção (WANKHADE *et al.*, 2017). O manejo nutricional adequado é fundamental neste período, pois o BEN impacta diretamente na fertilidade modificando o estado nutricional e imunológico, o que pode favorecer a instalação de uma infecção uterina e como consequência pode levar ao anestro (HUT *et al.*, 2019; MORAES *et al.*, 2014). Além da importância de um consumo adequado de água (DAROS *et al.*, 2017).

Garantir a ingestão adequada de nutrientes no período pré-parto é de extrema importância para prevenir o acometimento por doenças nutricionais. Os minerais, especialmente os macrominerais, são essenciais para restaurar a função normal e a sobrevivência dos animais, pois deficiências pode gerar problemas subclínicos e clínicos e reduzir drasticamente o desempenho reprodutivo e produtivo dos bovinos leiteiros (FADLALLA; OMER; ATTA, 2020).

A garantia de sucesso na bovinocultura leiteira é atribuída pelo conhecimento dos mecanismos fisiológicos envolvidos no periparto. Os animais

que se encontram em homeostase, estando saudáveis, reiniciam mais cedo a ciclicidade que vacas que se encontram com algum desafio, pois o retorno da ciclicidade é altamente afetado pelo estado de saúde da mesma independente da estação do ano (RUPRECHTER *et al.*, 2020). O animal que apresenta algum desequilíbrio, o sistema imunológico responde de forma exacerbada aumentando os distúrbios de saúde, liberando moléculas de sinalização pró-inflamatória (SORDILLO; RAPHAEL, 2013).

Segundo Spaans *et al.* (2022), ocorre ativação elevada no sistema imunológico nos dias posteriormente ao parto, mesmo em vacas que não apresentam sinais clínicos de estresse metabólico. O desequilíbrio na resposta pró-inflamatória no periparto pode levar a um aumento excessivo de citocinas e demais mediadores de inflamação, levando o animal a um estado de estresse metabólico. O período de transição é caracterizado pelo animal se apresentar em um estado pobre em antioxidantes (BERNABUCCI *et al.*, 2005). O aumento das respostas inflamatórias está ligado ao estresse oxidativo, esses dois fatores levam o animal a distúrbios de saúde, pois o estresse oxidativo atua pelas vias de sinalização pró-inflamatória aumentando a inflamação (SORDILLO; RAPHAEL, 2013).

2.2 ENDOMETRITE

Após o parto, a placenta deve ser expulsa dentro de algumas horas, e para isso, o útero contrai-se constantemente durante a primeira semana e os lóquios são expelidos juntamente com os restos de membranas e fluidos fetais (SHELDON *et al.*, 2009). Após algumas semanas não deve mais ter resíduos da gestação e o animal considera-se estar apto a ciclicidade e gestação novamente, porém, às vezes, devido a infecções que acontecem juntamente ao período inicial pós-parto, isto não ocorre.

A composição da microbiota uterina difere das vacas sadias e doentes possivelmente pelos patógenos uterinos interagirem para facilitar a colonização do endométrio, associado com endometrite clínica à presença de *Fusobacterium*, *Trueperella* e *Peptoniphilus* (WANG *et al.*, 2018). O grau de contaminação bacteriana no útero depende da resposta dos mecanismos de defesa do animal, como primeira defesa física atua a vulva, a vagina e o colo

uterino, como defesa fisiológica tem-se grande quantidade de muco secretada pela vagina e colo do útero e a principal defesa fagocítica é pela invasão de neutrófilos (SHELDON; DOBSON, 2004).

As infecções bacterianas uterinas são de extrema importância, pois além de afetar o ovário também suprimem a secreção hipotálamo/hipófise do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e hormônio luteinizante (LH), e a resposta animal sendo imune ou inflamatória compromete a saúde e bem-estar, causando uma subfertilidade e infertilidade (SHELDON; DOBSON, 2004). Uma das principais causas de falta de ciclicidade e fertilidade em animais pós-parto é devido a infecções uterinas clínicas e subclínicas no pós-parto.

Doenças uterinas do período após o parto, especialmente metrite e endometrite, têm uma participação relevante na gestão econômica da fazenda, principalmente pela diminuição dos parâmetros de desempenho reprodutivo (DRUKER *et al.*, 2022b). A endometrite se caracteriza pela inflamação do endométrio, primeira linha de defesa contra bactérias invasoras, sem sinais sistêmicos com associação ao atraso na recuperação uterina (DU *et al.*, 2019; KASIMANICKAM *et al.*, 2004). Além disso pode-se ser dividida em duas classificações, sendo clínica e subclínica (citológica).

Define-se como endometrite clínica quando observa a presença de secreção uterina purulenta visível no trato reprodutivo até 26 dias pós-parto. (SHELDON *et al.*, 2006, 2009). Enquanto se define como endometrite subclínica (ou citológica) a presença igual ou superior a 18% de PMN de 28 a 33 DEL, ou pelo menos 10% de PMN de 34 a 37 DEL, em animais sem sinais clínicos da doença (BARAŃSKI *et al.*, 2012; KASIMANICKAM *et al.*, 2004; SHELDON *et al.*, 2009). Os animais que desenvolvem endometrite clínica ou subclínica apresentam maiores concentrações séricas de adiponectina, TNF- α , IL-1 β e IL-6, que desencadeiam uma resposta e estimulam células adicionais para a área afetada para aumentar de forma rápida sua resposta e reduzir o dano oxidativo, em comparação com vacas saudáveis, além de apresentar maior perda de condição corporal (CRAY, 2012; KASIMANICKAM *et al.*, 2013).

2.3 MELATONINA

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é derivada do triptofano por meio de reações de conversão enzimática, sendo produzida principalmente na glândula pineal, entretanto não exclusivamente (RADOGNA; DIEDERICH; GHIBELLI, 2010). Acreditava-se que ela atuava apenas para regulação do ciclo circadiano da função neuroendócrina e fisiológica, no entanto, ela é encontrada em outras partes do organismo respondendo a sinais que não são regulados pelo ciclo circadiano, tendo um efeito parácrino ou autócrino, induzindo efeitos locais (GONZALEZ *et al.*, 2020).

A melatonina atua via receptores, entre eles MT1 e MT2, que são formados por sete domínios transmembranares acoplados à proteína G (DUBOCOVICH; MARKOWSKA, 2005). A presença do receptor MT1 foi relatado no miométrio de ratos, assim como sua transcrição no endométrio durante o ciclo estral (ZHAO; PANG; POON, 2002). A presença da melatonina via receptores em diferentes órgãos pertencentes ao sistema reprodutivo feminino. A melatonina juntamente com seus metabólitos, como 3-hidroxi melatonina cíclica (3 - OHM), N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina (AFMK) e N1-acetil-5-metoxiquinuramina (AMK), são poderosos antioxidantes e anti-inflamatórios (ZHANG; ZHANG, 2014).

Ela atua no sistema inflamatório por vários mecanismos, entre esses pelo fator nuclear kappa B (NF-kB), onde atua na ativação e desativação de genes ligados as fases pró-inflamatórias e as de recuperação da inflamação (MARKUS; CECON; PIRES-LAPA, 2013; REITER *et al.*, 2006). A melatonina atua na redução da ligação do NF-kB, possivelmente impedindo sua translocação para o núcleo (GUO *et al.*, 2017; MOHAN; MELTZ; REITER, 1996). Estudos comprovaram que a melatonina auxilia na diminuição do depósito de lipídios na artéria de camundongos, pela diminuição da ativação do inflamassoma NLRP3, que é promissor para o tratamento de doenças relacionadas a inflamação devido ao seu papel crítico na regulação da mesma (MA *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2020). Estudos como de Yang *et al.* (2017) mostraram que vacas com mastite subclínica que foram suplementadas com melatonina tiveram uma diminuição nas concentrações sanguíneas de cortisol, além de redução na contagem de células somáticas do leite.

A melatonina diminuiu a concentração de ERO's e aumentou as atividades de glutathione peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) nos espermatozoides, melhorando a integridade do acrossoma e a capacidade de fertilização dos mesmos, atuando na via antioxidante (LI *et al.*, 2019). O sistema de defesa enzimático que inclui as enzimas GPx, SOD e CAT, atuam por vias de mecanismos de prevenção, buscando impedir e controlar a formação de radicais livres e espécies não-radicais buscando a homeostase do organismo (BARBOSA *et al.*, 2010).

Outro estudo realizado com oócitos bovinos mostraram que a melatonina melhora a maturação citoplasmática, aumentando os níveis intracelulares de glutathione reduzida (GSH) e adenosina trifosfato (ATP), aumentando os níveis de expressão de genes antioxidantes e resultando em maior capacidade de desenvolvimento e fertilização, resultando em uma melhora na qualidade dos oócitos durante a maturação *in vitro* (MIV), além de não possuir citotoxicidade para os fibroblastos independentemente da dose aplicada (ALVES *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2018).

**3 ARTIGO: MELATONINA EM VACAS LEITEIRAS NO PERÍODO DE
TRANSIÇÃO PÓS-PARTO: EFEITO PROFILÁTICO SOBRE
ENDOMETRITE SUBCLÍNICA**

Autores: Amanda Vanzetto, Murilo Farias Rodrigues, Rogério Ferreira

Os resultados desta dissertação são apresentados na forma de artigo a ser submetido, com as seções de acordo com as orientações da Revista *Reproduction in Domestic Animals*.

3.1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura de leite possui uma fase caracterizada como período de transição, que se resume especificamente às três semanas que antecedem o parto e três semanas após, período crítico, de maior acometimento por distúrbios metabólicos (DRACKLEY, 1999). Após o parto, para que a vaca retorne a ciclicidade e se encontre apta a conceber e permanecer no rebanho variados processos precisam ocorrer como a involução uterina, a regeneração do endométrio e a eliminação do conteúdo bacteriano do útero (SHELDON *et al.*, 2008). As doenças uterinas que acontecem no período pós-parto comprometem a produtividade do animal, esses distúrbios têm uma participação relevante na gestão econômica da fazenda, pois vacas com endometrite subclínica são menos propensas a conceber no primeiro serviço em comparação com vacas saudáveis, possuindo impactos duradouros na manutenção da prenhez (DRUKER *et al.*, 2022b; EDELHOFF *et al.*, 2020b; GOBIKRUSHANTH *et al.*, 2016b). A endometrite se caracteriza pela inflamação do endométrio, primeira linha de defesa contra bactérias invasoras, sem sinais sistêmicos com associação ao atraso na recuperação uterina (DU *et al.*, 2019; KASIMANICKAM *et al.*, 2004).

O período de transição é caracterizado pelo animal se apresentar em um estado pobre em antioxidantes (BERNABUCCI *et al.*, 2005). Segundo (SPAANS *et al.*, 2022), ocorre ativação elevada no sistema imunológico nos dias posteriormente ao parto, mesmo em vacas que não apresentam sinais clínicos de estresse metabólico. O aumento das respostas inflamatórias está ligado ao estresse oxidativo, que levam o animal a distúrbios de saúde, pois o estresse oxidativo atua pelas vias de sinalização pró-inflamatória aumentando a inflamação (SORDILLO; RAPHAEL, 2013). O estresse oxidativo tem sido causador de diversas doenças e distúrbios no periparto (SHAPOVALOV *et al.*, 2019; SURAI *et al.*, 2019).

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) foi classificada originalmente como um hormônio endócrino produzido somente na glândula pineal, entretanto, atualmente se verificou que muitas células, órgãos e tecidos possuem a capacidade de sintetizar melatonina, que atua via receptores, entre eles MT1 e MT2 (DUBOCOVICH; MARKOWSKA, 2005). A presença da melatonina via receptores em diferentes órgãos pertencentes ao sistema reprodutivo feminino.

Segundo Reiter et al. (2018), a melatonina é um antioxidante não convencional com ações incomuns umas das quais ainda precisam ser identificadas. Ela é encontrada em outras partes do organismo respondendo a sinais que não são regulados pelo ciclo circadiano, tendo um efeito parácrino ou autócrino, induzindo efeitos locais (GONZALEZ *et al.*, 2020). A melatonina juntamente com seus metabólitos, são poderosos antioxidantes e moduladores inflamatórios (ZHANG; ZHANG, 2014).

Assim sendo, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito profilático da melatonina no período pós-parto sobre a saúde uterina e incidência de endometrite.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Animais, local e tratamento.

Foram utilizadas 38 vacas leiteiras da raça Holandesa no pós-parto imediato de duas propriedades leiteiras situadas no oeste do estado de Santa Catarina. Os animais foram aleatoriamente alocados em dois grupos para receber solução fisiológica (n=19) ou 4,64mg/animal de melatonina (n=19), por via subcutânea em cada aplicação. A melatonina (Sigma-Aldrich Chemical Co. St. Louis, MO, USA.) foi dissolvida conforme descrito por Yang et al. (2017). A primeira aplicação foi realizada dentro dos primeiros 4 dias de pós-parto, e repetidas com o intervalo de 7 dias, totalizando 4 aplicações por vaca, buscando aproveitar o efeito residual da melatonina.

3.2.2 Estresse oxidativo

Para aferir a produção de EROs foi seguida a metodologia proposta por Lebel et al. (1992). A avaliação de nitrito foi mensurada de acordo com Guevara et al. (1998). Para análise da oxidação lipídica foi realizado a determinação do valor de TBARS pelo método de (MIYAGUSKU *et al.*, 2007). Para ver a capacidade de FRAP foi seguido a metodologia de Benzie et al. (1996).

3.2.3 Citologia

A coleta de material para citologia uterina foi realizada $16\pm 1,3$ (Citologia 1) e $30\pm 1,3$ dias pós-parto (Citologia 2), com o uso de escova ginecológica, conforme metodologia descrita previamente (DUBUC *et al.*, 2010; PASCOTTINI *et al.*, 2020). As lâminas foram coradas pelo método do panóptico rápido e depois analisadas.

A análise da citologia se determinou pela proporção de leucócitos polimorfonucleares (PMN), que foi realizada pelo método de Pothmann *et al.* (2015), onde foram contadas 200 células utilizando microscópio óptico de luz. O percentual de PMN foi estabelecido em relação às células endometriais contadas, onde se entende como endometrite subclínica (ou citológica) a presença superior a 18% de neutrófilos aos 28 a 33 DEL na citologia 2, em animais sem sinais clínicos da doença (BARAŃSKI *et al.*, 2012; KASIMANICKAM *et al.*, 2004; SHELDON *et al.*, 2006).

3.2.4 Análise estatística

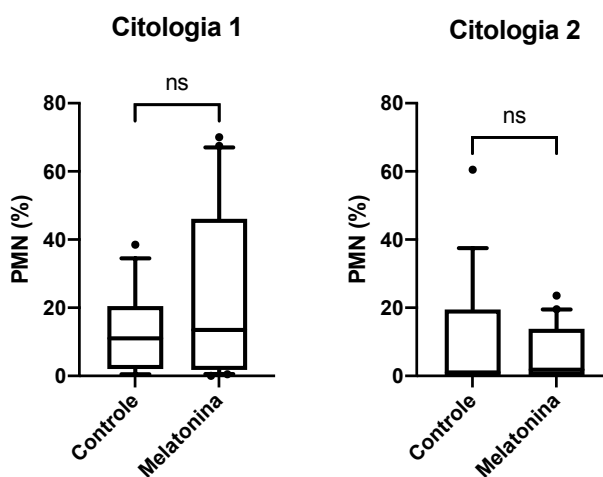
A distribuição e homocedasticidade das variáveis dependentes foi avaliada pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Variáveis dependentes com distribuição normal e homocedásticas foram analisadas por teste paramétrico. O efeito dos tratamentos sobre o percentual de neutrófilos foi analisado pelo teste de Wilcoxon. O efeito dos grupos sobre a variação na porcentagem de PMN entre as coletas foi analisado pelo teste F-Snedecor. O efeito dos grupos sobre a porcentagem de vacas com endometrite subclínica foi realizado pelo teste qui-quadrado. As análises foram realizadas com o programa estatístico JMP Pro (SAS Institute Inc.).

3.3 RESULTADOS

Não foi verificada diferença no percentual de PMN entre os tratamentos, tanto na Citologia 1 quanto na Citologia 2 ($p > 0,05$; Figura 1). No entanto, administração de melatonina promoveu uma redução de nove vezes na porcentagem de PMN entre os dias 14 e 28 ($p < 0,05$; Figura 2). Aos 30 dias pós-parto, a prevalência de endometrite subclínica para as vacas foi de 32% no grupo

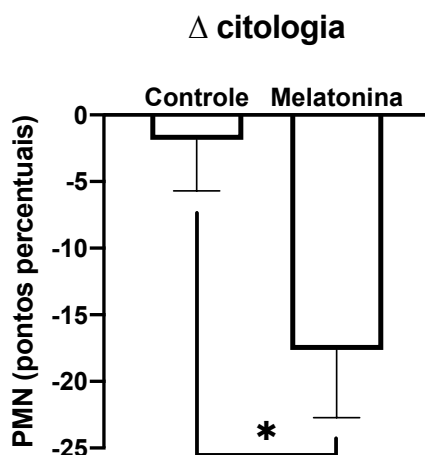
controle e 16% no grupo tratado com melatonina ($p>0,05$). Quando analisado os grupos quanto a diferença de intervalo parto-concepção não foi demonstrada diferença estatística entre grupo tratado e controle ($p>0,05$).

Figura 1 - Porcentagem de polimorfonucleares (PMN) no endométrio de vacas submetida a citologia pareada aos $16\pm 1,3$ (Citologia 1) e $30\pm 1,3$ dias (Citologia 2) pós-parto, após a administração de solução fisiológica (Controle; $n=19$) ou 4,64 mg de melatonina (Melatonina; $n=19$). O boxplot representa o intervalo interquartis e mediana; e as hastes inferior e superior representam o percentil 10 e 90. ns: não significativo.



Fonte: Vanzetto et al., 2022.

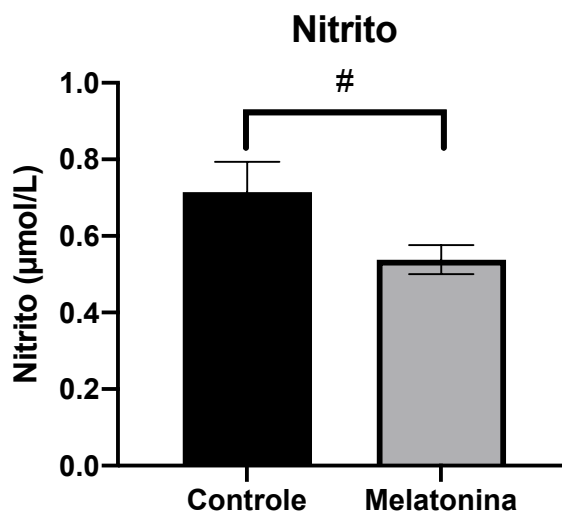
Figura 2 - Variação dos 16 aos 30 dias pós-parto na porcentagem de polimorfonucleares (PMN) no endométrio de vacas após a administração de solução fisiológica (Controle; n=19) ou 4,64 mg de melatonina (Melatonina; n=19). Asterisco (*) indica diferença estatística entre os tratamentos ($p < 0,05$).



Fonte: Vanzetto et al., 2022.

Não foi verificada variância estatística quando analisado a diferença para TBARS, ERO e FRAP entre o grupo tratado (melatonina) e controle (solução fisiológica), entretanto para a análise de NOx (Figura 3) foi verificada uma tendência de diminuição no grupo tratado em relação ao grupo controle.

Figura 3 – Diferenças de atividade geradora de Nitrito nos $30 \pm 1,3$ dias, em animais com administração de solução fisiológica (Controle, $n=19$) ou 4,64 mg de melatonina (Melatonina; $n=19$). Hashtag (#) indica tendência entre os tratamentos ($p>0,05$).



Fonte: Vanzetto et al., 2022.

3.4 DISCUSSÃO

A reprodução é um dos pontos chaves dentro da bovinocultura de leite, com isso se preconiza que o animal retorne brevemente a ciclicidade após parto, não prolongando seu período de lactação, pois a permanência em lactação muitas vezes acaba resultando em uma queda na produção de leite. Neste estudo, investigamos se a suplementação injetável de melatonina no período de transição pós-parto promove uma ação profilática sobre endometrite subclínica, diminuindo a inflamação uterina. Pesquisas anteriores relataram prevalência de 53% (GILBERT *et al.*, 2005) e 21% (PRUNNER *et al.*, 2014) de endometrite subclínica diagnosticada por citologia em rebanhos leiteiros, essa diferença nas prevalências encontradas entre rebanhos sugere que a endometrite subclínica pode ser influenciada pelo manejo adotado pelas propriedades, afetando a saúde uterina. A prevalência de endometrite subclínica neste experimento foi de 32% no grupo controle e 16% no grupo tratado com melatonina, mostrando eficiência na utilização da melatonina para reduzir a prevalência da endometrite subclínica.

As estimativas da prevalência da endometrite e suas perdas são escassas na maioria das propriedades leiteiras, essa lacuna de conhecimento impede uma

melhor tomada de decisão dentro da atividade (NYABINWA *et al.*, 2020b). Muitas vezes a endometrite citológica não é diagnosticada, ficando o animal retornando ao estro, podendo levar a uma auto resolução ou descarte do animal por problema reprodutivo. O diagnóstico de rotina da endometrite subclínica raramente é praticado, entretanto, pode ser utilizado a citologia endometrial em uma amostragem de vacas para se obter informações sobre a prevalência (GILBERT, 2016). O estabelecimento de manejos precoces de diagnósticos de endometrite subclínica é importante para minimizar os efeitos negativos no desempenho reprodutivo das propriedades (OSAWA, 2021).

A endometrite é uma doença uterina conhecida pelas perdas que causa à reprodução, e as vacas que apresentam endometrite possuem um menor desempenho reprodutivo (MOHAMMED; MANN; ROBINSON, 2019; NYABINWA *et al.*, 2020a). A endometrite subclínica ou citológica é definida como uma inflamação endometrial do útero na ausência de sintomatologia clínica, sendo diagnosticada pela determinação da proporção de PMN presentes em uma amostra (SHELDON *et al.*, 2006). Entretanto, sua causa ainda não é clara e pode incluir a resolução de infecções bacterianas, imunopatologia ou reparo tecidual, porém alguns desequilíbrios metabólicos contribuem para que aconteça, como o BEN, que altera a resposta imunológica adequada (SHELDON; CRONIN; BROMFIELD, 2019; WAGENER; GABLER; DRILLICH, 2017). Um estudo anterior mostrou que uma elevação na contagem de neutrófilos em amostras citológicas uterinas se correlacionou positivamente com o aumento da expressão de citocinas pró inflamatórias (DADARWAL *et al.*, 2019). Em animais com endometrite subclínica, em seus tecidos ocorre uma elevação da expressão de genes que codificam mediadores inflamatório (SHELDON; CRONIN; BROMFIELD, 2019). Outro trabalho com cultura de embriões em meio condicionado por endométrio inflamado relatou uma qualidade inferior dos embriões, enquanto a qualidade embrionária e a taxa de implantação são melhoradas pela melatonina em modelos experimentais humanos (ARJMAND *et al.*, 2016; HILL; GILBERT, 2008).

A melatonina é uma molécula que possui ação anti-inflamatória e antioxidante, quando ela elimina os radicais livres é convertida em metabólitos que potencializam sua ação (TAMURA *et al.*, 2020b). Atualmente a melatonina

é conhecida por ser um modulador imunológico de relevância, podendo aumentar os mecanismos de defesa pela estimulação de várias vias pró inflamatórias, anti-inflamatórias e alterações celulares que favorecem o sistema imunológico (HARDELAND, 2018, 2019). Uma melhor resposta imunológica pela melatonina se deve por uma resposta aguda elevada, seguida de uma diminuição do processo inflamatório, não deixando tornar-se crônico. A administração de melatonina exógena em estudos demonstrou uma diminuição da resposta inflamatória e efeito anti-apoptótico, este depende de sua capacidade de otimizar a função mitocondrial pelos mecanismos antioxidantes (CHITIMUS *et al.*, 2020; EL-SHENAWY *et al.*, 2002). A utilização de melatonina neste experimento relatou uma redução de nove pontos percentuais de PMN quando comparado ao grupo controle, diminuindo a inflamação uterina, causando possíveis benefícios no desempenho reprodutivo dos animais. Segundo Shin *et al.* (2015) a melatonina tem a capacidade de diminuir a infiltração de neutrófilos no tecido infectado resultando em uma diminuição na reação inflamatória após resposta aguda não deixando tornar-se um processo crônico, o que condiz com nossos achados.

Estudo realizado utilizando suplementação mineral injetável relatou uma melhora na função dos PMN no período pós-parto, dando uma resposta aguda rápida, ajudando na resposta imunológica do animal no período de transição (SILVA *et al.*, 2022). Utilizando o anti-inflamatório meloxicam para analisar saúde endometrial em vacas leiteiras, foi observada uma melhora na função dos PMN, mas não ocorreu diminuição da inflamação do endométrio (PASCOTTINI *et al.*, 2020). A utilização da suplementação de melatonina neste trabalho contribui na diminuição da inflamação do endométrio pós-parto. Estudos anteriores com suplementação de melatonina em vacas com mastite diminuíram a contagem de células somáticas, aumentou os níveis de IgG e IgM resultando em melhora nos indicadores do leite (WU *et al.*, 2021; YANG *et al.*, 2017), o que condiz que da mesma forma que a melatonina melhora a resposta inflamatória da glândula mamária, influencia a do ambiente uterino. Quando correlacionado o uso de melatonina com a fertilidade, foi verificado que concentrações maiores de melatonina no dia 16 de gestação foi associado a respostas de fertilidade subsequentes (DIRANDEH; ANSARI-PIRSARAEI; THATCHER, 2022).

As EROs celulares são habitualmente geradas a partir do superóxido que é derivado principalmente das mitocôndrias, sendo via fosforilação oxidativa e por meio das enzimas Nox. Estas, por fim, apresentam papel central na orquestração da ativação e disfunção de outras enzimas (KONIOR *et al.*, 2014; TAYLOR; TSE, 2021). Estudo realizado com espermatozoides ovinos constataram presença da enzima Nox, constatando que alterações em suas concentrações estão associadas á capacitação espermática, e que com a utilização da melatonina evitou o estresse oxidativo decorrente do processo de capacitação (MIGUEL-JIMÉNEZ *et al.*, 2021). A utilização de melatonina neste trabalho relatou uma tendência na diminuição de nitrito, entretanto, mais estudos precisam ser realizados para aferir seu efeito. Uma subunidade catalítica do complexo NADPH oxidase, foi identificado como um gene perturbado em células endometriais de mulheres com endometriose, o que pode favorecer clinicamente problemas na implantação do embrião e subsequente falha reprodutiva (AGHAJANOVA *et al.*, 2010). Segundo Dirandeh *et al.* (2022), valores relativamente maiores de TBARS foram detectados em vacas leiteiras com perda embrionária precoce. Entretanto, em nosso estudo não houve diferença estatística entre os valores.

3.5 CONCLUSÃO

Os resultados sugerem uma modulação na resposta inflamatória com a utilização da suplementação da melatonina durante o período pós-parto, seguido de uma diminuição no processo inflamatório. A suplementação com melatonina pode ser uma ferramenta para melhora da saúde e da eficiência reprodutiva.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na bovinocultura de leite atual é de grande importância que perdas na atividade sejam evitadas, pois afetam diretamente a viabilidade econômica da atividade. Perda animal causada por problemas reprodutivos que também afetam a produção animal são recorrentes na rotina das propriedades leiteiras, as quais devem ser evitadas por medidas de prevenção e solucionadas com diagnósticos precoces.

A endometrite subclínica, sendo caracterizada por uma inflamação uterina, está presente em diversas propriedades leiteiras afetando negativamente seus indicadores produtivos e reprodutivos. A utilização da suplementação da melatonina injetável no período pós-parto mostrou-se eficiente na redução de PMN no endométrio, reduzindo a inflamação uterina, resultando em menor prevalência de endometrite citológica. A partir disso o uso da melatonina sistêmica sugere uma melhora na resposta inflamatória, dando uma resposta aguda rápida e após cessando o processo para não se tornar crônico.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGHAJANOVA, L.; HORCAJADAS, J. A.; WEEKS, J. L.; ESTEBAN, F. J.; NEZHAT, C. N.; CONTI, M.; GIUDICE, L. C. The protein kinase A pathway-regulated transcriptome of endometrial stromal fibroblasts reveals compromised differentiation and persistent proliferative potential in endometriosis. **Endocrinology**, v. 151, n. 3, p. 1341–1355, 2010.
- ALVES, C. S.; FURTADO, R. A.; ANTÔNIO, G.; NASCENTES, N.; TAVARES, D. C. Avaliação dos efeitos da melatonina sobre a produção de embriões bovinos obtidos por fecundação in vitro e transferência nuclear de células somáticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 43, p. 815–823, 2019.
- ARJMAND, F.; KHANMOHAMMADI, M.; ARASTEH, S.; MOHAMMADZADEH, A.; KAZEMNEJAD, S.; AKHONDI, M. M. Extended Culture of Encapsulated Human Blastocysts in Alginate Hydrogel Containing Decidualized Endometrial Stromal Cells in the Presence of Melatonin. **Molecular Biotechnology**, v. 58, n. 10, p. 684–694, 2016.
- BARAŃSKI, W.; PODHALICZ-DZIĘGIELEWSKA, M.; ZDUŃCZYK, S.; JANOWSKI, T. The diagnosis and prevalence of subclinical endometritis in cows evaluated by different cytologic thresholds. **Theriogenology**, v. 78, n. 9, p. 1939–1947, dez. 2012.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; DE CÁSSIA GONÇALVES ALFENAS, R.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutricao**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.
- BATISTELLA, M.; ANDRADE, R.; BOLFE, E. Geotecnologias e gestão territorial da bovinocultura no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 2011, n. 2005, p. 251–260, 2011.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **ANALYTICAL BIOCHEMISTRY**, v. 73, p. 70–76, 1996.
- BERNABUCCI, U.; RONCHI, B.; LACETERA, N.; NARDONE, A. Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 6, p. 2017–2026, 2005.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Valor Bruto da Produção Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.** Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/politica-agricola/valor-bruto-da-producao-agropecuaria-vbp>>.

CAIXETA, L. S.; OMONTESE, B. O. Monitoring and improving the metabolic health of dairy cows during the transition period. **Animals**, v. 11, n. 2, p. 1–17, 2021.

CHITIMUS, D. M.; POPESCU, M. R.; VOICULESCU, S. E.; PANAITESCU, A. M.; PAVEL, B.; ZAGREAN, L.; ZAGREAN, A. M. Melatonin's impact on antioxidative and anti-inflammatory reprogramming in homeostasis and disease. **Biomolecules**, v. 10, n. 9, p. 1–28, 2020.

CRAY, C. Acute Phase Proteins in Animals. *Em: Progress in Molecular Biology and Translational Science*. [s.l: s.n.]p. 113–150.

DADARWAL, D.; GONZÁLEZ-CANO, P.; DICKINSON, R.; GRIEBEL, P.; PALMER, C. Characterization of cytokine gene expression in uterine cytobrush samples of non-endometritic versus endometritic postpartum dairy cows. **Theriogenology**, v. 126, p. 128–139, 2019.

DAROS, R. R.; HÖTZEL, M. J.; BRAN, J. A.; LEBLANC, S. J.; VON KEYSERLINGK, M. A. G. Prevalence and risk factors for transition period diseases in grazing dairy cows in Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 145, p. 16–22, 2017.

DIRANDEH, E.; ANSARI-PIRSARAEI, Z.; THATCHER, W. Melatonin as a Smart Protector of Pregnancy in Dairy Cows. **Antioxidants**, v. 11, n. 2, p. 1–16, 2022.

DRACKLEY, J. K. Biology of Dairy Cows During the Transition Period: the Final Frontier? **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 11, p. 2259–2273, nov. 1999.

DRUKER, S. A.; SICSIC, R.; VAN STRATEN, M.; GOSHEN, T.; KEDMI, M.; RAZ, T. Cytological endometritis diagnosis in primiparous versus multiparous dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 1, p. 665–683, 2022a.

DRUKER, S. A.; SICSIC, R.; VAN STRATEN, M.; GOSHEN, T.; KEDMI, M.; RAZ, T. Cytological endometritis diagnosis in primiparous versus multiparous dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 1, p. 665–683, 2022b.

DU, A.; ID, M. R.; DEMBE, D.; BOLIFRAUD, P.; AUBERT, J.; MARY-HUARD, T.; ROCHA, D.; MOCKLY, S.; HEPPELMANN, M.; DIEUZY-LABAYE, I.; ZIEGER,

P.; SMITH, D. G. E.; SCHUBERTH, J.; SHELDON, I. M.; SANDRA, O. Subclinical endometritis in dairy cattle is associated with distinct mRNA expression patterns in blood and endometrium. p. 1–24, 2019.

DUBOCOVICH, M. L.; MARKOWSKA, M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. **Endocrine**, v. 27, n. 2, p. 101–110, 2005.

DUBUC, J.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E.; WALTON, J. S.; LEBLANC, S. J. Definitions and diagnosis of postpartum endometritis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 11, p. 5225–5233, 2010.

EDELHOFF, I. N. F.; PEREIRA, M. H. C.; BROMFIELD, J. J.; VASCONCELOS, J. L. M.; SANTOS, J. E. P. Inflammatory diseases in dairy cows: Risk factors and associations with pregnancy after embryo transfer. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 12, p. 11970–11987, 2020a.

EDELHOFF, I. N. F.; PEREIRA, M. H. C.; BROMFIELD, J. J.; VASCONCELOS, J. L. M.; SANTOS, J. E. P. Inflammatory diseases in dairy cows: Risk factors and associations with pregnancy after embryo transfer. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 12, p. 11970–11987, 2020b.

EL-SHENAWY, S. M.; ABDEL-SALAM, O. M. E.; BAIUOMY, A. R.; EL-BATRAN, S.; ARBID, M. S. Studies on the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of melatonin in the rat. **Pharmacological Research**, v. 46, n. 3, p. 235–243, 2002.

FADLALLA, I. M. T.; OMER, S. A.; ATTA, M. Determination of some serum macroelement minerals levels at different lactation stages of dairy cows and their correlations. **Scientific African**, p. e00351, mar. 2020.

FAO. **Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura**.

Disponível

em:

<https://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity>.

GILBERT, R. O. Management of Reproductive Disease in Dairy Cows. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 32, n. 2, p. 387–410, jul. 2016.

GILBERT, R. O.; SHIN, S. T.; GUARD, C. L.; ERB, H. N.; FRAJBLAT, M. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. **Theriogenology**, v. 64, p. 1879–1888, 2005.

GOBIKRUSHANTH, M.; SALEHI, R.; AMBROSE, D. J.; COLAZO, M. G. Categorization of endometritis and its association with ovarian follicular growth

and ovulation, reproductive performance, dry matter intake, and milk yield in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 86, n. 7, p. 1842–1849, 2016a.

GOBIKRUSHANTH, M.; SALEHI, R.; AMBROSE, D. J.; COLAZO, M. G. Categorization of endometritis and its association with ovarian follicular growth and ovulation, reproductive performance, dry matter intake, and milk yield in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 86, n. 7, p. 1842–9, 15 out. 2016b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27395084>>.

GONZALEZ, A.; ESTARAS, M.; MARTINEZ-MORCILLO, S.; MARTINEZ, R.; GARCÍA, A.; ESTÉVEZ, M.; SANTOFIMIA-CASTAÑO, P.; TAPIA, J. A.; MORENO, N.; PÉREZ-LÓPEZ, M.; MÍGUEZ, M. P.; BLANCO-FERNÁNDEZ, G.; LOPEZ-GUERRA, D.; FERNANDEZ-BERMEJO, M.; MATEOS, J. M.; VARA, D.; RONCERO, V.; SALIDO, G. M. Melatonin modulates red-ox state and decreases viability of rat pancreatic stellate cells. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 6352, 14 dez. 2020.

GUEVARA, I.; IWANEJKO, J.; DEMBIŃSKA-KIEĆ, A.; PANKIEWICZ, J.; WANAT, A.; ANNA, P.; GOŁABEK, I.; BARTUŚ, S.; MALCZEWSKA-MALEC, M.; SZCZUDLIK, A. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 274, n. 2, p. 177–88, 22 jun. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9694586>>.

GUO, Y.; SUN, J.; LI, T.; ZHANG, Q.; BU, S.; WANG, Q.; LAI, D. Melatonin ameliorates restraint stress-induced oxidative stress and apoptosis in testicular cells via NF- κ B / iNOS and Nrf2 / HO-1 signaling pathway. **Scientific Reports**, n. August, p. 1–13, 2017.

HARDELAND, R. Melatonin and inflammation—Story of a double-edged blade. **Journal of Pineal Research**, v. 65, n. 4, p. 0–3, 2018.

HARDELAND, R. Aging, melatonin, and the pro-and anti-inflammatory networks. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 5, p. 1–33, 2019.

HILL, J.; GILBERT, R. Reduced quality of bovine embryos cultured in media conditioned by exposure to an inflamed endometrium. **Australian Veterinary Journal**, v. 86, n. 8, p. 312–316, 2008.

HUT, P. R.; MULDER, A.; VAN DEN BROEK, J.; HULSEN, J. H. J. L.; HOOIJER, G. A.; STASSEN, E. N.; VAN EERDENBURG, F. J. C. M.; NIELEN, M. Sensor

based eating time variables of dairy cows in the transition period related to the time to first service. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 169, n. March 2018, p. 104694, 2019.

IBGE. Indicadores IBGE: Estatística da Produção Pecuária. 2021.

KASIMANICKAM, R.; DUFFIELD, T. F.; FOSTER, R. A.; GARTLEY, C. J. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. v. 62, p. 9–23, 2004.

KASIMANICKAM, R. K.; KASIMANICKAM, V. R.; OLSEN, J. R.; JEFFRESS, E. J.; MOORE, D. A.; KASTELIC, J. P. Associations among serum pro- and anti-inflammatory cytokines, metabolic mediators, body condition, and uterine disease in postpartum dairy cows. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 11, p. 1–13, 2013.

KEMER, A.; GLIENKE, C. L.; BOSCO, L. C. Índices de conforto térmico para bovinos de leite em Santa Catarina Sul do Brasil. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 5, p. 29655–29672, 2020.

KONIOR, A.; SCHRAMM, A.; CZESNIKIEWICZ-GUZYK, M.; GUZYK, T. J. NADPH oxidases in vascular pathology. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 20, n. 17, p. 2794–2814, 2014.

LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. C. Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress. **Chemical Research in Toxicology**, v. 5, n. 2, p. 227–231, 1992.

LEBLANC, S. J. Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: A review. **The Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 102–114, 2008.

LI, C. Y.; HAO, H. S.; ZHAO, Y. H.; ZHANG, P. P.; WANG, H. Y.; PANG, Y. W.; DU, W. H.; ZHAO, S. J.; LIU, Y.; HUANG, J. M.; WANG, J. J.; RUAN, W. M.; HAO, T.; REITER, R. J.; ZHU, H. bin; ZHAO, X. M. Melatonin improves the fertilization capacity of sex-sorted bull sperm by inhibiting apoptosis and increasing fertilization capacitation via MT1. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 16, p. 1–19, 2019.

MA, S.; CHEN, J.; FENG, J.; ZHANG, R.; FAN, M.; HAN, D.; LI, X.; LI, C.; REN, J.; WANG, Y.; CAO, F. Melatonin Ameliorates the Progression of Atherosclerosis

via Mitophagy Activation and NLRP3 Inflammasome Inhibition. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 1–12, 4 set. 2018.

MARKUS, R. P.; CECON, E.; PIRES-LAPA, M. A. Immune-Pineal Axis : Nuclear Factor κ B (NF- κ B) Mediates the Shift in the Melatonin Source from Pinealocytes to Immune Competent Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 10979–10997, 2013.

MIGUEL-JIMÉNEZ, S.; PINA-BELTRÁN, B.; GIMENO-MARTOS, S.; CARVAJAL-SERNA, M.; CASAO, A.; PÉREZ-PE, R. NADPH Oxidase 5 and Melatonin: Involvement in Ram Sperm Capacitation. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, n. May, p. 1–14, 2021.

MIYAGUSKU, L.; THOMAZINI, M.; KUAYE, A. Y.; JOSEFINA, C. Avaliação do valor de TBARS em coxas de frangos irradiadas TBAR values assessment in irradiated chicken legs. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 45–49, 2007.

MOHAMMED, Z. A.; MANN, G. E.; ROBINSON, R. S. Impact of endometritis on post-partum ovarian cyclicity in dairy cows. **The Veterinary Journal**, v. 248, p. 8–13, 2019.

MOHAN, N.; MELTZ, M. L.; REITER, R. J. EFFECT OF MELATONIN ON NF- B DNA-BINDING ACTIVITY IN. v. 20, n. 10, p. 687–692, 1996.

MORAES, C.; MAIA, L.; LANDIM-ALVARENGA, F.; OBA, E. Considerações a Respeito Do Pós-Parto Em Bovinos. **Veterinária e Zootecnia**, v. 21, n. 1, p. 53–63, 2014.

NETO, A. T.; RODRIGUES, R. S.; CÓRDOVA, H. de A. **Desempenho produtivo de vacas mestiças Holandês x Jersey em comparação ao Holandês** *Revista de Ciências Agroveterinárias* 2013.

NYABINWA, P.; BASOLE, O.; HIRWA, A.; BEBE, O. Effects of endometritis on reproductive performance of zero-grazed dairy cows on smallholder farms in Rwanda. **Animal Reproduction Science**, v. 221, n. August, p. 106584, 2020a.

NYABINWA, P.; KASHONGWE, O. B.; HIRWA, C. d. A.; BEBE, B. O. Influence of endometritis on milk yield of zero-grazed dairy cows on smallholder farms in Rwanda. **Veterinary and Animal Science**, v. 10, p. 100149, 2020b.

OSAWA, T. Predisposing factors, diagnostic and therapeutic aspects of persistent endometritis in postpartum cows. **Journal of Reproduction and Development**, v. 67, n. 5, p. 2021–052, 2021.

PASCOTTINI, O. B.; SCHYNDEL, S. J. Van; SPRICIGO, J. F. W.; CARVALHO, M. R.; MION, B. Effect of anti-inflammatory treatment on systemic inflammation, immune function, and endometrial health in postpartum dairy cows. **Scientific Reports**, p. 1–9, 2020.

POTHMANN, H.; PRUNNER, I.; WAGENER, K.; JAUREGUIBERRY, M. Theriogenology The prevalence of subclinical endometritis and intrauterine infections in repeat breeder cows. **Theriogenology**, v. 83, n. 8, p. 1249–1253, 2015.

PRUNNER, I.; WAGENER, K.; POTHMANN, H.; EHLING-SCHULZ, M.; DRILLICH, M. Risk factors for uterine diseases on small- and medium- sized dairy farms determined by clinical, bacteriological, and cytological examinations. **Theriogenology**, v. 82, n. 6, p. 857–865, 2014.

PUTMAN, A. K.; BROWN, J. L.; GANDY, J. C.; WISNIESKI, L.; SORDILLO, L. M. Changes in biomarkers of nutrient metabolism, inflammation, and oxidative stress in dairy cows during the transition into the early dry period. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 10, p. 9350–9359, 2018.

RADOGNA, F.; DIEDERICH, M.; GHIBELLI, L. Melatonin: A pleiotropic molecule regulating inflammation. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, n. 12, p. 1844–1852, 2010.

REITER, R. J.; CALVO, J. R.; KARBOWNIK, M.; QI, W.; TAN, D. X. Melatonin and Its Relation to the Immune System and Inflammation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 917, n. 1, p. 376–386, 2006.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; ROSALES-CORRAL, S.; GALANO, A.; ZHOU, X. J.; XU, B. Mitochondria: Central Organelles for Melatonin's Antioxidant and Anti-Aging Actions Russel. **Molecules**, v. 23, p. 1–25, 2018.

RILANTO, T.; VIIDU, D.; KAART, T.; ORRO, T.; VILTROP, A. Attitudes and personality of farm managers and association with cow culling rates and longevity in large-scale commercial dairy farms. **Research in Veterinary Science**, v. 142, p. 31–42, 2022.

- ROCHA, D. T. da; CARVALHO, G. R.; RESENDE, J. C. de. Cadeia produtiva do leite no Brasil : produção primária. **EMBRAPA**, v. 123, p. 16, 2020.
- RUPRECHTER, G.; ADRIEN, M. de L.; LARRIESTRA, A.; MEOTTI, O.; BATISTA, C.; MEIKLE, A.; NORO, M. Metabolic predictors of peri-partum diseases and their association with parity in dairy cows. **Research in Veterinary Science**, v. 118, n. February, p. 191–198, 2018.
- RUPRECHTER, G.; NORO, M.; MEOTTI, O.; BATISTA, C.; ADRIEN, M. de L.; BARCA, J.; MEIKLE, A. Endocrine and reproductive parameters in sick and healthy primiparous and multiparous dairy cows. **Theriogenology**, v. 141, p. 173–179, 2020.
- SAHAR, M. W.; BEAVER, A.; WEARY, D. M.; VON KEYSERLINGK, M. A. G. Feeding behavior and agonistic interactions at the feed bunk are associated with hyperketonemia and metritis diagnosis in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 1, p. 783–790, 2020.
- SHAPOVALOV, S.; MIKHAYLOV, S.; ANDREY, S.; CHERESHNEVA, Y.; TSOMARTOVA, D.; IVANOVA, M.; TSOMARTOVA, E.; SHAPOVALOVA, D.; PAVLOVA, M. Calf demand provision by mammary gland secretion during the first decade of post-natal development. **Heliyon**, v. 5, n. 10, p. e02676, out. 2019.
- SHELDON, I. M.; CRONIN, J. G.; BROMFIELD, J. J. Tolerance and Innate Immunity Shape the Development of Postpartum Uterine Disease and the Impact of Endometritis in Dairy Cattle. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 7, n. 1, p. 361–384, 15 fev. 2019.
- SHELDON, I. M.; DOBSON, H. Postpartum uterine health in cattle. v. 83, p. 295–306, 2004.
- SHELDON, I. M.; LEWIS, G. S.; LEBLANC, S.; GILBERT, R. O. Defining postpartum uterine disease in cattle. **Theriogenology**, v. 65, n. 8, p. 1516–1530, 2006.
- SHELDON, I. M.; PRICE, S. B.; CRONIN, J.; GILBERT, R. O.; GADSBY, J. E. Mechanisms of Infertility Associated with Clinical and Subclinical Endometritis in High Producing Dairy Cattle Pathogenesis of Endometritis. v. 44, p. 1–9, 2009.
- SHELDON, I. M.; WILLIAMS, E. J.; MILLER, A. N. A.; NASH, D. M.; HERATH, S. Uterine diseases in cattle after parturition. **Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 115–121, 2008.

- SHIN, I. S.; SHIN, N. R.; PARK, J. W.; JEON, C. M.; HONG, J. M.; KWON, O. K.; KIM, J. S.; LEE, I. C.; KIM, J. C.; OH, S. R.; AHN, K. S. Melatonin attenuates neutrophil inflammation and mucus secretion in cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary diseases via the suppression of Erk-Sp1 signaling. **Journal of Pineal Research**, v. 58, n. 1, p. 50–60, 2015.
- SILVA, T. H.; GUIMARAES, I.; MENTA, P. R.; FERNANDES, L.; PAIVA, D.; RIBEIRO, T. L.; CELESTINO, M. L.; NETTO, A. S.; BALLOU, M. A.; MACHADO, V. S. Effect of injectable trace mineral supplementation on peripheral polymorphonuclear leukocyte function, antioxidant enzymes, health, and performance in dairy cows in semi-arid conditions. **Journal of dairy science**, v. 105, n. 2, p. 1649–1660, fev. 2022.
- SORDILLO, L. M.; RAPHAEL, W. Significance of metabolic stress, lipid mobilization, and inflammation on transition cow disorders. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 29, n. 2, p. 267–278, 2013.
- SPAANS, O. K.; PHYN, C. V. C.; ROCHE, J. R.; HICKEY, A.; CROOKENDEN, M. A.; HEISER, A.; BURKE, C. R. Temporal profiles describing markers of inflammation and metabolism during the transition period of pasture-based , seasonal-calving dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 105, 2022.
- SURAI, P. F.; KOCHISH, I. I.; FISININ, V. I.; JUNIPER, D. T. Revisiting oxidative stress and the use of organic selenium in dairy cow nutrition. **Animals**, v. 9, n. 7, 2019.
- TAMURA, H.; JOZAKI, M.; TANABE, M.; SHIRAFUTA, Y.; MIHARA, Y. Importance of Melatonin in Assisted Reproductive Technology and Ovarian Aging. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, 2020a.
- TAMURA, H.; JOZAKI, M.; TANABE, M.; SHIRAFUTA, Y.; MIHARA, Y. Importance of Melatonin in Assisted Reproductive Technology and Ovarian Aging. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, 2020b.
- TAYLOR, J. P.; TSE, H. M. The role of NADPH oxidases in infectious and inflammatory diseases. **Redox Biology**, v. 48, p. 102159, 2021.
- WAGENER, K.; GABLER, C.; DRILLICH, M. A review of the ongoing discussion about de fi nition , diagnosis and pathomechanism of subclinical endometritis in dairy cows. **Theriogenology**, v. 94, p. 21–30, 2017.

WANG, M. L.; LIU, M. C.; XU, J.; AN, L. G.; WANG, J. F.; ZHU, Y. H. Uterine microbiota of dairy cows with clinical and subclinical endometritis. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. NOV, p. 1–11, 2018.

WANG, Z.; ZHANG, S.; XIAO, Y.; ZHANG, W.; WU, S.; QIN, T.; YUE, Y.; QIAN, W.; LI, L. NLRP3 Inflammasome and Inflammatory Diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, p. 1–11, 18 fev. 2020.

WANKHADE, P. R.; MANIMARAN, A.; KUMARESAN, A.; JEYAKUMAR, S.; RAMESHA, K. P.; SEJIAN, V.; RAJENDRAN, D.; VARGHESE, M. R. Metabolic and immunological changes in transition dairy cows: A review. **Veterinary World**, v. 10, n. 11, p. 1367–1377, 2017.

WU, H.; YAO, S.; WANG, T.; WANG, J.; REN, K.; YANG, H.; MA, W.; JI, P.; LU, Y.; MA, H.; HE, C.; WEI, W.; ZHANG, L.; LIU, G. Effects of Melatonin on Dairy Herd Improvement (DHI) of Holstein Cow with High SCS. **molecules**, v. 26, p. 1–11, 2021.

YANG, M.; SHI, J.; TIAN, J.; TAO, J.; CHAI, M.; WANG, J.; XU, Z.; SONG, Y.; ZHU, K.; JI, P.; LIU, G. Exogenous melatonin reduces somatic cell count of milk in Holstein cows. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 43280, 27 abr. 2017.

ZHANG, H. M.; ZHANG, Y. Melatonin: A well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. **Journal of Pineal Research**, v. 57, n. 2, p. 131–146, 2014.

ZHAO, H.; PANG, S. F.; POON, A. M. S. Variations of mt1 melatonin receptor density in the rat uterus during decidualization, the estrous cycle and in response to exogenous steroid treatment. **Journal of Pineal Research**, v. 33, n. 3, p. 140–145, 2002.

ZHAO, X. M.; WANG, N.; HAO, H. S.; LI, C. Y.; ZHAO, Y. H.; YAN, C. L.; WANG, H. Y.; DU, W. H.; WANG, D.; LIU, Y.; PANG, Y. W.; ZHU, H. Bin. Melatonin improves the fertilization capacity and developmental ability of bovine oocytes by regulating cytoplasmic maturation events. **Journal of Pineal Research**, v. 64, n. 1, p. 1–15, 2018.

6 ANEXO A – COMPROVANTE DO CEUA



*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito profilático da melatonina em vacas holandesas no período de transição e neonatos", protocolada sob o CEUA nº 8339120820 (ID 001205), sob a responsabilidade de **Rogério Ferreira e equipe; Amanda Vanzetto** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo 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 14/08/2020.

We certify that the proposal "Prophylactic effect of melatonin in Holstein cows in the transition period and neonates", utilizing 50 Bovines (50 females), protocol number CEUA 8339120820 (ID 001205), under the responsibility of **Rogério Ferreira and team; Amanda Vanzetto** - 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 08/14/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [09/2020](#) a [07/2021](#) Área: [Zootecnia](#)

Origem:	Animais de proprietários	sexo:	Fêmeas	idade:	3 a 7 anos	N:	50
Espécie:	Bovinos			Peso:	400 a 600 kg		
Linhagem:	Holandês						

Local do experimento: [no próprio confinamento \(compost barn\)](#)

Lages, 08 de janeiro de 2022

José Cristani
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina

Pedro Volkmer de Castilhos
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina