

Escola Superior São Francisco de Assis
Curso de Graduação em Medicina Veterinária

Paulo Henrique Puphal Küster

**PROTEÍNAS DE FASE AGUDA E SUA RELAÇÃO COM A INCLUSÃO
DE ÓLEOS NA ALIMENTAÇÃO DE NOVILHAS LEITEIRAS**

Santa Teresa

2021

Paulo Henrique Puphal Küster

PROTEÍNAS DE FASE AGUDA E SUA RELAÇÃO COM A INCLUSÃO DE ÓLEOS NA ALIMENTAÇÃO DE NOVILHAS LEITEIRAS

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Coordenação do curso de Medicina Veterinária da
Escola Superior São Francisco de Assis, como
requisito parcial para obtenção do título de
Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Me. Nélio Cunha Gonçalves.

Santa Teresa

2021

Paulo Henrique Puphal Küster

PROTEÍNAS DE FASE AGUDA E SUA RELAÇÃO COM A INCLUSÃO DE ÓLEOS NA ALIMENTAÇÃO DE NOVILHAS LEITEIRAS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do curso de Medicina Veterinária da Escola Superior São Francisco de Assis como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Aprovada em ____ de _____ de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Me. Nélio Cunha Gonçalves
Escola Superior São Francisco de Assis

Prof. Me. Leonardo Campos Almeida
Escola Superior São Francisco de Assis

Prof. Dr. Rodrigo Melo Meneses
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Tiago Facury Moreira
Universidade Federal de Minas Gerais

“O homem não é nada além daquilo que a educação faz dele”

- Immanuel Kant.

“É por isso que lutamos e trabalhamos muito, pois temos posto a nossa esperança no Deus vivo, que é o Salvador de todos, especialmente dos que creem”

- 1 Timóteo 4:10

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço ao meu Deus e Pai por cada dia vivido nos meus anos de graduação, sou grato pela proteção que me destes nessa caminhada, pelo sustento, amparo e pela realização deste sonho de criança. Toda honra e toda glória a Ti, Senhor.

Agradeço, com olhos marejados, à minha família. Ao meu pai, Gerônimo, e minha mãe, Eni, que abriram mão dos seus sonhos para permitir que eu vivesse o meu sonho. Sou eternamente grato pelo esforço de vocês e por todo o apoio nesta caminhada, que vem desde antes do meu entrar na faculdade. Tudo o que sou é fruto da excelente criação que me deram. Amo vocês!

A minha irmã Lara, por todo apoio, companhia e paciência.

A minha namorada Thaiany, que nunca deixou de me apoiar e sempre acreditou no meu sonho. Nunca vou me esquecer de todo suporte e auxílio nos tempos tranquilos e nos tempos difíceis da graduação. Tudo ficou mais fácil com você do meu lado. Você é incrível.

Ao meu orientador Prof. Nélio, por me acompanhar direta ou indiretamente desde o meu 2º período da graduação. Agradeço pelas oportunidades que me foram cedidas, pelo apoio nas pesquisas, pelas cobranças, por todo o conhecimento que me foi passado e, especialmente, pela amizade.

Aos meus professores, por todo o conhecimento transmitido, em especial ao Leonardo, Elisa, Ana Paula, Thaiz, Felipe e todos os demais que foram fundamentais para a minha formação e educação.

Aos colaboradores da ESFA, pelos momentos felizes que vivi ao lado de cada um de vocês durante a graduação, em especial à Conceição, Maria, Aurélio, Mayara, Admilson e Joaquim. Vocês foram fundamentais para a minha formação!

Aos meus colegas de graduação Cleiton, Silas, Lucas, Sabrina, Gabriela P., Gabriela Z., Júlia e demais, por me acompanharem nessa jornada.

Aos professores da banca avaliadora, pelo aceite e disponibilidade em me avaliar e me propor sugestões e melhorias.

A todos os que estiveram presentes em minha caminhada e auxiliaram para que este trabalho fosse realizado.

Muito obrigado!

RESUMO

Os bovinos estão sujeitos a uma variedade de processos patológicos, tanto de origem infecciosa, como de origem não infecciosa. Estes processos geram grandes perdas para a pecuária leiteira pois resultam em queda na produtividade e no bem-estar animal. Neste contexto, proteínas de fase aguda (PFA), em geral, têm suas concentrações séricas alteradas durante a ocorrência de estados patológicos diversos e, por esse motivo, podem ser usadas como biomarcadores do estado inflamatório. Desse modo, a presente pesquisa buscou evidenciar os efeitos da inclusão dos óleos de algodão, girassol e soja, frente as concentrações séricas das PFA, a fim de avaliar se esta inclusão na alimentação de novilhas exercerá ação sobre o estado inflamatório dos animais. Foram selecionadas 16 novilhas mestiças. Estas, foram alocadas em 4 grupos: grupo controle, grupo alimentado com óleo de algodão, grupo alimentado com óleo de girassol e grupo alimentado com óleo de soja, todos os óleos incluídos a 4% da matéria seca da dieta. Os resultados observados no presente trabalho evidenciam que a inclusão de óleos na dieta de novilhas leiteiras pode influenciar o estado inflamatório, uma vez que se reduziram as concentrações de ceruloplasmina, principalmente quando se consideram as dietas em que foram incluídos óleos de girassol e soja. Esta inclusão de óleos ainda proporcionou um aumento das concentrações de apolipoproteína A4 e uma diminuição dos níveis de transferrina, ao fim do experimento.

Palavras-chave: ceruloplasmina; apolipoproteína A4; estado inflamatório; nutrição de ruminantes.

ABSTRACT

Bovines are subject to a variety of pathological processes, both of infectious origin and non-infectious origin. These processes generate great losses for dairy farming as they result in a drop in productivity and animal welfare. In this context, acute phase proteins (APP), in general, have their serum concentrations altered during the occurrence of different pathological states and, therefore, can be used as biomarkers of the inflammatory state. Thus, this research aimed to evidence the effects of including cottonseed, sunflower and soybean oils, against the serum concentrations of APP, in order to assess whether this inclusion in the diet of heifers will exert an effect on the inflammatory state of the animals. Sixteen crossbred heifers were selected. These were divided into 4 groups: control group, group fed with cottonseed oil, group fed with sunflower oil and group fed with soybean oil, all oils included at 4% of the diet's dry matter. The results observed in this study show that the inclusion of oils in the diet of dairy heifers can influence the inflammatory state, once ceruloplasmin concentrations were reduced, especially when considering the diets in which sunflower and soybean oils were included. This inclusion of oils also provided an increase in apolipoprotein A4 concentrations and a decrease in transferrin levels at the end of the experiment.

Keywords: ceruloplasmin; apolipoprotein A4; inflammatory state; ruminant nutrition.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Produção de leite de vaca no Brasil de 1970 a 2017.	17
Figura 2 - Síntese das Proteínas de Fase Aguda.	21
Figura 3 - Estrutura da Imunoglobulina G evidenciando as cadeias leves (amarelas) e pesadas (verdes), aos pares.	26
Figura 4 - Bezerras utilizadas em suas respectivas baias.	32
Figura 5 - Contenção das novilhas e colheita de sangue na veia coccígea.....	39
Figura 6 - Analisador bioquímico Cobas Mira Plus®.	40
Figura 7 - Cuba para eletroforese acoplada a fonte de energia.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição nutricional dos ingredientes da dieta basal.	33
Tabela 2 - Níveis de garantia por quilograma do suplemento mineral-vitamínico NC Bovilac 50, Master Alimentos®¹	34
Tabela 3 - Níveis de garantia por quilograma da mistura mineral Mineralalpha 75, Alpha Nutrição Animal®¹	35
Tabela 4 - Composição nutricional (porção de 13 mL ou 1 colher de sopa) dos óleos que serão utilizados¹	36
Tabela 5 - Composição em ácidos graxos (% em peso, do total de ácidos graxos)¹ e preço de aquisição no varejo dos óleos de algodão, girassol e soja (R\$/900mL)². ...	37
Tabela 6 - Composição percentual das dietas experimentais nos quatro tratamentos (T1 a T4).....	38
Tabela 7 - Quadro de Análise de Variância (ANOVA):.....	43
Tabela 8 - Médias, seguidas dos valores de erro padrão* entre parênteses, para a concentração sérica de albumina (mg/dL), em dietas com ou sem inclusão de óleos em três tempos de coleta.	45
Tabela 9 - Médias, seguidas dos valores de erro padrão entre parênteses, para a concentração sérica de transferrina (mg/dL), em dietas com ou sem inclusão de óleos em três tempos de coleta.	47
Tabela 10 - Médias, seguidas dos valores de erro padrão entre parênteses, para a concentração sérica de haptoglobina (mg/dL), em dietas com ou sem inclusão de óleos em três tempos de coleta.....	48
Tabela 11 - Médias, seguidas dos valores de erro padrão entre parênteses, para a concentração sérica de α_1 -glicoproteína ácida (mg/dL), em dietas com ou sem inclusão de óleos em três tempos de coleta.....	50
Tabela 12 - Médias, seguidas dos valores de erro padrão entre parênteses, para a concentração sérica de ceruloplasmina (mg/dL), em dietas com ou sem inclusão de óleos em três tempos de coleta.....	51
Tabela 13 - Médias, seguidas dos valores de erro padrão entre parênteses, para a concentração sérica de apolipoproteína A1 (mg/dL), em dietas com ou sem inclusão de óleos em três tempos de coleta.....	53

Tabela 14 - Médias, seguidas dos valores de erro padrão entre parênteses, para a concentração sérica de apolipoproteína A4 (mg/dL), em dietas com ou sem inclusão de óleos em três tempos de coleta.....	54
Tabela 15 - Médias, seguidas dos valores de erro padrão entre parênteses, para a concentração sérica de α 2-macroglobulina (mg/dL), em dietas com ou sem inclusão de óleos em três tempos de coleta.....	56
Tabela 16 - Médias, seguidas dos valores de erro padrão entre parênteses, para a concentração sérica de IgG de cadeia leve (mg/dL), em dietas com ou sem inclusão de óleos em três tempos de coleta.....	57
Tabela 17 - Médias, seguidas dos valores de erro padrão entre parênteses, para a concentração sérica de IgG de cadeia pesada (mg/dL), em dietas com ou sem inclusão de óleos em três tempos de coleta.....	58

LISTA DE SIGLAS

AG	Ácido Graxo
AGCL	Ácido Graxo de Cadeia Longa
ANOVA	Análise de Variância
BEN	Balanço Energético Negativo
BSA	Albumina Sérica Bovina
C3	Fator 3 do Complemento
C4	Fator 4 do Complemento
CCS	Contagem de Células Somáticas
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CLA	Ácido Linoleico Conjugado
DHA	Docosa-Hexaenóico
DIR	Dentro do Intervalo de Referência
DP	Desvio Padrão
ECC	Escore de condição corporal
ED	Energia Digestível
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EE	Extrato Etéreo
EL	Energia Líquida
EM	Energia Metabolizável
EP	Erro Padrão
EPA	Eicosapentaenóico
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FDA	Fibra em Detergente Ácido
FDN	Fibra em Detergente Neutro
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
MS	Matéria Seca

MM	Matérial Mineral
NDT	Nutrientes Digestíveis Totais
nPFA	Proteína de Fase Aguda Negativa
NUBIOMOL	Núcleo de Análises de Biomoléculas
PB	Proteína Bruta
PBS	Tampão-Fosfato
PFA	Proteínas de Fase Aguda
pPFA	Proteína de Fase Aguda Positiva
PPT	Proteína Plasmática Total
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFRPE	Universidade Federal Rural do Pernambuco
UFV	Universidade Federal de Viçosa
VBC	Corante Verde de Bromocresol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 BOVINOCULTURA LEITERA.....	17
2.2 NUTRIÇÃO ANIMAL.....	18
2.3 ESTADO INFLAMATÓRIO	20
2.3.1 AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO PLASMA E SORO SANGUÍNEO	21
2.3.2 PROTEÍNAS DE FASE AGUDA.....	23
2.4 ELETROFORESE E MENSURAÇÃO DE PROTEÍNAS DE FASE AGUDA	27
3 JUSTIFICATIVA.....	29
4 OBJETIVOS	30
4.1 GERAL	30
4.2 ESPECÍFICOS	30
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	31
5.2 METODOLOGIA DE OBTENÇÃO DE DADOS	31
5.2.1 LOCAÇÕES.....	31
5.2.2 ANIMAIS.....	31
5.2.3 INSTALAÇÕES	32
5.2.4 DIETA BASAL	33

5.2.5 TRATAMENTOS	35
5.2.6 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE SANGUE	39
5.2.7 ANÁLISE DE ALBUMINA	40
5.2.8 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS DE FASE AGUDA	41
5.3 METODOLOGIA DE ANÁLISE DE DADOS	43
5.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	43
5.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	44
5.6 BENEFÍCIOS	44
5.7 RISCOS	44
5.8 ASPECTOS ÉTICOS	44
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
REFERÊNCIAS	61
ANEXO 1	67

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o Censo Agropecuário de 2017, o rebanho bovino brasileiro já supera a marca de 172 milhões de cabeças, com um número que ultrapassa 11,5 milhões de vacas ordenhadas (IBGE, 2019). Considerada uma importante fonte de renda para milhares de famílias brasileiras, a cadeia produtiva de leite exerce um papel fundamental na economia do país, uma vez que emprega desde os setores envolvidos no manejo dos animais, até aqueles que atuam na indústria de alimentos (ROCHA; CARVALHO; RESENDE, 2020).

Contudo, a produção de leite ainda enfrenta desafios relacionados a saúde e ao bem-estar animal. Os períodos de transição e lactação são considerados uns dos mais desafiadores para vacas leiteiras, pois estes animais tendem a desenvolver um balanço energético negativo (BEN), que leva a uma considerável diminuição do escore de condição corporal e torna o início de lactação desafiador (ELBAZ et al., 2019; LOCK; SOUZA, 2018; WELTER, 2015).

Autores mostram que a presença de determinados ácidos graxos na dieta de vacas leiteiras tem potencial de minimizar o estado inflamatório, bem como de aumentar a densidade energética da dieta (ABOLGHASEMI et al., 2019; ELBAZ et al., 2019; LOCK; SOUZA, 2018). Os ácidos graxos araquidônico e eicosapentaenoico, sintetizados a partir de ácidos linoleico e linolênico, são precursores de prostaglandinas, tromboxanas e leucotrienos, compostos estes que possuem funções fisiológicas e regulatórias importantes, inclusive relacionadas aos processos inflamatórios (PALMQUIST; MATTOS, 2011).

Entretanto, a inclusão de lipídeos na dieta deve ser realizada de forma controlada, uma vez que ela pode ser danosa para os microrganismos ruminais (KOZLOSKI, 2002; PALMQUIST; MATTOS, 2011). Montagner et al. (2017) afirmam em seu trabalho que a avaliação das concentrações das proteínas de fase aguda (PFA) se faz importante neste período de transição, uma vez que auxiliam na avaliação do quadro clínico.

A presente pesquisa busca avaliar os efeitos da adição dos óleos de algodão, girassol e soja, frente as concentrações séricas das PFA, no intuito de avaliar se esta inclusão na alimentação de bovinos exercerá uma ação sobre o estado inflamatório dos animais.

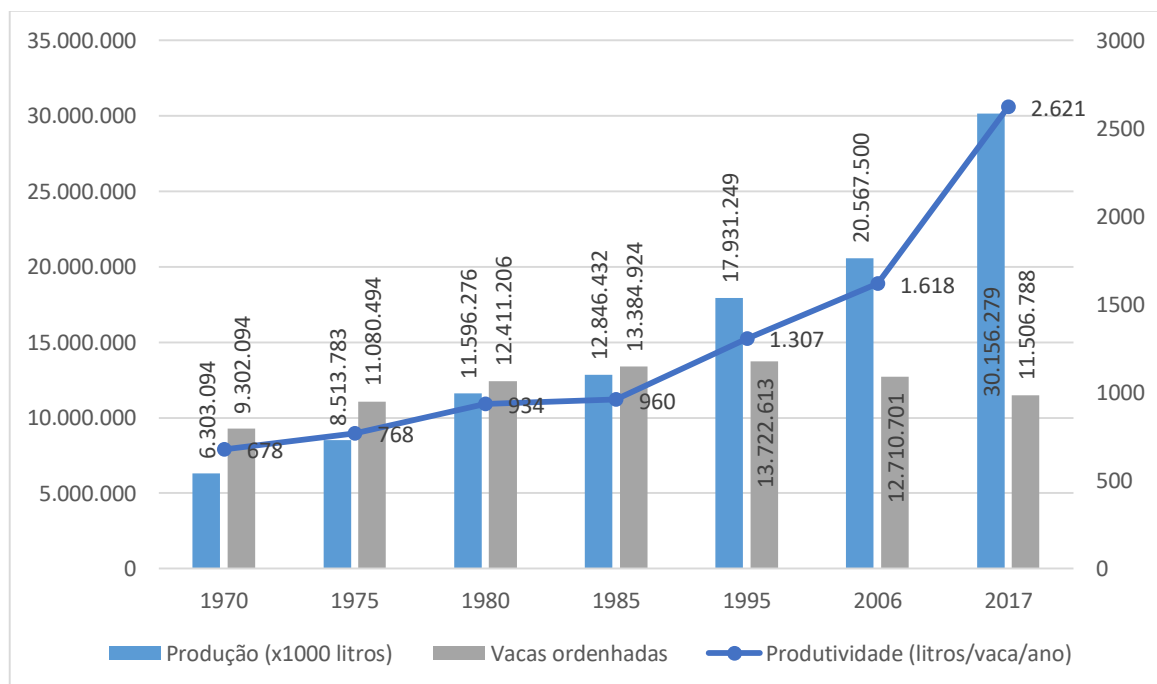
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BOVINOCULTURA LEITERA

Uma das principais atividades econômicas do Brasil é a bovinocultura. Destaca-se, dentro da produção de bovinos, a cadeia produtiva de leite e derivados, a qual é considerada uma importante fonte de renda e empregos para milhões de brasileiros. O Brasil é considerado o terceiro maior produtor de leite do mundo, e está apenas atrás dos Estados Unidos e da Índia, com o Estado de Minas Gerais sendo considerado, historicamente, o maior produtor de leite do país (ROCHA; CARVALHO; RESENDE, 2020).

A produção leiteira no Brasil tem crescido constantemente a cada década e, de acordo com o Censo Agropecuário de 2017, ultrapassou a marca de 30 bilhões de litros produzidos (Figura 1). Os dados ainda apontam uma redução do número de vacas ordenhadas, apesar do aumento da produção, comparando com resultados obtidos no Censo Agropecuário de 2006, o que indica um aumento de produtividade do rebanho nacional, totalizando 2621 litros por ano (IBGE, 2019).

Figura 1 - Produção de leite de vaca no Brasil de 1970 a 2017.



Fonte: Adaptado de IBGE, 2019.

De acordo com a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), a produção de leite brasileira e mundial aumentou em 2020 (FAO, 2021). Apesar de obter bons resultados quanto aos índices de produção leiteira por vaca a cada ano, esses dados ainda são considerados bem inferiores quando comparados a outros países, o que indica que o Brasil possui um grande potencial para ser explorado na cadeia produtiva de leite (ROCHA; CARVALHO; RESENDE, 2020).

Alguns dos principais desafios pertinentes à produção de leite estão relacionados ao conforto e bem-estar dos animais, ao atendimento das exigências nutricionais, a correta estruturação do rebanho, a reprodução, a persistência de produção leiteira elevada, a um bom melhoramento genético e a um manejo adequado de patologias (CAMARGO, 2018). A qualidade do leite produzido geralmente é aferida pelos órgãos governamentais e pela indústria leiteira por meio de testes que buscam avaliar as condições físico-químicas, a qualidade microbiológica, além da avaliação dos níveis de células somáticas (ARAÚJO, 2012).

Como ferramenta de auxílio à bovinocultura leiteira, a contagem de células somáticas (CCS) é uma importante ferramenta para determinar a qualidade do leite cru, uma vez que está relacionada a detecção de mastite subclínica no rebanho. Estas células podem ser provenientes da descamação do epitélio mamário ou ainda leucócitos que se destinam a região dos tetos por conta do desenvolvimento de processos infecciosos e/ou inflamatórios. Esta avaliação é importante economicamente pois o aumento de CCS pode desencadear grandes perdas econômicas associadas ao descarte do leite, bem como afetar o bem-estar animal de vacas acometidas pela mastite (ACOSTA et al., 2016; ARAÚJO, 2012; SANTOS; NASCIMENTO; EDWARDS, 2016).

2.2 NUTRIÇÃO ANIMAL

Os animais possuem exigências específicas de ácidos graxos (AG) essenciais, uma vez que estão na forma de componentes de membranas celulares e como precursores de moléculas regulatórias como, por exemplo, prostaglandinas. Os AG são exigidos para que se tenha um adequado funcionamento do metabolismo (PALMQUIST; MATTOS, 2011).

Os AG araquidônico (20:4 n-6) e eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3) são sintetizados a partir dos ácidos linoleico (18:2 n-6) e linolênico (18:3 n-3), respectivamente. O ácido araquidônico e o EPA são precursores de compostos eicosanoides que possuem funções fisiológicas e regulatórias importantes, são estes: prostaglandinas, tromboxanas e leucotrienos (PALMQUIST; MATTOS, 2011).

Inicialmente, a inclusão de lipídeos na alimentação de vacas leiteiras, possuía apenas o objetivo de aumentar a densidade energética da dieta, a fim de evitar a redução do escore corporal no período pós-parto e melhorar a taxa de prenhes e de produção de leite (VALADARES FILHO; PINA, 2011; WELTER, 2015). Entretanto, a inclusão de lipídeos na dieta desses animais já apresenta ter mais funcionalidades, a exemplo do fornecimento para vacas em quaisquer estágios de lactação no intuito de melhorar a qualidade do leite, especialmente para animais sujeitos a um balanço energético negativo (BEN), no pós-parto imediato (LOCK; SOUZA, 2018; WELTER, 2015).

Apesar dos benefícios, a inclusão em excesso de lipídeos na dieta pode vir a reduzir a fermentação ruminal e o desenvolvimento da microbiota nesse órgão. Essa redução pode ocorrer por conta da interação dos lipídios com as fibras, impedindo a aderência das bactérias ruminais e o acesso das enzimas fibrolíticas ao alimento e também pela característica dos ácidos graxos insaturados terem tendência a ter ação tóxica sobre as células bacterianas (KOZLOSKI, 2002). Além disso, a gordura é considerada um potente estimulante de colecistoquinina (CCK), peptídeo este que está relacionado com a sensação de saciedade. Pode ser então que o fornecimento de dietas ricas em gordura tenha potencial regulador de consumo, uma vez que os níveis plasmáticos de CCK tendem a aumentar (SILVA, 2011).

Se faz necessário lembrar que os microrganismos ruminais possuem um “mecanismo de defesa” denominado bio-hidrogenação, responsável por converter AG insaturados em saturados, os quais são menos tóxicos. Após isso, esses AG ainda podem reagir com íons de cálcio ruminais, formando sabões insolúveis e atóxicos (PALMQUIST; MATTOS, 2011).

Ressalta-se ainda que o valor energético de uma fonte lipídica tende a ser afetado pela sua digestibilidade, pois, para as fontes lipídicas, a energia digestível (ED) é semelhante à energia metabolizável (EM). Logo, uma fonte lipídica ideal é aquela em

que se tem uma mínima interferência sobre a fermentação ruminal e uma alta digestibilidade no intestino delgado. O efeito mais sólido da inclusão de lipídeos na dieta está relacionado a diminuição das concentrações ruminais de amônia. Pode-se ainda aumentar os níveis de propionato e reduzir a metanogênese (VALADARES FILHO; PINA, 2011).

Em geral, os ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) possuem uma certa toxicidade para bactérias gram-positivas, mas acabam por não afetar as bactérias gram-negativas ruminais. Ainda, AG insaturados com 18 átomos de carbono são considerados potentes inibidores de bactérias metanogênicas. Portanto, se faz necessário entender que o uso de lipídeos na dieta de ruminantes tem um certo potencial de causar redução de digestibilidade das fibras, entretanto possui efeitos benéficos como a redução da metanogênese e das concentrações de amônia, bem como aumento dos níveis de propionato (VALADARES FILHO; PINA, 2011).

2.3 ESTADO INFLAMATÓRIO

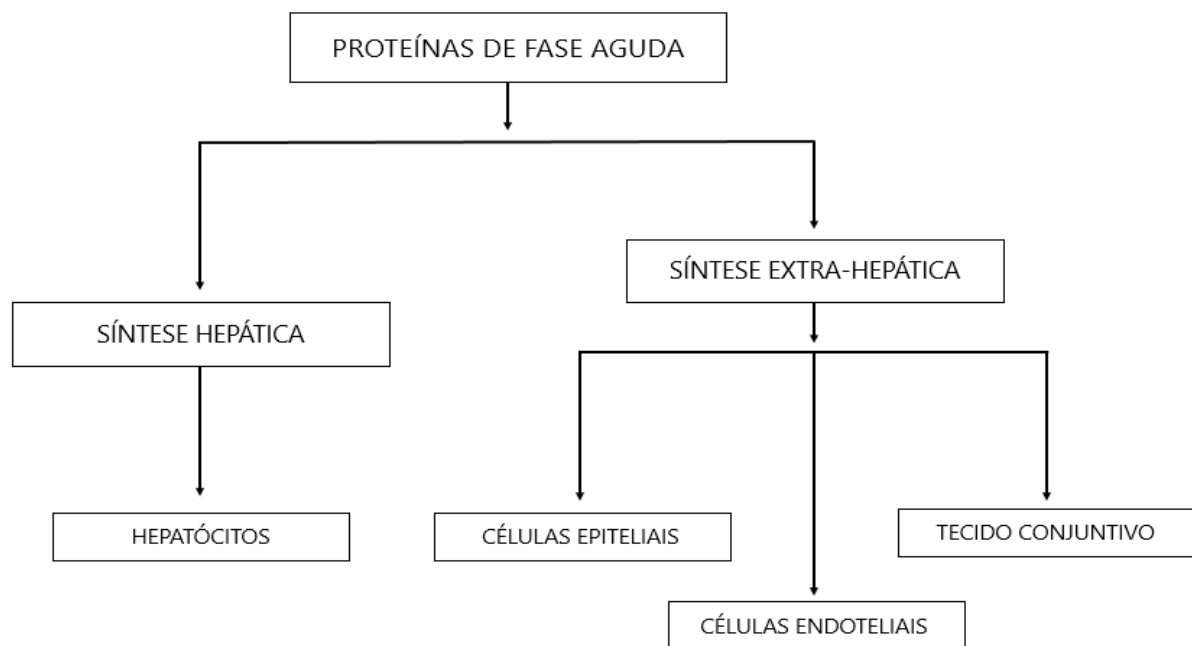
Do ponto de vista metabólico, o período de lactação é um dos mais críticos para vacas leiteiras de alta produção. A avaliação das fêmeas na fase do peri-parto é importante pois, nesse período, tendem a desenvolver muitas alterações metabólicas e fisiológicas, como a inflamação (PICCIONE et al., 2012; TANAKA et al., 2011). Nesse contexto, o fígado é um dos principais órgãos que executa funções importantes na adaptação metabólica na fase do peri-parto (VAN DORLAND et al., 2009).

A inflamação é considerada um evento importante para o organismo dos animais, uma vez que permite a sobrevivência do indivíduo em situações atípicas, de modo que se obtenha a homeostase no local da lesão (TIZARD, 2014). Quando ocorre uma resposta fisiológica a alguma lesão ou infecção, uma inflamação local é envolvida e tem-se o início de uma sequência de eventos que levarão ao começo de uma resposta sistêmica, denominada resposta de fase aguda. Por sua vez, esta resposta pode levar a modificações qualitativas e quantitativas no perfil de proteínas presentes no sangue, com destaque para as proteínas de fase aguda (PFA) (CECILIANI et al., 2012).

As PFA têm potencial de atuar em diversos aspectos da resposta sistêmica à inflamação. Estas proteínas são produzidas no fígado e em tecidos periféricos do

corpo, como linfonodos e baço, sob influência da IL-1, da TNF- α e da IL-6 (Figura 2). As PFA podem ter suas concentrações sanguíneas aumentadas ou diminuídas, a depender da sua classificação, e podem ser utilizadas como biomarcadores de patologias em ruminantes (CECILIANI et al., 2012; PETERSEN; NIELSEN; HEEGAARD, 2004; STOCKHAM; SCOTT, 2011; TIZARD, 2014).

Figura 2 - Síntese das Proteínas de Fase Aguda.



Fonte: Adaptado de JAIN et al., 2011.

2.3.1 AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO PLASMA E SORO SANGUÍNEO

Se faz comum a avaliação dos níveis plasmáticos e séricos de proteínas nos animais domésticos. Essa avaliação é proposta com o fim de se detectar possíveis alterações nas suas concentrações no tecido sanguíneo, em geral, de forma secundária a ocorrência de algumas doenças. Em determinadas patologias, a alteração dos níveis proteicos pode ser o único achado anormal. A aferição de níveis proteicos específicos regularmente apresenta informações importantes acerca do caso presente, encurta a lista de diagnósticos diferenciais e indica a presença de uma patologia específica (ALISSON, 2015).

São encontrados dois principais tipos de proteínas no plasma: albumina e globulinas. A albumina é a mais abundante e uma das menores destas proteínas. No plasma vascular, ela é responsável por, aproximadamente, 75% da pressão oncótica. Sintetizada pelo fígado, a albumina alcança a corrente sanguínea e tem como uma de suas importantes funções, transportar AG livres, cálcio, ácidos biliares, hormônios e medicamentos, com uma meia-vida plasmática de mais ou menos 2 a 3 semanas em bovinos (ALISSON, 2015; STOCKHAM; SCOTT, 2011).

As globulinas pertencem a um grupo heterogêneo de proteínas, com tamanhos bem variáveis. Centenas de tipos de globulinas estão presentes no plasma, entre elas estão as proteínas do sistema complemento, fatores de coagulação, imunoglobulinas (IgG, IgM, IgA, etc), enzimas diversas e diferentes proteínas transportadoras de vitaminas, hormônios, hemoglobina extracelular, íons metálicos e lipídios. A grande maioria das globulinas são produzidas no tecido hepático, com exceção das imunoglobulinas, que são sintetizadas nos tecidos linfoides. As globulinas podem ser classificadas em alfa globulinas, beta globulinas e gama globulinas, baseando-se em suas mobilidades eletroforéticas (ALISSON, 2015; STOCKHAM; SCOTT, 2011).

Como exemplos de constituintes da fração de alfa globulinas, cita-se a α_1 -glicoproteína ácida, ceruloplasmina (transporta cobre), haptoglobina (transporta hemoglobina) e a amiloide sérica A, dentre outras. Para a fração de beta globulinas, tem-se a transferrina (transporta ferro), componentes do sistema complemento (C3 e C4) e fibrinogênio, dentre outras. A fração de gama globulinas é formada, principalmente, por imunoglobulinas (ALISSON, 2015).

As análises bioquímicas das proteínas podem ser realizadas tanto com amostras de plasma, como com amostras de soro. Denomina-se plasma a parte líquida da amostra de sangue centrifugada, colhida em tubo que contenha anticoagulante. Já o soro pode ser entendido como a parte líquida de uma amostra sanguínea coagulada, que possui as mesmas características do plasma, mas é desprovido da presença de fibrinogênio e outras proteínas da coagulação. A escolha da melhor amostra dependerá de qual concentração proteica que se busca (ALISSON, 2015; STOCKHAM; SCOTT, 2011).

A concentração de albumina, em geral, é mensurada por meio de espectrofotometria, a partir de métodos colorimétricos que utilizam o corante verde de bromocresol (VBC). Entretanto, o VBC não é específico para albumina e pode ser que este se ligue a algumas globulinas, superestimando os valores de albumina quando estes estão muito baixos ($< 1\text{g/dL}$). A qualidade da ligação do VBC à albumina dependerá da concentração da mesma na amostra. Esta capacidade de ligação também irá depender da espécie analisada, uma vez que, por exemplo, a ligação do VBC à albumina bovina é bem mais forte que a que ocorre com amostras caninas ou felinas (ALISSON, 2015; STOCKHAM; SCOTT, 2011).

Uma das formas de se determinar as concentrações das globulinas é o método de eletroforese de proteínas séricas. A distribuição eletroforética de proteínas será possível com a aplicação de uma pequena quantidade da amostra de soro na extremidade da matriz do gel a ser utilizado na eletroforese. Após isso, se aplica uma corrente elétrica que permitirá uma migração das proteínas do soro em taxas que dependerão da carga e do tamanho de cada proteína (ALISSON, 2015; STOCKHAM; SCOTT, 2011).

O gel é corado e várias frações proteicas podem ser vistas, detectadas por um densitômetro. São calculadas as concentrações de cada fração proteica, a partir da concentração de proteínas totais da amostra. Isso permitirá uma separação das globulinas em várias frações, como alfa globulinas, beta globulinas e gama globulinas (ALISSON, 2015; STOCKHAM; SCOTT, 2011).

É comum que se observe alterações nas concentrações proteicas no sangue, que podem estar relacionadas ao aumento ou diminuição de certas proteínas. Estas alterações estão relacionadas a anormalidades nos níveis de albumina e/ou globulinas, de modo que a interpretação de alterações nos teores de proteínas dependerá de qual é a principal proteína da amostra que se encontra alterada (ALISSON, 2015).

2.3.2 PROTEÍNAS DE FASE AGUDA

Durante uma resposta sistêmica a um processo inflamatório, as concentrações plasmáticas de muitas proteínas tendem a se alterar de forma significativa. Em sua

maioria, estas proteínas são denominadas proteínas de fase aguda (PFA). Existem três principais grupos proteicos que têm suas concentrações alteradas em decorrência da inflamação: as proteínas de fase aguda positivas (pPFA), as proteínas de fase aguda negativas (nPFA) e as proteínas de resposta tardia (ALISSON, 2015; STOCKHAM; SCOTT, 2011).

Em geral, o aumento das concentrações de PFA no sangue não leva a um quadro de hiperproteinemia. A resposta aguda ao processo inflamatório acaba por levar a liberação de diversas citocinas no local da inflamação, como a interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Estas citocinas irão interferir na produção de PFA pelo fígado, de modo a aumentar ou diminuir suas concentrações (ALISSON, 2015).

As pPFA são proteínas que, diante de um processo inflamatório, sofrem um aumento de suas concentrações séricas ou plasmáticas. Esta elevação de suas concentrações se dá por conta do aumento da produção pelos hepatócitos após serem estimulados por citocinas, como a IL-6 e IL-1. Algumas destas proteínas, como a proteína C reativa e a amiloide sérica A, aumentam suas concentrações em menos de um dia após o início dos estímulos inflamatórios, já outras tendem a aumentar seus níveis séricos após dois dias do início do processo inflamatório. Algumas das principais pPFA e suas funções serão descritas a seguir (STOCKHAM; SCOTT, 2011; TIZARD, 2014).

A haptoglobina é a principal pPFA para bovinos (ECKERSALL; BELL, 2010; TIZARD, 2014). Esta, se liga a dímeros livres de hemoglobina presentes na circulação e, por consequência, indisponibiliza o ferro para microrganismos. A haptoglobina só está presente no soro de animais que apresentem alguma resposta de fase aguda cursante. Seus níveis se apresentam abaixo de 0,1 mg/dL em condições de normalidade e podem atingir ou superar esse número em alguns dias após o estímulo inflamatório (CECILIANI et al., 2012; PETERSEN; NIELSEN; HEEGAARD, 2004; STOCKHAM; SCOTT, 2011).

A α_1 -glicoproteína ácida é uma pPFA que possui diversas atividades anti-inflamatórias. Esta, pode atuar como uma proteína de transporte plasmático além de ter potencial imunomodulador na resposta inflamatória. Em ruminantes, ela está mais

relacionada a processos crônicos e apresenta uma resposta moderada, com concentrações que aumentam de forma lenta e que permanecem elevadas por mais tempo (CECILIANI et al., 2012; ECKERSALL; BELL, 2010; STOCKHAM; SCOTT, 2011).

A ceruloplasmina é uma pPFA que possui ação enzimática e antioxidante. Transporta cobre e auxilia na conversão de ferro da forma ferrosa em férrica para que seja transportado no plasma em associação com a transferrina. A ceruloplasmina ainda tem função importante nos processos de cicatrização e produção de colágeno (JAIN; GAUTAM; NASEEM, 2011; KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008; STOCKHAM; SCOTT, 2011). A α 2-macroglobulina é uma pPFA que apresenta uma resposta moderada e possui atividade antiprotease, de modo que inibe a atividade de enzimas proteolíticas que são liberadas pelas células inflamatórias durante um quadro de inflamação, o que reduz danos aos tecidos adjacentes (ECKERSALL, 2008).

A apolipoproteína A1 e a apolipoproteína A4 são componentes da lipoproteína de alta densidade (HDL). O HDL desenvolve um importante papel no transporte do colesterol, uma vez que este remove o excesso desta molécula das células periféricas e leva ao fígado para seu catabolismo. Em condições normais, ainda pode desempenhar um papel antioxidante, anti-inflamatório e anti-infeccioso. Entende-se então que os efeitos benéficos do HDL são altamente dependentes da apolipoproteína A1 e da apolipoproteína A4, que individualmente ainda possuem atuações bem amplas no organismo (FIELDING; FIELDING, 1995; KIM et al., 2013; RYE; BARTER, 2008).

As nPFA são proteínas que, durante um processo inflamatório, sofrem diminuição das suas concentrações séricas ou plasmáticas. As suas concentrações tendem a diminuir em decorrência da sua baixa produção pelos hepatócitos, estimulados por citocinas como IL-1 e IL-6. A albumina e a transferrina são os principais exemplos de nPFA (ALISSON, 2015; STOCKHAM; SCOTT, 2011; TIZARD, 2014).

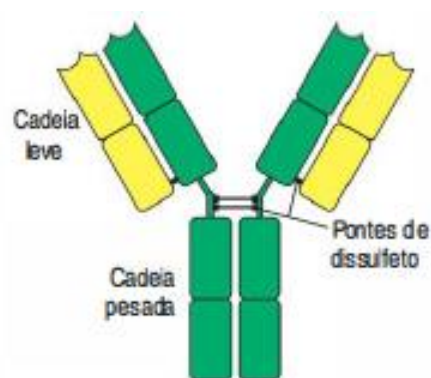
A albumina é considerada a principal proteína envolvida no funcionamento da pressão coloidosmótica, bem como, atua como fonte de aminoácidos e transporta diversas substâncias, como cátions e drogas. A interpretação da sua diminuição como nPFA é relativamente difícil, uma vez que esta pode estar relacionada a sua síntese, consumo

ou destruição. Em geral, sua diminuição como nPFA apresenta-se de forma gradual e é mais perceptível em quadros crônicos. A transferrina é considerada a principal proteína de transporte de ferro e suas concentrações tendem a diminuir quando há um quadro inflamatório em curso. Em situações que ocorram deficiência de ferro, pode haver um aumento de suas concentrações (ECKERSALL, 2008; STOCKHAM; SCOTT, 2011).

As proteínas de resposta tardia são aquelas cujas concentrações séricas ou plasmáticas se alteram a partir de uma a três semanas após o início do quadro inflamatório. As principais proteínas de resposta tardia são as imunoglobulinas e as proteínas do complemento. Produzidas pelos linfócitos B, as imunoglobulinas são classificadas por suas cadeias pesadas, como, por exemplo: IgG, IgA, IgE e IgM (STOCKHAM; SCOTT, 2011).

A IgG é a classe de imunoglobulina que está em maior concentração no soro. São responsáveis por desempenhar a resposta humoral do organismo, apresentadas em duas subunidades: IgG de cadeia leve, com peso molecular de 25 kDa, e a IgG de cadeia pesada, com 50 kDa de peso molecular (Figura 3). Algumas de suas funções estão relacionadas a opsonização de microrganismos, a fixação do sistema complemento e a aglutinação de bactérias (GERSHWIN, 2008; MURPHY, 2014).

Figura 3 - Estrutura da Imunoglobulina G evidenciando as cadeias leves (amarelas) e pesadas (verdes), aos pares.



Fonte: Adaptado de Murphy, 2014.

2.4 ELETROFORESE E MENSURAÇÃO DE PROTEÍNAS DE FASE AGUDA

Há algum tempo, tem crescido como uma ferramenta de diagnóstico laboratorial para pacientes veterinários, a classificação das proteínas do soro. O perfil destas proteínas é definido, em sua maioria, por meio do uso da eletroforese de proteínas séricas. De modo geral, a eletroforese é utilizada para separar macromoléculas de misturas complexas a partir da aplicação de um campo elétrico. Estas moléculas, com destaque às proteínas, irão se deslocar em velocidades diferentes, a depender das suas características próprias e das particularidades do gel utilizado (CERÓN; CALDIN; MARTINEZ-SUBIELA, 2010).

A presença de proteínas em concentrações anormais no sangue é denominada de disproteinemia. Essa condição está relacionada a ocorrência de uma hiperproteinemia ou a uma hipoproteinemia, estas que, por sua vez, podem ser classificadas em seletivas ou não seletivas. As seletivas remetem a uma situação em que as proteínas totais estão aumentadas ou diminuídas, mas algumas frações proteicas estão maiores ou menores do que outras. As não seletivas estão relacionadas a um quadro em que todas as frações proteicas estão, em conjunto, aumentadas ou diminuídas (STOCKHAM; SCOTT, 2011).

A fim de se categorizar uma disproteinemia como seletiva ou não seletiva, pode ser necessária a realização de uma eletroforese de proteínas séricas para avaliar os níveis relativos de determinados grupos de proteínas, em especial, as globulinas. As disproteinemias mais frequentes estão relacionados a quadros de desidratação (hemoconcentração) e durante a ocorrência de processos inflamatórios. Os três principais grupos de proteínas cujas concentrações plasmáticas se alteram em decorrência de um processo inflamatório são as pPFA, as nPFA e as proteínas de resposta tardia (STOCKHAM; SCOTT, 2011).

Vários tipos de eletroforese estão disponíveis, uma delas é a eletroforese em gel de poliacrilamida. Esta técnica separa mais frações de proteínas séricas do que com outras substâncias de suporte, o gel é transparente (o que permite uma análise por densitometria) e é considerado menos frágil que o gel de agarose, também comumente utilizado (CERÓN; CALDIN; MARTINEZ-SUBIELA, 2010).

Um sistema típico de eletroforese é composto, basicamente, por cinco componentes: (1) solução tampão; (2) dois eletrodos de platina ou carbono, cuja polaridade será determinada pelo modo que estes estarão ligados à fonte de energia; (3) sistema de eletroforese, onde a separação das proteínas ocorre; (4) uma cobertura, para minimizar a evaporação e proteger o sistema; e (5) uma fonte de energia (CERÓN; CALDIN; MARTINEZ-SUBIELA, 2010).

3 JUSTIFICATIVA

Diversos estudos demonstram o efeito advindo de ácidos graxos, especialmente da série n-3, sobre o estado inflamatório. De modo geral, ácidos graxos da série ômega 3 desempenham papel como precursores de sinalizadores anti-inflamatórios, com destaque para os ácidos graxos eicosapentaenóico (EPA) e docosa-hexaenóico (DHA). Os bovinos estão sujeitos à uma miríade de processos patológicos, tanto os de origem infecciosa, causados por vírus, bactérias ou outros microrganismos, como os de origem não infecciosa, como as desordens metabólicas comuns no peri-parto, relacionadas ao balanço energético negativo. Tais processos patológicos geram grandes perdas para a pecuária leiteira pois resultam em queda na produtividade e no bem-estar animal. Neste contexto, proteínas de fase aguda, como a haptoglobina, a ceruloplasmina, a transferrina, a glicoproteína ácida, a apolipoproteína A4, a apolipoproteína A1, entre outras, em geral têm sua concentração sérica alterada durante a ocorrência de estados patológicos diversos e, por esse motivo, podem ser usadas como biomarcadores do estado inflamatório (AKBAR et al., 2015; ALISSON, 2015; ELBAZ et al., 2019; MONTAGNER et al., 2017). Desse modo, a presente pesquisa busca evidenciar os efeitos da inclusão dos óleos de algodão, girassol e soja, frente as concentrações séricas das proteínas de fase aguda, a fim de avaliar se esta inclusão na alimentação de bovinos exercerá uma ação sobre o estado inflamatório dos animais.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Avaliar o efeito da inclusão de óleos na alimentação de bovinos sobre o estado inflamatório dos animais.

4.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da inclusão de diferentes tipos de óleo, com diferentes perfis de ácidos graxos, na alimentação de novilhas leiteiras sobre o estado inflamatório pela quantificação de proteínas de fase aguda no soro;
- Avaliar o efeito da inclusão dos óleos de algodão, girassol e soja sobre a concentração sérica das proteínas de fase aguda: albumina, ceruloplasmina, transferrina, glicoproteína ácida, apolipoproteína A4, apolipoproteína A1, alfa 2 macroglobulina, IgG de cadeia leve, IgG de cadeia pesada e haptoglobina.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente trabalho consiste de uma pesquisa experimental que objetivou avaliar o efeito da inclusão de óleos na alimentação de bovinos sobre o estado inflamatório dos animais. O estudo foi realizado com 16 novilhas leiteiras, as quais receberam dietas acrescidas de óleos vegetais (algodão, girassol e soja) a fim de se observar efeitos sobre a inflamação, por meio da avaliação de PFA. Por sua vez, essa avaliação ocorreu no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Escola de Veterinária, na Universidade Federal de Minas Gerais e no Laboratório de Pesquisa em Patologia Clínica, do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, campus Viçosa/MG.

5.2 METODOLOGIA DE OBTENÇÃO DE DADOS

5.2.1 LOCAÇÕES

A realização da fase de campo do estudo, com administração das dietas e colheita do material sanguíneo, ocorreu na Fazenda Experimental da Universidade Federal de Viçosa (UFV), campus Florestal/MG. Os procedimentos laboratoriais que envolveram análise de albumina foram realizados no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Escola de Veterinária, na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). As análises laboratoriais das PFA foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Patologia Clínica, do Departamento de Veterinária da UFV, campus Viçosa/MG. Por fim, as análises estatísticas foram realizadas no Departamento de Estatística e Informática da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), em Recife/PE.

5.2.2 ANIMAIS

Selecionou-se 16 bezerras mestiças (holandês-zebu), as quais pertenciam ao rebanho do Setor de Bovinocultura Leiteira da UFV, campus Florestal/MG, desmamadas 60 dias após o nascimento. As médias de idade e peso das bezerras são de $7,3 \pm 2,1$ meses e $250,67 \pm 26,44$ kg, respectivamente.

Os animais passaram por um período de 15 dias de adaptação à dieta base e às instalações. No primeiro dia da adaptação, foram vacinados (Poli-Star®, Vallée™, lote 11/19) com o fim de se promover uma prevenção ao Botulismo (tipos C e D), Carbúnculo Sintomático, Gangrena Gasosa, Enterotoxemia, Doença do Rim Polposo e Morte Súbita das Ruminantes. Na mesma data, os animais foram vermifugados com solução injetável a base de Doramectin a 1% (Dectomax®, Zoetis™) para a prevenção de parasitos gastrintestinais e pulmonares, além de ectoparasitos (mííases, bernes, carrapatos, piolhos, ácaros e moscas).

5.2.3 INSTALAÇÕES

As bezerras foram mantidas em confinamento, alojadas em 8 baias com área de 44,2m², aos pares. As dimensões das baias são: área coberta com 6m de comprimento, 3,3m de largura, 4m de pé direito em seu ponto mais alto, solário com 7,4m de comprimento e 3,3m de largura. A área coberta possuía telhas de cerâmica, piso de concreto, bebedouro automático de alvenaria, além de comedouros de alvenaria com três repartições (duas para alimentos e uma para suplementação mineral). A área desprovida de cobertura permitia aos animais um contato direto com o solo e promovia ventilação natural, por conta da circulação normal do ar (Figura 4).

Figura 4 - Bezerras utilizadas em suas respectivas baias.



Fonte: Arquivo pessoal.

5.2.4 DIETA BASAL

A dieta basal foi composta de silagem de milho e concentrado. Ambos os componentes foram produzidos no próprio setor de bovinocultura da UFV, campus Florestal/MG. O concentrado foi preparado em misturador automático MFW Máquinas® modelo MRO 500 Plus e era composto por fubá de milho, farelo de soja e suplemento vitamínico-mineral para mistura (NC Bovilac 50, Master Alimentos®). A composição nutricional dos ingredientes da dieta basal está exposta na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição nutricional dos ingredientes da dieta basal.

Item	Silagem de Milho	Fubá de Milho	Farelo de Soja	Suplemento Vit.-Min. ²
Matéria seca	30,7	88,0	89,0	95,0
Matéria mineral ¹	4,3	1,60	7,30	100,0
Proteína bruta ¹	7,0	10,0	49,0	0,0
Extrato etéreo ¹	2,3	4,3	1,5	0,0
Fibra det. neutro ¹	58,0	9,0	15,0	0,0
Fibra det. ácido ¹	33,0	3,0	10,0	0,0
Cálcio ¹	0,30	0,03	0,30	19,5
Fósforo ¹	0,19	0,30	0,68	5,0

¹porcentagem na matéria seca; ²NC Bovilac 50, Master Alimentos®

Em sua composição, o suplemento possui aditivo antioxidante (BHT), monensina, bicarbonato de sódio, calcário calcítico, cloreto de sódio, fosfato bicálcico, iodato de cálcio, monóxido de manganês, óxido de magnésio, óxido de zinco, selenito de sódio, sulfato de cobalto, sulfato de cobre, sulfato de ferro, vitamina A, vitamina D3, vitamina E e caulim. Conforme detalhado pelo fabricante, os níveis de garantia do suplemento vitamínico-mineral, que foi utilizado para o preparo do concentrado, estão expostos na Tabela 2.

Tabela 2 - Níveis de garantia por quilograma do suplemento mineral-vitamínico NC Bovilac 50, Master Alimentos®¹

Componente	Nível de garantia
Cálcio (Mín. / Máx)	195,0 g / 210,0 g
Cobre (Mín.)	557,5 mg
Cobalto (Mín.)	12,5 mg
Ferro (Mín.)	62,50 mg
Flúor (Máx.)	500 mg
Fósforo (Mín.)	50 g
Iodo (Mín.)	31,5 mg
Magnésio (Mín.)	43,0 g
Manganês (Mín.)	1.812,5 mg
Monensina (Mín.)	360,0 mg
Selênio (Mín.)	14,5 mg
Vitamina A (Mín.)	200.000 UI
Vitamina D3 (Mín.)	50.000 UI
Vitamina E (Mín.)	1.250 UI
Sódio (Mín.)	65,0 g
Zinco (Mín.)	2.125,0 mg
BHT (Mín.)	100,0 mg

¹dados informados pelo fabricante.

A silagem foi fornecida à vontade, duas vezes ao dia, às 8:00h e às 16:00h, juntamente com o concentrado, que era misturado no cocho no momento do fornecimento. Além do suplemento mineral que foi inserido no concentrado, conforme descrito anteriormente, outra mistura mineral de pronto uso (Mineralalpha 75, Alpha Nutrição Animal®) foi disponibilizada à vontade para as novilhas em cocho individual no interior de cada baia. A composição desta segunda mistura mineral é apresentada da seguinte forma: calcário calcítico, cloreto de sódio, fosfato bicálcico, enxofre ventilado, iodato de cálcio, óxido de magnésio, óxido de zinco, selenito de sódio, sulfato de cobalto, sulfato de cobre, sulfato de manganês, sulfato de ferro e cromo. Os níveis de garantia informados pelo fabricante desta mistura mineral estão expostos na Tabela 3.

Tabela 3 - Níveis de garantia por quilograma da mistura mineral Mineralalpha 75, Alpha Nutrição Animal®¹

Componente	Nível de garantia
Cálcio (Mín. / Máx)	135,0 g / 165,0 g
Cobre (Mín.)	1.500,0 mg
Cobalto (Mín.)	100 mg
Cromo (Mín.)	30,0 mg
Enxofre (Mín.)	26,0 g
Ferro (Mín.)	2.000,0 mg
Flúor (Máx.)	780,0 mg
Fósforo (Mín.)	78,0 g
Iodo (Mín.)	80,0 mg
Magnésio (Mín.)	20,0 g
Manganês (Mín.)	2.000 mg
Selênio (Mín.)	30,0 mg
Sódio (Mín.)	114,0 g
Zinco (Mín.)	5.000 mg

¹dados informados pelo fabricante.

5.2.5 TRATAMENTOS

Conforme descrito anteriormente, todas as bezerras passaram por um período de adaptação à dieta base e às instalações por 15 dias (dia -15 ao dia 0). Após sorteio, os animais foram alocados em quatro grupos, os quais receberam os tratamentos por 30 dias (dia 0 ao dia +30).

No dia 0, após a colheita das amostras de sangue, as 16 novilhas foram distribuídas aleatoriamente em quatro tratamentos: dieta basal sem inclusão de óleo (T1), dieta basal com inclusão de 4% de óleo de algodão (Flor de Algodão®, Icofort™) na matéria seca (T2); dieta basal com inclusão de 4% de óleo de girassol (Liza®, Cargill™) na matéria seca (T3); dieta basal com inclusão de 4% óleo de soja (Liza®, Cargill™) na matéria seca (T4).

De acordo com o fabricante do óleo de algodão, os seguintes ingredientes estão presentes na sua formulação: óleo vegetal refinado de semente de algodão, antioxidante TBHQ, ácido cítrico e antiespumante dimetilpolisiloxano. Já para o caso do óleo de soja, o fabricante informa que seu produto se trata de óleo 100% puro e refinado de soja geneticamente modificada (*Agrobacterium tumefaciens* e *Bacillus thuringiensis*). Para o óleo de girassol, o fabricante apresenta seu produto como o único ingrediente presente na embalagem. As composições nutricionais apresentadas pelos fabricantes dos óleos que foram utilizados estão expostas na Tabela 4.

Tabela 4 - Composição nutricional (porção de 13 mL ou 1 colher de sopa) dos óleos que serão utilizados¹

Parâmetro	Óleo de Algodão ²	Óleo de Girassol ³	Óleo de Soja ⁴
Valor energético	108 Kcal	108 Kcal	108 Kcal
Carboidratos	0 g	0 g	0 g
Proteínas	0 g	0 g	0 g
Gorduras totais	12 g	12 g	12 g
Gorduras saturadas	3,1 g	1,2 g	2,0 g
Gorduras trans	Não contém	Não contém	Não contém
Gorduras monoinsaturadas	2,3 g	Não informa	2,9 g
Gorduras poli-insaturadas	6,4 g	Não informa	7,1 g
Ácido linolênico	0,1 g	Não informa	Não informa
Ácido linoléico	6,3 g	Não informa	Não informa
Colesterol	0 g	Não informa	0 g
Fibra alimentar	0 g	0 g	0 g
Sódio	0 mg	0 g	0 g
Vitamina E	4,3 mg	4,8 mg	1,7 mg

¹dados informados no rótulo de cada frasco; ²Flor de Algodão®, Icofort™; ³Liza®, Cargill™; ⁴Liza®, Cargill™

Os óleos eram acrescentados ao concentrado apenas no momento do fornecimento, em recipiente individualizado para cada tipo de óleo. Misturava-se com auxílio de batedeira (M.K. Eletrodomésticos Mondial S.A., modelo Prática Black 350 W), em velocidade máxima por no mínimo 2 minutos, até a completa homogeneização. A escolha para que se realizasse a mistura do óleo ao concentrado apenas no momento de seu fornecimento foi determinada com o intuito de se evitar perdas na qualidade do material, em especial, decorrentes de processos de rancificação e também para garantir um fornecimento adequado de óleo diariamente aos animais.

Os critérios exigidos para a seleção dos óleos foram suas características qualitativas, quantitativas e de diversidade, no que se refere aos seus perfis de ácidos graxos. Com isso, buscou-se utilizar óleos que tivessem aplicabilidade na rotina dos criadores de bovinos, com ênfase no preço e na disponibilidade de mercado destes produtos, conforme exposto na Tabela 5.

Tabela 5 - Composição em ácidos graxos (% em peso, do total de ácidos graxos)¹ e preço de aquisição no varejo dos óleos de algodão, girassol e soja (R\$/900mL)².

Ácido graxo ³	Óleo de algodão	Óleo de girassol	Óleo de soja
14:0	0,80	0,08	0,20
16:0	20,13	8,36	11,35
18:0	3,10	5,03	4,15
20:0	0,20	0,43	0,15
22:0	0,00	0,00	0,00
Total de saturados	24,23	13,90	15,85
14:1	0,00	0,04	0,00
16:1	1,43	0,05	0,05
18:1	22,86	27,65	25,30
18:2	50,16	56,30	50,60
18:3	1,32	2,06	8,20
Total de insaturados	75,77	86,10	84,15
Preço	4,99	6,98	4,09

¹Adaptado de Fonseca & Gutierrez (1974). ²óleo de algodão, Flor de Algodão®, Icofort™; óleo de girassol, Liza®, Cargill™; óleo de soja Liza®, Cargill™. ³Número de átomos de carbono: número de duplas ligações.

Nos tratamentos que receberam óleos, as quantidades fornecidas de volumosos e concentrados foram ajustadas no intuito de se obter dietas isoprotéicas (14% de PB na MS) e isoenergéticas (71% de NDT na MS). A composição dos ingredientes presentes na dieta de forma percentual, foi calculada com base nas exigências nutricionais e na composição dos alimentos estabelecidas pelo NRC (2001), com o auxílio do software *Spartan Ration Evaluator/Balancer for Dairy Cattle*, Michigan State University (Tabela 6).

Tabela 6 - Composição percentual das dietas experimentais nos quatro tratamentos (T1 a T4).

Ingredientes	T1	T2	T3	T4
Silagem de milho	49,5 % da MS	65,5 % da MS	65,5 % da MS	65,5 % da MS
Fubá de milho	32,3 % da MS	9,2 % da MS	9,2 % da MS	9,2 % da MS
Farelo de soja	16,4 % da MS	18,7 % da MS	18,7 % da MS	18,7 % da MS
Sup. Mineral ¹	1,8 % da MS	2,4 % da MS	2,4 % da MS	2,4 % da MS
Óleo de algodão	-	4,2 % da MS	-	-
Óleo de girassol	-	-	4,2 % da MS	-
Óleo de soja	-	-	-	4,2 % da MS
PB (% na MS)	14,70	14,60	14,60	14,60
EL Manutença (Mcal/Kg MS)	1,66	1,67	1,67	1,67
EL Ganho (Mcal/Kg MS)	1,11	1,19	1,19	1,19
NDT (% na MS)	71,90	71,50	71,50	71,50
MS total (%)	45,8	39,8	39,8	39,8
FDA (% na MS)	18,90	23,80	23,80	23,80
FDN (% na MS)	34,10	41,60	41,60	41,60
EE (% na MS)	2,80	6,30	6,30	6,30
MM (% na MS)	5,70	6,80	6,80	6,80
Cálcio (% na MS)	0,56	0,73	0,73	0,73
Fósforo (% na MS)	0,40	0,40	0,40	0,40

¹ NC Bovilac 50, Master Alimentos®

5.2.6 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE SANGUE

As coletas das amostras de sangue foram realizadas em cada animal nos dias 0, +15 e +30, em relação ao início dos tratamentos. Os animais eram conduzidos por meio de corredores, das instalações em que ficavam alojadas até o local de contenção. A contenção foi realizada em equipamento de dupla função: balança eletrônica e tronco de contenção (Coimma®, modelo convencional).

Com os animais alocados no tronco de contenção, realizou-se a limpeza e antissepsia com álcool 70% da região ventral da base da cauda. Com punção da veia coccígea, um volume de sangue de 8mL foi colhido, com agulha estéril para coleta a vácuo 25x0,8 mm (*Shandong Weigao Group Medical Polymer Co., Ltd., China*), o qual era alocado em tubos com ativador de coágulo, de tampa vermelha (Figura 5).

Figura 5 - Contenção das novilhas e colheita de sangue na veia coccígea.



Fonte: Gentilmente cedida pelo Prof. Nélio Cunha Gonçalves.

As amostras de sangue foram transportadas, nos seus respectivos tubos, em isopor com gelo reciclável até o Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Escola de Veterinária da UFMG. Os tubos com ativador de coágulo foram centrifugados por 6 minutos a 4000rpm. Após a centrifugação, o soro era pipetado e posto em tubos *Eppendorf* de 0,5mL e congelados a -20°C, para análises posteriores.

5.2.7 ANÁLISE DE ALBUMINA

Conforme descrito anteriormente, os procedimentos laboratoriais que envolveram análise de albumina foram realizados no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Escola de Veterinária, na UFMG.

As concentrações séricas de albumina foram determinadas por colorimetria, por meio do uso do analisador bioquímico Cobas Mira Plus® (Roche Diagnostic Systems™, Suíça), exposto na Figura 6. O aparelho foi programado manualmente com auxílio do calibrador Autocal H® (BioTécnica®) e, após isso, foi testado com soro controle Quantinorm® (BioTécnica®). Feito isso, pipetou-se o reagente de albumina (BioTécnica®), o que finaliza a preparação do analisador bioquímico.

Figura 6 - Analisador bioquímico Cobas Mira Plus®.



Fonte: Arquivo pessoal.

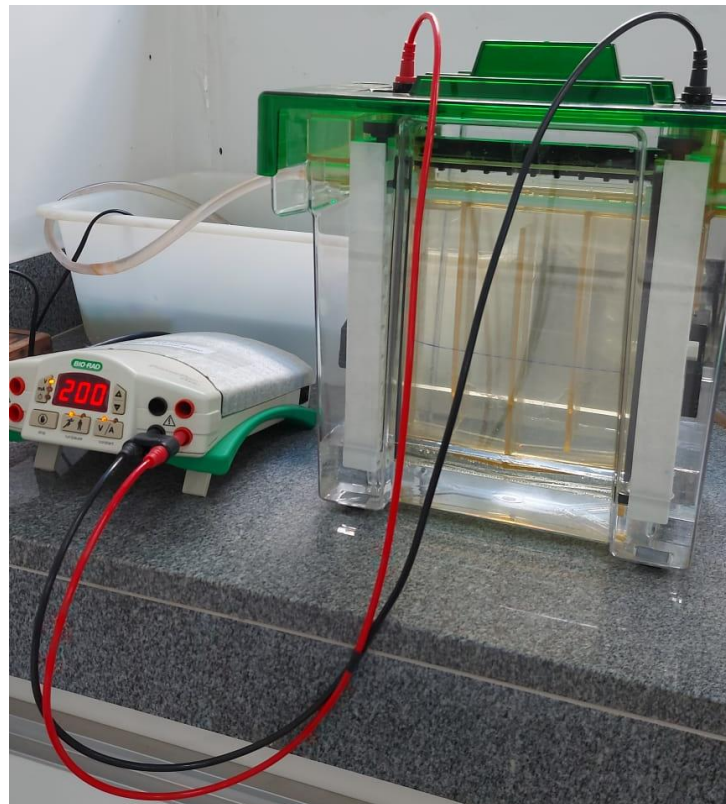
As amostras de soro dos animais foram aquecidas em aparelho de banho seco (modelo K80-S02®, Kasvi™), até que alcançassem a temperatura de 37°C. Após isso, eram alocadas no analisador bioquímico Cobas Mira Plus® para a análise de albumina. Em um só momento, as amostras dos três tempos do estudo (0, +15 e +30), de todos os tratamentos, foram analisadas.

5.2.8 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS DE FASE AGUDA

Para as análises laboratoriais das PFA, as amostras foram transportadas até o Laboratório de Pesquisa em Patologia Clínica, do Departamento de Veterinária da UFV, campus Viçosa/MG, em isopor com gelo reciclável, devidamente congeladas.

A fim de se determinar os níveis séricos das diferentes proteínas a serem estudadas, realizou-se eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme a técnica descrita por Laemmli (1970) modificada. A corrida foi realizada no sistema vertical de eletroforese Protean II XI, Vertical Electrophoresis Cells® (Bio-Rad, Estados Unidos) (Figura 7). Para se preparar o gel, no quarto superior do aparato de polimerização, a fim de que se ocorresse o empilhamento das proteínas, utilizou-se gel de poliacrilamida a 4%. A partir daí se utilizou a concentração de 10% de poliacrilamida. Para o fracionamento das proteínas, foram realizadas preparações pela diluição de 10µL de cada amostra de soro sanguíneo em 30µL de tampão-fosfato (PBS) e 20µL de tampão de amostra.

Figura 7 - Cuba para eletroforese acoplada a fonte de energia.



Fonte: Gentilmente cedida pelo Prof. Nélio Cunha Gonçalves.

Posteriormente, as preparações foram aquecidas em água em ebulição por 10 minutos. A cada procedimento de separação de proteínas, uma alíquota de 10µL de cada preparação foi pipetada em 17 de um total de 20 cavidades no gel de corrida. Nas outras três cavidades restantes, foram pipetadas: (a) 20µL de um padrão comercial, com proteínas de peso molecular conhecido (Precision Plus Protein™ Standards, BIO-RAD, Estados Unidos); (b) 10µL de um preparo com a proteína albumina sérica bovina (BSA) isolada; (c) 10µL de um soro controle com proteínas de pesos moleculares conhecidos, determinados por espectrometria de massa no Núcleo de Análises de Biomoléculas (NUBIOMOL), da UFV, em espectrômetro de massas MALDI (*matrix-assisted laser desorption ionization*), com separador de íons por tempo de voo (TOF/TOF), modelo Ultraflex III (Brucker Daltonics®).

Após a deposição das soluções nas cavidades do gel, todo o conjunto do sistema de eletroforese foi montado, incluindo a adição de solução tampão de amostra nas extremidades inferior e superior da cuba. A passagem de corrente elétrica foi então iniciada a 100 Volts, por meio da fonte elétrica modelo PowerPac™ Basic (300V, 400mA, 75W) (BioRad, Estados Unidos). Passadas 1 hora do início da corrida, com as amostras já presentes no gel de separação, a corrente elétrica foi aumentada em 50% do valor inicial, indo para 150 Volts. Após mais 60 minutos, a voltagem foi então aumentada para 200 Volts, valor em que permaneceu até o fim da corrida.

Ao término da corrida, o gel era retirado da placa e mergulhado em solução de azul de Coomassie® R-250 a 0,2%. Foi submetido a movimentação horizontal constante em agitador de laboratório orbital, modelo Laboshake (Gerhardt GmbH & Co. KG, Alemanha), por 30 minutos. Após ser colorido de forma uniforme, o gel era submerso em solução descolorante à base de metanol e ácido acético para retirada do excesso de corante e obtenção da nitidez das bandas proteicas no gel.

Por fim, os pesos moleculares e as concentrações das frações proteicas foram determinados por densitometria computadorizada (software LabImage 1D, Loccus®), a partir do escaneamento das bandas nos géis em aparelho fotodocumentador (BIO-RAD). Para o cálculo do peso molecular, utilizou-se marcadores de pesos moleculares de 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 e 10 kDa, além do soro controle espécie específico, cujas proteínas presentes eram previamente identificadas por meio de espectrometria de massa, conforme descrito anteriormente. Para a avaliação

densitométrica das bandas proteicas foram confeccionadas curvas de referência a partir da leitura do marcador padrão.

5.3 METODOLOGIA DE ANÁLISE DE DADOS

Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado com arranjo em parcelas subdivididas, sendo as parcelas os quatro tratamentos (dietas) e as sub-parcelas os três tempos de coleta (dias 0, +15 e +30 em relação ao início dos tratamentos), com quatro animais por tratamento. As fontes de variação e os respectivos graus de liberdade estão expostos no quadro de análise de variância (ANOVA) (Tabela 7).

Realizou-se testes estatísticos para averiguar a normalidade e a homocedasticidade (KOLMOGOROV, 1933; LEVENE, 1960) na distribuição dos dados obtidos para as diferentes variáveis analisadas. As médias, a serem quantificadas nos tratamentos, para os tratamentos com óleos e para as análises das PFA, foram comparadas pelo teste Tukey a 5 % de significância.

Tabela 7 - Quadro de Análise de Variância (ANOVA):

<i>Fontes de Variação</i>	<i>Graus de Liberdade</i>
Total na parcela	15
Dieta	03
Erro A	12
Total na sub-parcela	47
Tempo	02
Interação dieta x tempo	06
Erro B	24

5.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Além de todos os animais serem fêmeas bovinas leiteiras, buscou-se a máxima homogeneidade nos quesitos idade, raça, peso e estado de saúde. Todos os animais pertenciam ao mesmo lote do rebanho e há, inclusive, um considerável grau de parentesco, uma vez que as 16 fêmeas são filhas de um grupo de oito touros reprodutores.

5.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Descartou-se todos os animais que não se enquadrarem na faixa de idade entre 6 e 13 meses, animais que se apresentaram-se fora da faixa de peso entre 150kg e 300kg, bem como aqueles que tiveram quaisquer manifestações clínicas de doenças ou eventuais complicações que comprometam a qualidade dos resultados a serem obtidos.

5.6 BENEFÍCIOS

A inclusão de óleos na alimentação de ruminantes, quando devidamente aplicada, tem potencial de melhorar o status energético e minimizar a resposta inflamatória no pós-parto de vacas leiteiras. Além disso, pode promover um aumento do teor de gordura no leite.

5.7 RISCOS

A inclusão de óleos na alimentação de ruminantes, quando aplicada de forma irregular, pode afetar diretamente o microbioma ruminal. Além disso, características dos óleos podem ser perdidas em decorrência do processo de biohidrogenação.

5.8 ASPECTOS ÉTICOS

O presente trabalho foi submetido e aprovado pela CEUA da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob o número de protocolo 294/2019 (Anexo 1).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De modo geral, as respostas inflamatórias são benéficas ao organismo por conta de alguns fatores como: diluição ou inativação de toxinas químicas ou biológicas; neutralização de microrganismos, de tecido necrótico, etc; degradação de materiais estranhos; fornecimento de fatores necessários para a cicatrização, dentre outros. Entretanto, a resposta de fase aguda pode levar a prejuízos aos sistemas do indivíduo, uma vez que, quando acontece uma resposta inflamatória excessiva ou prolongada, pode ser até mais prejudicial que o agente estimulante inicial (ACKERMANN, 2013).

Esses fatores justificam uma avaliação criteriosa do estado inflamatório dos animais, uma vez que esta pode auxiliar o clínico na determinação do prognóstico e/ou do tratamento (BALIKCI; AL, 2014; ECKERSALL; BELL, 2010; MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004).

Os resultados referentes às análises de albumina sérica dos animais estão expostos na Tabela 8. Quando se analisam os resultados, pode-se notar que não houve interação dieta-tempo sobre os níveis séricos de albumina ($p > 0,05$). Quando não se considera a dieta, o tempo influenciou negativamente a concentração sérica desta proteína e, quando não se considera o tempo, as dietas não interferiram nos níveis de albumina.

Tabela 8 - Médias, seguidas dos valores de erro padrão* entre parênteses, para a concentração sérica de albumina (mg/dL), em dietas com ou sem inclusão de óleos em três tempos de coleta.

	Dieta controle	Dieta com óleo de algodão	Dieta com óleo de girassol	Dieta com óleo de soja	Média
D+0	3.328,0 (140,9)	3.503,0 (119,2)	3.455,0 (100,0)	3.600,0 (49,5)	3.471,5 (56,5) a
D+15	3.375,0 (125,2)	3.520,0 (104,8)	3.242,5 (52,5)	3.360,0 (128,3)	3.374,3 (56,9) ab
D+30	3.277,5 (74,0)	3.367,5 (61,3)	3.318,0 (115,8)	3.462,5 (81,6)	3.356,3 (39,9) b
Média	3.326,8 (28,2)	3.463,5 (48,3)	3.338,5 (62,2)	3.474,1 (69,5)	
VR:	3.000-3.600 mg/dL (KANEKO et al., 2008)			Interação Dieta X Tempo: 0,075	

*Erro padrão (EP) da média é o desvio padrão (DP) dividido pela raiz quadrada de n, ou seja, EP é um DP corrigido. Interação dieta x tempo não significativa pelo teste F de Fisher ($p > 0,05$). Médias iguais na linha marginal ($p > 0,05$) pelo teste F de Fischer e diferentes na coluna marginal ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. VR: valor de referência.

A interpretação dos valores de albumina é relativamente complexa pois alterações que envolvam aumento da perda de albumina, hemodiluição e diminuição de sua síntese, levam a uma redução de suas concentrações séricas. Uma hipoalbuminemia inflamatória pode ocorrer, pois, a albumina é uma nPFA. Quando a inflamação for a única causa da hipoalbuminemia, espera-se que sua concentração tenha uma diminuição discreta (CRAY, 2012; STOCKHAM; SCOTT, 2011).

Para os animais do presente estudo, as reduções ao longo do tempo das concentrações de albumina foram muito discretas para se considerar a presença de uma resposta de fase aguda, apenas observando as variações deste analito. Deve-se considerar ainda que os valores de albumina obtidos se encontram dentro do intervalo de referência (DIR) para a espécie bovina. Ademais, deve-se ter atenção ao interpretar estes resultados, por conta da sua meia-vida plasmática ser de 2 a 3 semanas em bovinos (STOCKHAM; SCOTT, 2011).

De acordo com Eckersall (2008), as nPFA podem ter suas concentrações diminuídas em 25% frente a um processo de resposta de fase aguda. Essa diminuição de suas concentrações pode ocorrer em um intervalo inferior a 24 horas ou ao longo de dias, entretanto, ainda não está totalmente esclarecido o porquê de ocorrer esta diminuição. Quando se considera a albumina como nPFA, espera-se que a diminuição de suas concentrações ocorra de forma gradual, de modo a ser mais perceptível em quadros crônicos.

A transferrina é outra nPFA avaliada pelo presente trabalho. Observou-se que não houve interação dieta-tempo sobre os níveis séricos de transferrina. Quando não se considera a dieta, o tempo influenciou de forma negativa a concentração sérica de transferrina e, quando não se considera o tempo, as dietas interferiram nos níveis desta PFA. Os resultados referentes às suas análises estão expostos na Tabela 9.

Segundo Tizard (2014) e Gomme e McCann (2005), a transferrina é uma importante nPFA que se liga ao ferro livre nos tecidos, de modo a torná-lo indisponível para microrganismos, o que inibe a proliferação de bactérias e proporciona um efeito bacteriostático.

Tabela 9 - Médias, seguidas dos valores de erro padrão entre parênteses, para a concentração sérica de transferrina (mg/dL), em dietas com ou sem inclusão de óleos em três tempos de coleta.

	Dieta controle	Dieta com óleo de algodão	Dieta com óleo de girassol	Dieta com óleo de soja	Média
D+0	635,21 (111,4)	748,13 (136,7)	1.006,63 (200,9)	1.355,07 (253,8)	936,26 (159,8) a
D+15	660,45 (196,3)	558,04 (93,4)	906,87 (50,3)	1.104,88 (58,8)	807,56 (123,2) ab
D+30	693,86 (186,8)	511,97 (73,9)	639,69 (75,2)	406,74 (109,4)	563,06 (64,6) b
Média	663,17 (17,0)ab	606,04 (72,3)b	851,06 (109,5)ab	955,56 (283,8)a	
Probabilidade					
	Dieta x Tempo		Dieta		Tempo
	0,0612		0,0329		0,0046

Interação dieta x tempo não significativa pelo teste F de Fisher ($p > 0,05$). Médias diferentes na linha e coluna pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Conforme descrito anteriormente, quando não se consideram as dietas, o tempo influenciou significativamente de forma negativa as concentrações de transferrina, de modo que se observa uma diferença nos valores encontrados no D+0 para o D+30. Resultados estes que são semelhantes aos observados para albumina. Quando se avaliam apenas as dietas, nota-se que o comportamento sérico da transferrina para os animais que receberam apenas a dieta com óleo de algodão foi diferente daqueles que receberam a dieta com óleo de soja, uma vez que esta teve sua concentração diminuída mais intensamente no segundo grupo. As concentrações encontradas nos grupos alimentados com a dieta controle e com óleo de girassol, foram semelhantes a todos os outros grupos.

Assim como pode ocorrer com a albumina, as concentrações de transferrina podem ser diminuídas em cerca de 25% quando há uma resposta de fase aguda. Entretanto, a avaliação de suas concentrações plasmáticas também estão relacionadas a uma gama de doenças que envolvam metabolismo de ferro (CRAY, 2012; ECKERSALL, 2008; MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004). Quando se avaliam os resultados de transferrina encontrados na presente pesquisa, se sugere que os animais desenvolveram alguma resposta de fase aguda ao longo do tempo do estudo que não tem relação com as dietas.

A PFA mais importante para a espécie bovina é a haptoglobina, uma vez que sua presença só ocorre em animais que apresentem uma resposta de fase aguda (CECILIANI et al., 2012; ECKERSALL; BELL, 2010; PETERSEN; NIELSEN; HEEGAARD, 2004; SCHMITT et al., 2021; TIZARD, 2014). Esta proteína se liga à hemoglobina livre e indisponibiliza o ferro para microrganismos, de forma semelhante ao que ocorre com a transferrina, o que faz com que a haptoglobina tenha certo efeito bacteriostático (CECILIANI et al., 2012; MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004).

No gado saudável, a concentração sérica de haptoglobina é inferior a 2 mg/dL, mas pode elevar-se a níveis superiores a 200 mg/dL dentro de dois dias após o início do processo inflamatório (ECKERSALL; BELL, 2010). Ao avaliar as concentrações de haptoglobina encontradas no presente estudo, nota-se que não houve interação dieta-tempo sobre os níveis séricos deste analito. Quando não se considera a dieta, o tempo influenciou negativamente a concentração sérica de haptoglobina e, quando não se considera o tempo, as dietas não interferiram nos níveis desta pPFA. Os resultados referentes às análises de haptoglobina estão expostos na Tabela 10.

Tabela 10 - Médias, seguidas dos valores de erro padrão entre parênteses, para a concentração sérica de haptoglobina (mg/dL), em dietas com ou sem inclusão de óleos em três tempos de coleta.

	Dieta controle	Dieta com óleo de algodão	Dieta com óleo de girassol	Dieta com óleo de soja	Média
D+0	262,75 (49,7)	276,63 (45,5)	238,82 (74,3)	215,81 (85,8)	248,5 (13,4) a
D+15	78,02 (4,6)	86,71 (18,0)	118,76 (14,6)	149,38 (45,5)	108,22 (16,3) b
D+30	144,57 (59,3)	124,76 (36,8)	98,15 (12,0)	151,39 (36,5)	129,72 (11,9) b
Média	161,78 (54,0)	162,70 (58,0)	151,91 (43,9)	172,19 (21,8)	
Probabilidade					
	Dieta x Tempo		Dieta	Tempo	
	0,8362		0,9523	0,0008	

Interação dieta x tempo não significativa pelo teste F de Fisher ($p > 0,05$). Médias iguais na linha marginal ($p > 0,05$) pelo teste F de Fischer e diferentes na coluna marginal ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Sugere-se, ao analisar apenas as médias, que as novilhas apresentaram uma resposta de fase aguda, mesmo que clinicamente não estivesse aparente, o que concorda com os resultados observados para transferrina. É importante lembrar que

estes animais foram vermifugados e vacinados 15 dias antes do início do experimento, o que pode ter contribuído para esta resposta. Entretanto, é difícil determinar o que de fato levou ao início desta resposta. Nota-se ainda que, mesmo que os níveis de haptoglobina baixaram ao longo dos 30 dias, as dietas não tiveram influência sobre a redução deste analito.

Schmitt et al. (2021) concluíram em seu trabalho que a avaliação de haptoglobina tem grande potencial de aplicação para diagnóstico precoce de reações inflamatórias excessivas no periparto de vacas leiteiras, tanto num nível de rebanho, como num nível individual de animais. Os autores ainda evidenciaram que uma avaliação de amostras agrupadas do rebanho pode indicar como está a situação da fazenda com relação a processos inflamatórios de vacas em lactação. Quando consideraram as análises individuais, a haptoglobina foi o marcador diagnóstico mais sensível para reações inflamatórias gerais e para doenças uterinas logo após o parto.

Certos autores indicam que outras patologias como mastite, pneumonia, enterites, pericardites, endometrites, síndrome do fígado gordo, estresse por transporte, dentre outras, podem levar a um aumento de haptoglobina (ECKERSALL; BELL, 2010; MURATA et al., 2004; OTSUKA et al., 2021; SAFI et al., 2009). É importante ressaltar que não foram evidenciadas alterações clínicas que justificassem a elevação deste analito no presente estudo, o que sugere que se tratara de uma alteração subclínica, não relacionada com a dieta.

A α_1 -glicoproteína ácida é uma PFA de resposta moderada, que possui múltiplas funções relacionadas ao transporte de metabólitos e fármacos. Em situações que ocorram uma resposta de fase aguda, suas concentrações aumentam de forma mais lenta e permanecem com seus níveis elevados por mais tempo, quando se compara a outras PFA. Ressalta-se ainda que esta capacidade de se ligar a fármacos pode trazer implicações terapêuticas, haja vista que, em uma resposta de fase aguda que ocorra aumento de suas concentrações, a α_1 -glicoproteína ácida pode se ligar a fração livre do fármaco e alterar sua farmacocinética (ECKERSALL, 2008).

Esta PFA possui um grande teor de carboidratos e, além das funções de transporte, pode desempenhar um papel imunomodulador. A α_1 -glicoproteína ácida é sintetizada

e excretada principalmente pelos hepatócitos, entretanto, ainda pode ter uma produção extra-hepática (FOURNIER; MEDJOUBI-N; PORQUET, 2000). Os resultados obtidos com as análises de α_1 -glicoproteína ácida do presente estudo estão expostos na Tabela 11.

Tabela 11 - Médias, seguidas dos valores de erro padrão entre parênteses, para a concentração sérica de α_1 -glicoproteína ácida (mg/dL), em dietas com ou sem inclusão de óleos em três tempos de coleta.

	Dieta controle	Dieta com óleo de algodão	Dieta com óleo de girassol	Dieta com óleo de soja	Média
D+0	327,86 (52,7)	245,13 (38,4)	281,24 (53,7)	364,28 (73,7)	304,62 (26,1) a
D+15	148,18 (20,6)	200,74 (40,8)	277,06 (6,1)	227,98 (16,3)	213,49 (26,9) b
D+30	236,92 (54,1)	267,04 (60,3)	271,43 (11,3)	217,32 (31,6)	248,18 (12,8) ab
Média	237,65 (51,9)	237,64 (19,5)	276,57 (2,8)	269,86 (47,3)	
Probabilidade					
	Dieta x Tempo		Dieta	Tempo	
	0,3737		0,4163	0,0357	

Interação dieta x tempo não significativa pelo teste F de Fisher ($p > 0,05$). Médias iguais na linha marginal ($p > 0,05$) pelo teste F de Fischer e diferentes na coluna marginal ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Como descrito anteriormente, a α_1 -glicoproteína ácida pode desempenhar um papel imunomodulador. Murata et al. (2004) descrevem que uma inibição da atividade de células “*natural killer*” e da proliferação de linfócitos, bem como a capacidade de se ligar a lipopolissacarídeos, pode ser uma das atividades anti-inflamatórias da α_1 -glicoproteína ácida. Horadagoda et al. (1999) observaram em seu trabalho que, para determinação de processos crônicos em bovinos, a α_1 -glicoproteína ácida apresentou uma resposta superior à de haptoglobina e amiloide sérica A.

Otsuka et al. (2021) observaram em seu trabalho que as concentrações plasmáticas de α_1 -glicoproteína ácida, haptoglobina e amiloide sérica A em vacas portadoras de mastite, foram significativamente maiores do que em vacas consideradas saudáveis, o que leva a entender que os níveis destas PFA refletem às inflamações causadas por quadros de mastite, o que concorda com o trabalho de Eckersall e Bell (2010). Isso justifica a escolha destas PFA como índices avaliativos do estado inflamatório das novilhas do presente trabalho.

Ao analisar os resultados encontrados na Tabela 11, pode-se notar que não houve uma interação dieta-tempo frente aos níveis de α 1-glicoproteína ácida. Nota-se ainda que o tempo influenciou as concentrações desta proteína, que diminuíram de D+0 para D+15. Isso sugere que as dietas fornecidas não interferiram na mobilidade dos níveis desta PFA.

A ceruloplasmina é uma importante enzima que atua no transporte de cobre na corrente sanguínea e também no metabolismo do ferro. Cerca de 95% do cobre presente no plasma é transportado pela ceruloplasmina (FLORIS et al., 2000; LØVSTAD, 2006).

O cobre melhora a função imunológica, de modo que age sobre enzimas atuantes no sistema antioxidante e protege células contra danos oxidativos, além disso, a ação antimicrobiana e a fagocitose diminuem se os índices de ceruloplasmina caírem. Portanto, a necessidade desta enzima aumenta em condições inflamatórias (CERONE et al., 2000). Os resultados obtidos nas análises de ceruloplasmina do presente trabalho estão expostos na Tabela 12.

Tabela 12 - Médias, seguidas dos valores de erro padrão entre parênteses, para a concentração sérica de ceruloplasmina (mg/dL), em dietas com ou sem inclusão de óleos em três tempos de coleta.

	Dieta controle	Dieta com óleo de algodão	Dieta com óleo de girassol	Dieta com óleo de soja
D+0	36,94 (10,2)	54,83 (14,8)	65,42 (23,9) AB	89,20 (17,2) A
D+15	71,96 (31,0)	59,03 (15,9)	109,63 (22,5) A	103,24 (22,8) A
D+30	95,62 (21,6) a	41,34 (5,9) ab	14,26 (2,6) Bb	17,56 (6,5) Bb
	Probabilidade			
	Dieta x Tempo		Dieta	Tempo
	0,0110		0,6513	0,0074

Interação dieta x tempo significativa pelo teste F de Fisher ($p < 0,05$). Médias seguidas de letras distintas minúsculas na linha e maiúsculas na coluna diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os resultados de ceruloplasmina obtidos no presente estudo apontam para uma interação das dietas com o tempo. Quando se avalia o grupo da dieta controle, nota-se que as concentrações desta pPFA aumentaram gradativamente ao longo dos

tempos do estudo. Resultados estes que diferem dos demais grupos que receberam óleos em suas dietas, principalmente quando se avaliam os valores obtidos em D+30.

O grupo tratado com óleo de algodão apresentou uma diminuição das médias de ceruloplasmina entre D+0 e D+30, entretanto, a redução deste analito não foi considerada estatisticamente significativa. O grupo que recebeu a inclusão de óleo de girassol em sua dieta apresentou uma redução estatisticamente significativa das concentrações de ceruloplasmina entre o D+15 e D+30. Já o grupo que recebeu óleo de soja em sua dieta, obteve uma expressiva diminuição das concentrações de ceruloplasmina no D+30.

Os resultados encontrados pela presente pesquisa, sugerem que a inclusão de óleo de girassol ou óleo de soja na alimentação de novilhas leiteiras, nas condições e características do presente estudo, tem potencial de reduzir as concentrações de ceruloplasmina e, por consequência, auxiliar na melhora do estado inflamatório destes animais.

Considera-se ainda que as concentrações de ceruloplasmina podem apresentar-se elevadas durante processos inflamatórios e infecciosos, entretanto, uma diminuição de seus níveis pode ocorrer em situações de deficiência de absorção de nutrientes, no pós-parto, em patologias associadas à intoxicação por cobre, dentre outras (CONTIN et al., 2015).

Hussein et al. (2019) notaram em sua pesquisa que os níveis de ceruloplasmina em vacas doentes foram maiores do que em vacas consideradas saudáveis, aliado a isso, Kaya et al. (2016) apontam em seu trabalho que a avaliação dos níveis de ceruloplasmina pode ser utilizada como alternativa a outras PFA, como haptoglobina e amiloide sérica A, na detecção de algumas patologias que afetam vacas, como a endometrite.

A apolipoproteína A1 e a apolipoproteína A4 estão presentes no HDL. O HDL desempenha numerosos efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios, além de possuir propriedades anti-infecciosas no plasma de mamíferos (DELLA DONNA et al., 2012; KELESIDIS et al., 2011; RYE; BARTER, 2008). O HDL ainda desempenha um

importante papel no transporte do colesterol, de modo que remove seu excesso de células periféricas e destina-o para os tecidos hepáticos a fim de ser catabolizado (FIELDING; FIELDING, 1995).

Considera-se então que os efeitos benéficos do HDL são altamente dependentes da apolipoproteína A1 e da apolipoproteína A4, bem como de suas estruturas e funções. Quando se avalia individualmente, a apolipoproteína A1 bovina apresenta atividade antioxidante aprimorada, além de ter potencial para ser um eficaz veículo de transporte para fármacos (RYE; BARTER, 2008). Na medicina humana, a apolipoproteína A1 ainda pôde ser considerada sentinela na detecção de casos de COVID-19 (POYNARD et al., 2020).

Por sua vez, a apolipoproteína A4 está envolvida em uma variedade de processos biológicos, onde pode-se destacar o metabolismo de lipídeos, ingestão de alimentos, coagulação, proteção contra aterosclerose, dentre outros (HIXSON et al., 1993; INNIS-WHITEHOUSE et al., 1998; KARATHANASIS; YUNIS; ZANNIS, 1986; MEZDOUR et al., 1995; RYE; BARTER, 2008). Os resultados obtidos no presente trabalho para as análises de apolipoproteína A1 e apolipoproteína A4, estão expostos na Tabela 13 e Tabela 14, respectivamente.

Tabela 13 - Médias, seguidas dos valores de erro padrão entre parênteses, para a concentração sérica de apolipoproteína A1 (mg/dL), em dietas com ou sem inclusão de óleos em três tempos de coleta.

	Dieta controle	Dieta com óleo de algodão	Dieta com óleo de girassol	Dieta com óleo de soja	Média
D+0	712,80 (114,4)	756,37 (150,6)	663,96 (161,1)	787,69 (139,1)	730,20 (26,9) b
D+15	648,15 (101,6)	733,25 (114,5)	750,84 (73,0)	909,91 (80,2)	760,54 (54,6) ab
D+30	965,37 (113,0)	1.115,33 (92,2)	951,72 (97,6)	843,91 (138,0)	969,08 (55,8) a
Média	775,44 (96,8)	868,32 (123,7)	788,84 (85,2)	847,17 (35,3)	
Probabilidade					
	Dieta x Tempo		Dieta	Tempo	
	0,6351		0,6917	0,0203	

Interação dieta x tempo não significativa pelo teste F de Fisher ($p > 0,05$). Médias iguais na linha marginal ($p > 0,05$) pelo teste F de Fischer e diferentes na coluna marginal ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Ao observar os resultados encontrados nas análises de apolipoproteína A1, nota-se que não houve interação dieta-tempo. Quando não se consideram as dietas, o tempo influenciou de forma positiva nas concentrações desta proteína, uma vez que, em D+30, as médias foram superiores às encontradas no início do experimento, em D+0. Quando não se considera o tempo, as dietas não influenciaram as concentrações de apolipoproteína A1.

Segundo Wu et al. (2020), a apolipoproteína A1 não só desempenha um importante papel na síntese e secreção de lipoproteínas, mas também atua como antioxidante em vacas leiteiras. Os mesmos autores observaram menores concentrações de apolipoproteína A1 em vacas que possuíam elevado escore de condição corporal (ECC), do que quando se compara a vacas com ECC moderado ou baixo, o que indicou que vacas com elevado ECC podem ter menor poder antioxidante. É importante ressaltar que não houveram diferenças estatísticas nos níveis desta proteína, no presente trabalho, quando se avaliam apenas as médias entre as dietas.

Tabela 14 - Médias, seguidas dos valores de erro padrão entre parênteses, para a concentração sérica de apolipoproteína A4 (mg/dL), em dietas com ou sem inclusão de óleos em três tempos de coleta.

	Dieta controle	Dieta com óleo de algodão	Dieta com óleo de girassol	Dieta com óleo de soja	Média
D+0	173,17 (18,5)	236,77 (33,8)	230,02 (17,5)	253,81 (38,9)	223,45 (17,5)
D+15	169,76 (28,2)	202,19 (27,7)	227,64 (23,7)	252,40 (14,9)	213,00 (17,7)
D+30	174,64 (49,9)	220,68 (52,1)	240,00 (22,0)	179,45 (22,6)	203,69 (15,9)
Média	172,52 (1,4) b	219,88 (10,0) ab	232,55 (3,8) a	228,55 (24,6) a	
Probabilidade					
	Dieta x Tempo		Dieta	Tempo	
	0,8235		0,0173	0,7350	

Interação dieta x tempo não significativa pelo teste F de Fisher ($p > 0,05$). Médias diferentes na linha marginal ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey e iguais na coluna marginal ($p > 0,05$) pelo teste F de Fischer.

Ao analisar os resultados encontrados para apolipoproteína A4, nota-se que não houve interação dieta-tempo sobre os níveis desta proteína. Quando não se consideram as dietas, o tempo não influenciou nas concentrações deste analito e, quando não se consideram os tempos, observou-se uma diferença estatística entre as médias encontradas para as dietas fornecidas às novilhas.

Nota-se que, para os animais submetidos à dieta controle, os resultados obtidos de apolipoproteína A4 foram inferiores quando se compara aos grupos alimentados com as dietas com óleo de girassol e óleo de soja. Os animais que receberam a dieta com óleo de algodão apresentaram médias semelhantes ao demais grupos.

Em humanos, as concentrações plasmáticas de apolipoproteína A4 aumentam quando consomem dietas ricas em AG insaturados (KRATZ et al., 2003). Takahashi et al. (2004) observaram em seu trabalho que os níveis de apolipoproteína A4 são maiores em vacas durante a lactação, quando se compara a animais que não estão lactantes. Os mesmos autores consideram que o aumento nos índices de apolipoproteína A4 em vacas lactantes esteja relacionado com a dieta, uma vez que, neste período, existe uma tendência de se aumentar o fornecimento de alimentos mais calóricos, a fim de suprir os desafios energéticos da produção de leite. De forma similar, observaram que o jejum leva a uma diminuição dos níveis séricos de apolipoproteína A4, o que corrobora com a possibilidade de a dieta ter efeito direto sobre os níveis desta proteína.

Estes resultados concordam com os observados no presente estudo, uma vez que os animais que receberam óleos na dieta, em destaque para os óleos de girassol e soja, apresentaram maiores níveis médios de apolipoproteína A4.

A α_2 -macroglobulina é uma PFA que apresenta uma resposta de fase aguda moderada. Esta proteína possui atividade antiprotease, o que a leva a desempenhar uma função de neutralizar a atividade de enzimas proteolíticas liberadas por células do sistema imune durante o curso de uma inflamação, o que minimiza danos aos tecidos adjacentes. Apesar de não se ter um esclarecimento acerca do seu uso para fins diagnósticos, tem sido descrito que o aumento das concentrações plasmáticas de α_2 -macroglobulina está relacionado a quadros de lesão hepática crônica e síndrome nefrótica (ECKERSALL, 2008).

Os resultados encontrados para as análises de α_2 -macroglobulina do presente trabalho estão expostos na Tabela 15.

Tabela 15 - Médias, seguidas dos valores de erro padrão entre parênteses, para a concentração sérica de α 2-macroglobulina (mg/dL), em dietas com ou sem inclusão de óleos em três tempos de coleta.

	Dieta controle	Dieta com óleo de algodão	Dieta com óleo de girassol	Dieta com óleo de soja	Média
D+0	179,56 (27,5)	225,13 (45,6)	216,31 (44,6)	258,91 (41,8)	219,98 (16,3)
D+15	226,27 (55,8)	198,62 (23,1)	214,33 (24,1)	229,23 (27,0)	217,11 (7,0)
D+30	232,68 (13,8)	221,94 (21,7)	145,72 (13,8)	113,67 (10,9)	178,50 (29,0)
Média	212,83 (16,7)	215,23 (8,4)	192,12 (23,2)	200,60 (44,3)	
Probabilidade					
	Dieta x Tempo		Dieta	Tempo	
	0,0540		0,8573	0,1061	

Interação dieta x tempo não significativa pelo teste F de Fisher ($p > 0,05$). Médias iguais na linha e coluna marginal ($p > 0,05$) pelo teste F de Fisher.

Ao observar os resultados encontrados na presente pesquisa para α 2-macroglobulina, pode-se notar que não houve interação dieta-tempo sobre os níveis séricos desta proteína. Quando não se consideram as dietas, os tempos não influenciaram nas concentrações séricas deste analito e, quando não se consideram os tempos, as dietas não influenciaram nas concentrações médias de α 2-macroglobulina. As médias encontradas nos animais submetidos à dieta controle apresentaram níveis crescentes de D+0 para D+30, o contrário se observou para os animais submetidos às dietas acrescidas com óleo de girassol e óleo de soja, entretanto, essas alterações nas médias não foram consideradas estatisticamente significativas.

Kusebauch et al. (2018) afirmam em sua pesquisa que a avaliação das concentrações de α 2-macroglobulina é uma importante ferramenta para detecção de casos de mastite causados por bactérias gram-negativas, uma vez que esta aumenta suas concentrações de forma precoce nestes casos. Os autores reforçam que esse aumento possivelmente está relacionado à ação antiprotease desta PFA, que atua inibindo as proteases liberadas no local da lesão.

Park et al. (2021) ainda afirmam que a mensuração de α 2-macroglobulina pode ser considerada uma ferramenta importante na detecção precoce de casos de paratuberculose bovina, principalmente quando se consideram casos subclínicos, uma vez que esta proteína tende a ter suas concentrações elevadas nestas situações.

A análise destes trabalhos demonstra a importância de se avaliarem os níveis séricos de $\alpha 2$ -macroglobulina.

As imunoglobulinas agem como anticorpos e são produzidas em resposta a exposição a antígenos. São altamente específicos quando se considera apenas um determinante antigênico, entretanto, na natureza vários determinantes antigênicos estão envolvidos. Produzidas por linfócitos, as imunoglobulinas são glicoproteínas que possuem, em sua estrutura, duas cadeias pesadas e duas cadeias leves ligadas por pontes de dissulfeto (ECKERSALL, 2008).

O IgG é responsável por desempenhar uma resposta humoral no organismo e é a classe de imunoglobulina com concentração mais abundante no plasma sanguíneo. Apresentado em duas subunidades, o IgG de cadeia leve e o IgG de cadeia pesada, possui funções relacionadas a opsonização de microrganismos, aglutinação de bactérias, fixação do sistema complemento, dentre outras (GERSHWIN, 2008; MURPHY, 2014). Os valores referentes às análises de IgG de cadeia leve e IgG de cadeia pesada, encontrados na presente pesquisa, estão expostos na Tabela 16 e Tabela 17, respectivamente.

Tabela 16 - Médias, seguidas dos valores de erro padrão entre parênteses, para a concentração sérica de IgG de cadeia leve (mg/dL), em dietas com ou sem inclusão de óleos em três tempos de coleta.

	Dieta controle	Dieta com óleo de algodão	Dieta com óleo de girassol	Dieta com óleo de soja	Média
D+0	2.036,70 (258,2)	1.941,06 (254,9)	2.375,52 (542,3)	1.610,88 (102,7)	1.991,04 (157,3) a
D+15	1.463,76 (380,6)	1.404,83 (176,3)	1.555,93 (202,4)	1.434,16 (194,9)	1.464,67 (32,7) b
D+30	1.470,10 (178,2)	1.930,67 (286,6)	1.800,09 (212,0)	1.186,64 (109,6)	1.596,87 (167,6)ab
Média	1.656,85 (189,9)	1.758,85 (177,0)	1.910,51 (243,0)	1.410,56 (123,0)	
Probabilidade					
	Dieta x Tempo		Dieta	Tempo	
	0,7533		0,1779	0,0298	

Interação dieta x tempo não significativa pelo teste F de Fisher ($p > 0,05$). Médias iguais na linha marginal ($p > 0,05$) pelo teste F de Fischer e diferentes na coluna marginal ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Ao observar os valores encontrados para as análises de IgG de cadeia leve, pode-se notar que não houve interação dieta-tempo frente aos níveis desta imunoglobulina.

Quando não se consideram os tempos, as dietas não interferiram nos níveis de IgG de cadeia leve e, quando não se consideram as dietas, o tempo influenciou os níveis desta imunoglobulina. Nota-se uma redução das concentrações desta imunoglobulina de D+0 para D+15, esta, que ocorreu independente das dietas administradas.

Tabela 17 - Médias, seguidas dos valores de erro padrão entre parênteses, para a concentração sérica de IgG de cadeia pesada (mg/dL), em dietas com ou sem inclusão de óleos em três tempos de coleta.

	Dieta controle	Dieta com óleo de algodão	Dieta com óleo de girassol	Dieta com óleo de soja	Média
D+0	1.249,29 (77,6)	1.348,70 (89,9)	1.542,35 (367,9)	1.433,87 (192,3)	1.393,55 (62,3)
D+15	1.366,52 (440,7)	1.131,31 (130,8)	1.313,18 (84,3)	1.227,37 (93,8)	1.259,59 (51,5)
D+30	1.214,68 (149,5)	1.195,92 (72,4)	1.214,69 (74,4)	939,60 (121,8)	1.141,22 (67,4)
Média	1.276,83 (45,9)	1.225,31 (64,5)	1.356,74 (97,1)	1.200,28 (143,3)	
Probabilidade					
	Dieta x Tempo		Dieta	Tempo	
	0,8889		0,7499	0,2252	

Interação dieta x tempo não significativa pelo teste F de Fisher ($p > 0,05$). Médias iguais na linha e coluna marginal ($p > 0,05$) pelo teste F de Fisher.

Quando se analisam os níveis de IgG de cadeia pesada encontrados na presente pesquisa, pode-se notar que não houve interação dieta-tempo sobre concentrações médias desta imunoglobulina. Destaca-se ainda que não houveram diferenças estatísticas para as concentrações médias quando se analisam apenas as dietas ou apenas os tempos.

Balikci e Al (2014), ao avaliarem em sua pesquisa valores séricos de haptoglobina e IgG de bezerros, evidenciaram que a avaliação das concentrações de PFA, durante um processo infeccioso, pode ser uma ferramenta útil de monitoração do prognóstico e/ou do tratamento para casos de doenças diarreicas em bezerros. Flaga et al. (2019) evidenciaram em seu trabalho que as concentrações séricas de IgG tenderam a diminuir em vacas submetidas a suplementação com algas ricas em ácido docosahexaenóico (DHA), importante AG de série ômega-3, o que indica que a inclusão de AG ômega-3 tem efeitos benéficos ao sistema imunológico de bovinos.

Caroprese et al. (2009) concluíram em sua pesquisa que a suplementação com ácidos graxos poli-insaturados da série ômega-3 tem propriedades imunomoduladoras capazes de sustentar as funções imunológicas de vacas em condição de estresse térmico. Os mesmos autores observaram que vacas submetidas a alimentação com silagem de milho, feno de aveia, concentrado, acrescidos de semente de linhaça como fonte de AG, apresentaram uma melhor resposta humoral, quando se avaliou os níveis de IgG.

Salles et al. (2019) observaram em seu trabalho que vacas alimentadas com óleo de girassol a 4%, em sua dieta, produziram leite com um perfil de AG melhorado para a nutrição humana, os quais continham um maior teor de ácido linoleico conjugado (CLA). Os mesmos autores ainda acrescentaram que o leite produzido pelas vacas que receberam esta dieta foi melhor avaliado pelos consumidores. Em contrapartida, Kairenius et al. (2018) apontam que a suplementação com óleo de peixe, acrescida ou não de óleos vegetais, como o óleo de girassol, aumentam a quantidade de bio-hidrogenações, o que pode ter implicações no metabolismo dos bovinos e na qualidade nutricional da alimentação de ruminantes.

Silvestre et al. (2011) puderam observar em seu trabalho que vacas no periparto alimentadas com dietas acrescidas de óleo de girassol, tiveram uma diminuição do limiar desencadeante da resposta imune, com alteração na imunidade inata, uma vez que, observaram alterações nas concentrações de haptoglobina e fibrinogênio.

Murata et al. (2004) consideram as PFA como componentes da resposta imune inata de caráter inespecífico, onde se observa que suas concentrações estão relacionadas à gravidade do dano nos tecidos submetidos à uma resposta de fase aguda. A avaliação das PFA pode ser considerada um “termômetro molecular” e sua quantificação pode fornecer informações prognósticas e/ou diagnósticas em situação que ocorram processos inflamatórios (ECKERSALL, 2008; STOCKHAM; SCOTT, 2011).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados encontrados no presente estudo evidenciam que a inclusão de óleos na alimentação de novilhas leiteiras pode influenciar o estado inflamatório destes animais, uma vez que para os óleos de girassol e soja, observou-se uma interação dieta-tempo nos níveis de ceruloplasmina, que diminuíram ao D+30.

Quando não se consideram os tempos, pode-se notar que as diferentes dietas influenciaram as concentrações médias de transferrina e apolipoproteína A4. Ao observar as concentrações de transferrina, notou-se uma diminuição de seus níveis nas novilhas alimentadas com as dietas acrescidas de óleos. O grupo alimentado com óleo de soja apresentou a maior média de concentrações e o grupo alimentado com óleo de algodão apresentou a menor média entre os tratamentos com óleo.

Ao analisar as médias de apolipoproteína A4 entre as dietas, observou-se uma maior concentração para os grupos tratados com óleo de girassol e soja, o que indica que o fornecimento de dietas ricas em AG leva a um aumento dos níveis desta proteína.

Quando não se considerou as dietas, o tempo interferiu nos níveis de albumina, haptoglobina, α_1 -glicoproteína ácida, apolipoproteína A1 e IgG de cadeia leve. Quando se observou apenas os níveis de α_2 -macroglobulina e IgG de cadeia pesada, tanto as dietas, quando os tempos do estudo, não interferiram nas suas concentrações. Estes resultados indicam que a inclusão de óleos na alimentação de novilhas, nas condições e características do presente trabalho, não interfere nas concentrações destas proteínas.

Portanto, os resultados da presente pesquisa evidenciam que a inclusão de óleos na dieta de novilhas leiteiras tem potencial de modular as concentrações de ceruloplasmina, esta que pode ser utilizada como indicadora de respostas de fase aguda, em alternativa a haptoglobina. A inclusão de alimentos ricos em AG ainda pode aumentar os níveis de apolipoproteína A4. Estes resultados sugerem que novas pesquisas sejam realizadas, uma vez que os tempos de administração das dietas podem ter sido curtos para se avaliar as PFA de respostas moderadas e/ou os intervalos de 15 dias podem ter sido longos para se avaliar as PFA de resposta mais precoce.

REFERÊNCIAS

- ABOLGHASEMI, A. et al. Effects of dietary supplementation of conjugated linoleic acid on pro-and anti-inflammatory cytokine gene expression in uterus of holstein dairy cows. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 21, n. 5, p. 1107–1116, 2019.
- ACKERMANN, M. R. Inflamação e Cicatrização. In: ZACHARY, J. F.; MCGAVIN, M. D. **Bases da Patologia em Veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Ltd, 2013. p. 242–382.
- ACOSTA, A. C. et al. Mastitis in ruminants in Brazil. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 36, n. 7, p. 565–573, 2016.
- AKBAR, H. et al. Body condition score at calving affects systemic and hepatic transcriptome indicators of inflammation and nutrient metabolism in grazing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 2, p. 1019–1032, fev. 2015.
- ALISSON, R. W. Avaliação laboratorial das proteínas do plasma e do soro sanguíneo. In: **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. p. 979–1010.
- ARAÚJO, C. M. **Desafios para melhoria da qualidade do leite frente às instruções normativas 51 e 62**. Universidade Federal da Paraíba, 2012.
- BALIKCI, E.; AL, M. Some serum acute phase proteins and immunoglobulins concentrations in calves with rotavirus, coronavirus, E. coli F5 and Eimeria species. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 15, n. 4, p. 397–401, 2014.
- CAMARGO, A. C. DE. Desafios da Produção de Leite. **Embrapa Pecuária Sudeste**, n. Capítulo em livro científico (ALICE), p. 1–17, 2018.
- CAROPRESE, M. et al. Immune response of cows fed polyunsaturated fatty acids under high ambient temperatures. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 6, p. 2796–2803, 2009.
- CECILIANI, F. et al. Acute phase proteins in ruminants. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 14, p. 4207–4231, 2012.
- CERÓN, J. J.; CALDIN, M.; MARTINEZ-SUBIELA, S. Electrophoresis and Acute Phase Protein Measurement. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6th. ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2010. p. 1157–1161.
- CERONE, S. I. et al. Cytochrome c oxidase, Cu, Zn-superoxide dismutase, and ceruloplasmin activities in copper-deficient bovines. **Biological Trace Element Research**, v. 73, n. 3, p. 269–278, 2000.

CONTIN, C. M. et al. Proteínas de Fase Aguda: Revisão de Literatura. **Revista Investigação Medicina Veterinária**, v. 14, n. 2, p. 73–76, 2015.

CRAY, C. **Acute phase proteins in animals**. 1. ed. Oxford, UK: Elsevier Inc., 2012. v. 105

DELLA DONNA, L. et al. Mass spectrometric measurements of the apolipoproteins of bovine (*Bos taurus*) HDL. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics**, v. 7, n. 1, p. 9–13, 2012.

ECKERSALL, P. D. Proteins, Proteomics, and the Dysproteinemias. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6th. ed. San Diego: Academic Press, 2008. p. 117–156.

ECKERSALL, P. D.; BELL, R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **Veterinary Journal**, v. 185, n. 1, p. 23–27, 2010.

ELBAZ, S. et al. Impact of dietary eicosapentaenoic and docosahexaenoic fatty acids supplementation on inflammatory response of post calving cows during transition to lactation. **Slovenian Veterinary Research**, v. 56, n. 22- Suppl, p. 633–645, 15 mar. 2019.

FAO. Dairy market review. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, n. April, p. 1–13, 2021.

FIELDING, P. E.; FIELDING, C. J. Plasma Membrane Caveolae Mediate the Efflux of Cellular Free Cholesterol. **Biochemistry**, v. 34, n. 44, p. 14288–14292, 1995.

FLAGA, J. et al. The effect of docosahexaenoic acid-rich algae supplementation in milk replacer on performance and selected immune system functions in calves. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 10, p. 8862–8873, 2019.

FLORIS, G. et al. The physiopathological significance of ceruloplasmin: A possible therapeutic approach. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, n. 12, p. 1735–1741, 2000.

FONSECA, H.; GUTIERREZ, L. E. Composição em ácidos graxos de óleos vegetais e gorduras animais. **Anais de E. S. A.**, v. XXXI, n. 1962, p. 485–490, 1974.

FOURNIER, T.; MEDJOUBI-N, N.; PORQUET, D. Alpha-1-acid glycoprotein. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1482, n. 1–2, p. 157–171, 2000.

GERSHWIN, L. J. Clinical Veterinary Immunology. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6th. ed. San Diego: Academic Press, 2008. p. 157–172.

GOMME, P. T.; MCCANN, K. B. Transferrin: Structure, function and potential therapeutic actions. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 4, p. 267–273, 2005.

HIXSON, J. E. et al. Baboon apolipoprotein A-IV. Identification of Lys76 → Glu that distinguishes two common isoforms and detection of length polymorphisms at the carboxyl terminus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 21, p. 15667–15673, 1993.

HORADAGODA, N. U. et al. Acute phase proteins in cattle: Discrimination between acute and chronic inflammation. **The Veterinary Record**, v. 144, n. 16, p. 437–441, 1999.

HUSSEIN, H. A.; BÄUMER, J.; STAUFENBIEL, R. Validation of an automated assay for measurement of bovine plasma ceruloplasmin. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 61, n. 1, p. 4–8, 2019.

IBGE. Censo agropecuário 2017: resultados definitivos. **Censo agropecuário**, v. 8, p. 93, 2019.

INNIS-WHITEHOUSE, W. et al. An efficient chromatographic system for lipoprotein fractionation using whole plasma. **Journal of Lipid Research**, v. 39, n. 3, p. 679–690, 1998.

JAIN, S.; GAUTAM, V.; NASEEM, S. Acute-phase proteins: As diagnostic tool. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 3, n. 1, p. 118–127, 2011.

KAIRENIUS, P. et al. Effect of dietary fish oil supplements alone or in combination with sunflower and linseed oil on ruminal lipid metabolism and bacterial populations in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 4, p. 3021–3035, 2018.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6th. ed. San Diego: Academic Press, 2008.

KARATHANASIS, S. K.; YUNIS, I.; ZANNIS, V. I. Structure, Evolution, and Tissue-Specific Synthesis of Human Apolipoprotein AIV. **Biochemistry**, v. 25, n. 13, p. 3962–3970, 1986.

KAYA, S. et al. Determination of ceruloplasmin, some other acute phase proteins, and biochemical parameters in cows with endometritis. **Veterinary World**, v. 9, n. 10, p. 1056–1062, 2016.

KELESIDIS, T. et al. HIV-1 infected patients with suppressed plasma viremia on treatment have pro-inflammatory HDL. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, p. 9–12, 2011.

KIM, S. M. et al. Bovine apolipoprotein (apo)A-I displays more enhanced antioxidant and anti-atherosclerotic activity in lipid-free and lipid-bound states than human and

porcine apoA-I. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 32, n. 4, p. 843–850, 2013.

KOLMOGOROV, A. Sulla de terminazione empirica di una leggedi distribuzione. **Giornaledel l'istituto italiano degliattuari**, v. 4, p. 83–91, 1933.

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos Ruminantes**. 1. ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2002.

KRATZ, M. et al. Dietary mono- and polyunsaturated fatty acids similarly increase plasma apolipoprotein A-IV concentrations in healthy men and women. **Journal of Nutrition**, v. 133, n. 6, p. 1821–1825, 2003.

KUSEBAUCH, U. et al. Selected reaction monitoring mass spectrometry of mastitis milk reveals pathogen-specific regulation of bovine host response proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 7, p. 6532–6541, 2018.

LAEMMLI, U. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LEVENE, H. Robust Tests for the equality of variance. In: OLKIN, I. **Contributions to Probability and Statistics**. Palo Alto, California: Stanford University Press, 1960. p. 278–292.

LOCK, A. L.; SOUZA, J. Impact of individual and combinations of supplemental fatty acids on dairy cow performance and metabolism. **Four-state dairy nutrition and management conference, Dubuque, Iowa**, p. 92–99, 2018.

LØVSTAD, R. A. A kinetic study on the phenothiazine dependent oxidation of NADH by bovine ceruloplasmin. **BioMetals**, v. 19, n. 1, p. 1–5, 2006.

MEZDOUR, H. et al. Genetic but not diet-induced hypercholesterolemia causes low apolipoprotein A-IV level in rabbit sera. **Atherosclerosis**, v. 113, n. 2, p. 171–178, 1995.

MONTAGNER, P. et al. Relationship between pre-partum body condition score changes, acute phase proteins and energy metabolism markers during the peripartum period in dairy cows. **Italian Journal of Animal Science**, v. 16, n. 2, p. 329–336, 3 abr. 2017.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: An overview. **Veterinary Journal**, v. 168, n. 1, p. 28–40, 2004.

MURPHY, K. Reconhecimento do Antígeno pelos Receptores de Células B e Células T. In: MURPHY, K. **Imunobiologia de Janeway**. 8ª ed. Porto Alegre: Art Med, 2014. p. 127–156.

NRC, N. R. C. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7th. ed. Washington, D.C: 381p, 2001.

OTSUKA, M. et al. Diagnostic utility of measuring serum amyloid a with a latex agglutination turbidimetric immunoassay in bovine mastitis: Comparison with haptoglobin and alpha 1 acid glycoprotein. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 83, n. 2, p. 329–332, 2021.

PALMQUIST, D. L.; MATTOS, W. R. S. Metabolismo de Lipídeos. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de Ruminantes**. 2ª ed. Rio de Janeiro: FUNEP, 2011. p. 301–321.

PARK, H. E. et al. Alpha-2-Macroglobulin as a New Promising Biomarker Improving the Diagnostic Sensitivity of Bovine Paratuberculosis. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, n. March, p. 1–10, 2021.

PETERSEN, H. H.; NIELSEN, J. P.; HEEGAARD, P. M. H. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary research**, v. 35, p. 163–187, 2004.

PICCIONE, G. et al. Changes of some haematochemical parameters in dairy cows during late gestation, post partum, lactation and dry periods. **Veterinarija ir Zootechnika**, v. 58, n. 80, p. 59–64, 2012.

POYNARD, T. et al. Performance of serum apolipoprotein-A1 as a sentinel of Covid-19. **PLoS ONE**, v. 15, n. 11 November, p. 1–28, 2020.

ROCHA, D. T. DA; CARVALHO, G. R.; RESENDE, J. C. DE. Cadeia produtiva do leite no Brasil: produção primária. **Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica**, **123**, p. 1–16, 2020.

RYE, K. A.; BARTER, P. J. Antiinflammatory actions of HDL. A new insight. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 28, n. 11, p. 1890–1891, 2008.

SAFI, S. et al. Acute phase proteins in the diagnosis of bovine subclinical mastitis. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 38, n. 4, p. 471–476, 2009.

SALLES, M. S. V. et al. Inclusion of sunflower oil in the bovine diet improves milk nutritional profile. **Nutrients**, v. 11, n. 2, p. 1–15, 2019.

SANTOS, R. L.; NASCIMENTO, E. F.; EDWARDS, J. F. Sistema Reprodutor Feminino. In: SANTOS, R. L.; ALESSI, A. C. **Patologia Veterinária**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora Roca, 2016. p. 1280–1283.

SCHMITT, R. et al. Evaluation of different acute-phase proteins for herd health diagnostics in early postpartum Holstein Friesian dairy cows. **Journal of Dairy**

Research, v. 88, n. 1, p. 33–37, 2021.

SILVA, J. F. C. Mecanismos reguladores de consumo. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de Ruminantes**. 2^a ed. Jaboticabal: FUNEP, 2011. p. 74.

SILVESTRE, F. T. et al. Effects of differential supplementation of fatty acids during the peripartum and breeding periods of Holstein cows: II. Neutrophil fatty acids and function, and acute phase proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 5, p. 2285–2301, 2011.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. Proteínas. In: STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. **Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária**. 2^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 303–341.

TAKAHASHI, Y. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for bovine apolipoprotein A-IV. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 66, n. 10, p. 1199–1204, 2004.

TANAKA, M. et al. Changes in oxidative status in periparturient dairy cows in hot conditions. **Animal Science Journal**, v. 82, n. 2, p. 320–324, abr. 2011.

TIZARD, I. R. Respostas Sistêmicas à Inflamação. In: TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**. 9^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier Ltd, 2014. p. 130–147.

VALADARES FILHO, S. DE C.; PINA, D. DOS S. Fermentação Ruminal. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de Ruminantes**. 2^a ed. Rio de Janeiro: FUNEP, 2011. p. 169–170.

VAN DORLAND, H. A. et al. Variation in hepatic regulation of metabolism during the dry period and in early lactation in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 5, p. 1924–1940, maio 2009.

WELTER, K. C. **Efeito da inclusão de óleo de canola na dieta de vacas em lactação**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2015.

WU, J.; LIU, J.; WANG, D. Effects of body condition on the insulin resistance, lipid metabolism and oxidative stress of lactating dairy cows. **Lipids in Health and Disease**, v. 19, n. 1, p. 1–7, 2020.

ANEXO 1



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 294/2019
Título do projeto: Expressão in vivo de genes relacionados ao metabolismo lipídico em fígado bovino induzida por ácidos graxos como agonistas do PPAR- α : nutrigenômica aplicada à bovinocultura leiteira
Finalidade: Pesquisa
Pesquisador responsável: Andrea Mara Macedo
Unidade: Instituto de Ciências Biológicas
Departamento: Departamento de Bioquímica e Imunologia

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 02/12/2019. Validade: 02/12/2019 à 01/12/2024

Belo Horizonte, 02/12/2019.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br