

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

**Desenvolvimento de uma estratégia farmacêutica para prevenção de
hipocalcemia em vacas leiteiras**

Josiane de Oliveira Feijó

Pelotas, 2016

Josiane de Oliveira Feijó

Desenvolvimento de uma estratégia farmacêutica para prevenção de hipocalcemia em vacas leiteiras

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Marcio Nunes Corrêa

Pelotas, 2016

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

F297d Feijó, Josiane de Oliveira

Desenvolvimento de uma estratégia farmacêutica para prevenção de hipocalcemia em vacas leiteiras / Josiane de Oliveira Feijó ; Marcio Nunes Corrêa, orientador. — Pelotas, 2016.

78 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. Proteínas de fase aguda. 2. Inovação . 3. Parto recente. 4. Hipocalcemia. 5. Dieta aniônica. I. Corrêa, Marcio Nunes, orient. II. Título.

CDD : 636.2142

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Josiane de Oliveira Feijó

Desenvolvimento de uma estratégia farmacêutica para prevenção de hipocalcemia
em vacas leiteiras

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências,
Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade
Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 05/07/2016

Banca examinadora:

Prof. Dr. Marcio Nunes Corrêa (Orientador)
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Francisco Augusto Burkert Del Pino
Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Eduardo Schmitt
Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal de Pelotas

Dr. Rubens Alves Pereira
Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal de Pelotas

Dedico essa tese aos meus pais Jesus e Cleusa que me deram todo o apoio e amor para que meus objetivos fossem realizados com sucesso.

Agradecimentos

A Deus, por me proporcionar esta passagem terrena repleta de saúde, família, amigos, oportunidades e conhecimento.

Aos meus pais Jesus e Cleusa, meus irmãos Gabriel, Michele e Eliane, aos meus sobrinhos Guilherme e João Gabriel pelo apoio familiar, pelos sentimentos de amor e carinho e ações que me permitiram estar aqui hoje.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), instituições que apostaram e financiaram a minha bolsa de doutorado.

À Universidade Federal de Pelotas, pelo caloroso acolhimento e inúmeras oportunidades concedidas.

Ao meu orientador, professor Marcio Nunes Corrêa e ao meu colega Rubens Alves Pereira que estiveram presentes em todos os sentidos e dividiram desde o início as obrigações da minha orientação e da condução deste trabalho. Ao professor Francisco Augusto Del Pino pelo carinho e dedicação e proporcionar realização das análises Laboratoriais.

Aos amigos da fazenda granjas quarto irmãos em especial ao Médico Veterinário Eduardo Xavier, pelo apoio e paciência durante os experimentos.

Todos amigos e colaboradores do NÚCLEO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENÇÃO EM PECUÁRIA – NUPEEC, grupo ao qual me orgulho em participar, agradeço pelo apoio e conhecimentos transmitidos aos amigos Augusto Schneider, Paula Montagner, Ismael, Uriel, Claudia, Patrícia, Carolina, Fabiane, Marcelo, Joao e em especial a minha amiga e companheira de experimento Camila Pizoni, os meus sinceros agradecimentos.

A professora Viviane Rabassa que foi a primeira que me “acolheu” quando comecei no NUPEEC, não me deixando tão perdida.

A todos os professores que me ajudaram de alguma forma em aprimorar meus conhecimentos e proporcionar uma visão melhor e mais crítica.

Ao Laboratório de Análises Clínicas do NUPEEC, o qual passei a maioria do tempo realizando análises, fazendo testes e pesquisa, podendo assim qualificar meus conhecimentos teóricos e práticos.

A todos os estagiários, residentes e alunos de graduação e pós-graduação que se revezaram nos auxiliando na condução da parte experimental da tese, encarando noites em claro de muito frio e muito calor... Valeu muito pela força!!! Principalmente aos amigos Aline Marangon e Vinicius Cardoso.

Aos funcionários da UFPel, pelas orientações e colaborações para que tudo transcorresse da melhor forma, em especial a Daiane secretária do PPGV.

As minhas amigas Camila, Tatiana, Jordana, Natalia, Rosiele, Josiane e Débora, pela amizade e por me ouvirem, me auxiliarem e por estar sempre presente quando eu precisei.

A minha filha Isabela, que durante toda a gestação contribuiu para que eu finalmente realizasse o sonho de ser Doutora.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho...

MUITO OBRIGADA!

Resumo

FEIJÓ, Josiane de Oliveira. **Desenvolvimento de uma estratégia farmacêutica para prevenção de hipocalcemia em vacas leiteiras.** 2016. 78f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

O cálcio é um mineral essencial para uma variedade de processos fisiológicos do organismo da vaca leiteira, sua deficiência pode causar vários distúrbios metabólicos, que levam a redução do desempenho produtivo e reprodutivo, com consequentes perdas econômicas. Atualmente há no mercado veterinário algumas estratégias para a prevenção da hipocalcemia, como: dieta aniônica, dieta deficiente de cálcio, administração de vitamina D3 no pré-parto e tratamento com cálcio oral no pós-parto recente, mas todas essas requerem ajustes a serem melhorados. Com isso, o objetivo desta Tese, é desenvolver uma estratégia farmacêutica eficiente no pré-parto, para prevenir a hipocalcemia subclínica (HSC) no pós-parto, para tal foi realizado dois experimentos *in vivo*, aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação animal da Universidade Federal de Pelotas. O primeiro foi relacionar a queda do cálcio no periparto com a síntese de proteínas de fase aguda, observamos que vacas com concentrações de cálcio $\leq 8,5$ mg/dL alteram a síntese de proteínas de fase aguda já no pré-parto, causando diminuição no escore de condição corporal, no peso e na produção de leite. O segundo experimento foi analisar o efeito da suplementação de diferentes dietas cátion-anionica no pré-parto e relacionar com a hemogasometria e concentrações de cálcio sanguíneo. Observamos que a suplementação com dieta aniônica, proporciona um aumento na concentração de cálcio ionizado disponível no plasma e redução nas globulinas, demonstrando que o pH levemente ácido provavelmente altera a síntese de glubulinas.

Palavras-chave: proteínas de fase aguda; inovação; parto recente; hipocalcemia; dieta aniônica

Abstract

FEIJÓ, Josiane de Oliveira. **Development of a pharmaceutical strategy for the prevention of hypocalcemia in dairy cows.** 2016. 78f. Thesis (Doctor degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

Calcium is an essential mineral for a variety of physiological processes in the body of the dairy cow, its deficiency can cause various metabolic disorders, leading to reduced production and reproductive performance, with consequent economic losses. There are currently in the veterinary market some strategies for the prevention of hypocalcemia, such as anionic diet, deficient in dietary calcium, vitamin D3 administration in pre-partum and treatment with oral calcium in the recent post-partum, but all of these require adjustments to be improved. Thus, the aim of this thesis is to develop an effective strategy in the pre-partum to prevent subclinical hypocalcemia (HSC) postpartum, for this was done two *in vivo* experiments, approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the University Federal of the Pelotas. The first was to correlate the drop of calcium in the peripartum with the synthesis of acute phase proteins, we observed that cows in concentrations of calcium ≤ 8.5 mg / dL alter the synthesis of acute phase proteins, causing decrease in body condition score, in weight and milk production. The second experiment was to evaluate the effect of supplementation of different cation-anion diets in prepartum and relate to the blood gas analysis and blood calcium levels. We observed that supplementation with dietary anion, provides an increase in concentration of available calcium in ionized plasma and reduction in globulins, demonstrating that pH may change globulinas synthesis.

Key-words: Acute phase proteins; innovation; recently calving; hypocalcemia; anionic diet

Lista de Figuras

4.1 Artigo 1

- Figura 1 Total calcium serum concentrations (mg / dL) during the peripartum period of Holstein cows with subclinical hypocalcemia (SCH) and normocalcemic cows (NC). SCH was defined as serum total calcium ≤ 8.5 mg/dL. $P \leq 0.05$ indicates significant values..... 42
- Figura 2 Serum concentrations of acute phase proteins, haptoglobin (HP – g / dL), albumin (ALB – g / dL), paraoxonase (PON – KU / L) in peripartum dairy cows with subclinical hypocalcemia (SCH) and normocalcemic (NC). $P \leq 0.05$ value indicates significant values..... 43
- Figura 3 Body condition score (BCS) and body weight (BW) of Holstein cows with subclinical hypocalcemia (SCH) and normocalcemic cows (NC) in the peripartum period. $P \leq 0.05$ value indicates significant values..... 44

4.2 Artigo 2

- Figura 1 Metabólitos pós-parto de animais suplementados com dieta ANIÔNIA (-41mEq) e NEUTRA (-3mEq) no pré-parto. (A) Cálcio ionizado; (B) cálcio total; (C) pH (potencial hidrogênio iônico); (D) HCO₃⁻ (bicarbonato); (E) TCO₂ (Teor de gás carbônico); (F) PPT- Proteínas Totais. Valor de $P \leq 0,05$ é considerado diferença significativa. P-G (Valor de P do grupo); P-H (Valor de P das horas); PG*H (Valor de P da interação do grupo com as horas)..... 60

Lista de Tabelas

4.1 Artigo 1

Tabela 1	Ingredients (kg) of diets offered to the animals before and after calving during the trial period.....	45
Tabela 2	Nutritional composition of diets offered to the animals before and after calving during the trial period.....	45
Tabela 3	Serum NEFA levels (mmol/L), glucose (mg/dL), insulin (U/L), AST (U/L) and phosphorus (mg/dL) during the prepartum period in cows with subclinical hypocalcemia (HSC) and in normocalcemic cows (NC).....	46
Tabela 4	Serum NEFA levels (mmol/L), glucose (mg/dL), insulin (U/L), AST (U/L) and phosphorus (mg/dL) during the postpartum period in cows with subclinical hypocalcemia (HSC) and in normocalcemic cows (NC).....	47
Tabela 1S	Correlation of zootechnical and metabolic indices, during the prepartum period in cows with subclinical hypocalcemia (HSC) and in normocalcemic cows (NC).....	48
Tabela 2S	Correlation of zootechnical and metabolic indices, during the postpartum period in cows with subclinical hypocalcemia (SCH) and in normocalcemic cows (NC).....	49

4.2 Artigo 2

Tabela 1	Ingredientes e composição nutricional da dieta pré-parto, dos animais do grupo dieta aniônica e neutra.....	57
Tabela 2	Metabólitos pré e pós-parto de animais que foram suplementados com dieta NEUTRA (-3mEq) e dieta ANIÔNICA (-41mEq) no pré-parto.....	61
Tabela 3	Índices hemogasométricos pré e pós-parto de animais que foram suplementados com dieta NEUTRA (-3mEq) e dieta ANIÔNICA (-41 mEq) no pré-parto.....	62

Sumário

1 Introdução.....	12
2 Objetivos.....	15
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.1 Objetivos Específicos.....	15
3 Revisão da Literatura.....	16
3.1 Cálcio no organismo de vacas.....	16
3.1.1 Níveis séricos de cálcio no organismo de vacas leiteiras.....	17
3.1.2 Homeostase do cálcio: fatores controladores e órgãos alvo.....	18
3.2 Fatores que podem influenciar na homeostase do cálcio.....	19
3.2.1 Alcalose Metabólica.....	19
3.2.2 Hipomagnesemia.....	20
3.2.3 Hiperfosfatemia.....	20
3.3 Estratégias de Prevenção de Hipocalcemia.....	21
3.3.1 Dieta Aniônica.....	21
3.3.2 Dieta deficiente em cálcio para estimular a secreção de PTH no pré-parto.....	22
3.3.3 Administração de calcitriol.....	23
3.3.4 Tratamentos com cálcio via oral, subcutâneo e intravenoso.....	23
4 Artigos.....	26
4.1 Artigo 1.....	26
4.2 Artigo 2.....	50
5 Considerações Finais.....	67
Referências.....	68
Anexo.....	77

1 Introdução

Nesta tese será apresentada dois artigos científicos envolvendo o metabolismo do cálcio, com base nesses resultados, propusemos uma estratégia farmacêutica para a prevenção de hipocalcemia em vacas leiteiras, cujo foi o desenvolvimento de um produto farmacêutico para uso animal, que deverá ter aplicação para vacas leiteiras, mas sua utilização poderá ser extrapolada para uso em outras espécies, com isso é de suma importância que se conheça os processos de aprovação de um novo medicamento, este sendo realizado pela *Food and Drug Administration* (FDA) antes de ser legalmente introduzido no mercado (Allen et al., 2013). Para um novo fármaco receber aprovação para comercialização o responsável deve demonstrar por meio de evidências científicas que o produto é seguro e eficaz para o uso proposto, diante disso, durante o período de doutorado foram realizados dois experimentos *in vivo* para comprovar a eficácia de um sal X (trabalhos 3 e 4, os quais não poderão ser divulgados ainda no meio científico, por se tratar de inovação farmacêutica) na prevenção de hipocalcemia subclínica em vacas leiteiras.

Na Medicina Veterinária há um crescente avanço na síntese de novos fármacos para o mercado, sendo ainda, os animais de produção os mais rentáveis nas indústrias farmacêuticas (SINDAN, 2014). É necessário que o desenvolvimento de um produto para o uso em animais de produção seja de aplicação única ou poucas doses e que não estressem muito o animal devido ao manejo e que seja econômico e rentável para o produtor. Compreende-se produto veterinário toda substância química, biológica, biotecnológica ou preparação manufaturada, cuja administração seja aplicada de forma individual ou coletiva, direta ou misturada com os alimentos, destinada à prevenção, ao diagnóstico, à cura ou ao tratamento das doenças dos animais (Decreto 1.662/95- artigo 2).

O uso do modelo animal vaca leiteira foi decidido, devido ela sofrer muitas perdas de cálcio durante o período de transição, principalmente no pós-parto recente. O período de transição da vaca leiteira, que compreende três semanas pré e três pós-parto, é caracterizado por importantes alterações endócrinas, metabólicas e nutricionais que exigem do animal uma alta capacidade de adaptação (Chapinal et al.,

2012). Manter a saúde e produtividade no período de transição é uma das tarefas mais difíceis para rebanhos leiteiros, pois aproximadamente 75% das doenças em vacas leiteiras acontecem no primeiro mês após o parto (LeBlanc et al., 2006). Durante as últimas semanas de gestação o animal diminui drasticamente a ingestão de matéria seca (IMS) como resposta fisiológica aos mecanismos do parto, podendo atingir níveis de até 30% especialmente na semana anterior ao parto (Chapinal et al., 2011). Quando mecanismos de regulação do organismo são afetados, devido às falhas no manejo nutricional durante o pré-parto, aumenta a prevalência das chamadas “doenças de produção”, entre as quais a hipocalcemia é uma das mais frequentes (Oetzel, 2000).

Em vacas leiteiras, a hipocalcemia é uma doença economicamente importante, podendo causar perdas de quase 2,9 kg / leite/ dia até aproximadamente seis semanas após o parto, e reduzir a vida produtiva de uma vaca em até 3,4 anos (Rajala-Schultz et al., 1999). A hipocalcemia clínica possui uma incidência de 5-7% (Mulligan e Doherty, 2008, Goff et al., 2014), enquanto que sua forma subclínica apresenta uma prevalência de 25-54%, dependendo do número de lactações (Reinhardt et al., 2011).

A regulação do cálcio no organismo é um sistema complexo que compreende vários fatores controladores como: calcemia, fosfatemia, concentrações circulantes de paratormônio (PTH) e calcitriol (1,25-diidroxitamina D3), além de muitos outros fatores como hormônios esteroidais em geral, outros íons como o magnésio (Mg) e fósforo (P), fatores hormonais e vários órgãos alvo (glândulas paratiroideias, osso, rim e intestino) (Oetzel, 2013). Os hormônios calciotrópicos como do PTH são produzidos em resposta a hipocalcemia, aumentando a entrada de cálcio no plasma, através da reabsorção óssea, maior absorção intestinal e maior reabsorção renal, a calcitonina é outro hormônio calciotrópico, mas age como antagônico ao PTH. A velocidade de ação do PTH na reabsorção óssea exige cerca de 48 horas (Goff, 2014). Isto confere grande importância em demandas repentinas de cálcio como nas primeiras 72 horas pós-parto de vacas leiteiras de alta produção (Goff, 2008).

As concentrações normais de cálcio total são mantidas entre 2,1 e 2,6 mmol/L (8,5-10,4 mg/dL) (El-Samad et al., 2002), na hipocalcemia subclínica as concentrações séricas de cálcio total são de 2.0-1.38 mmol/L (8, 0 a 5,5 mg/dL), abaixo de 5.5 mg/dL começam a aparecer sintomas clínicos (Goff, 2014). Em relação ao cálcio ionizado são consideradas vacas normocalcêmicas aquelas que possuem

concentrações séricas de cálcio ionizado entre 1.25 a 1mmol/L (5mg/dL a 4mg/dL), vacas que possuem concentrações séricas de cálcio ionizado abaixo de 1mmol/L até 0.6 mmol/L são consideradas com hipocalcemia subclínica, abaixo desses valores começam a apresentar os sintomas clínicos (Martinez et al., 2014).

Diante dessa problemática, atualmente a principal estratégia de prevenção à hipocalcemia tem sido o fornecimento de dieta aniônica, que induz queda do pH sanguíneo levando à uma absorção ativa de cálcio e aumento da reabsorção renal (Goff et al., 2014). Entretanto a baixa palatabilidade desta dieta fornecida próximo ao parto, pode reduzir a ingestão alimentar, o que pode contribuir para acentuar o balanço energético negativo (BEN).

A busca por novos métodos que previnam a hipocalcemia no pós-parto de vacas leiteiras de alta produção possui caráter emergente no meio científico. Além do mais, os resultados desta Tese poderá, de acordo com o avanço destas investigações, ser extrapolada para a utilização em humanos. Pois com o aumento da expectativa de vida das populações, a queda da mortalidade e a redução da fecundidade resultam no envelhecimento da população e aumento da incidência de doenças crônicas, como é o caso da osteoporose, considerada um problema de saúde pública (Zerbini e McClung, 2013).

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Demonstrar a importância da hipocalcemia em vacas leiteiras e sua relação com a dieta aniônica e com isso, desenvolver uma estratégia de prevenção de hipocalcemia subclínica com aplicação no pré-parto, para estimular a secreção do PTH e estabelecer a homeostase de cálcio no organismo adaptando, para enfrentar a hipocalcemia e tornar a ligação do PTH mais rápida e eficiente ao receptor, podendo evitar ou amenizar a hipocalcemia subclínica após o parto.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar proteínas de fase aguda em vacas com hipocalcemia subclínica.
- Demonstrar as avaliações de cálcio total e ionizado em vacas que receberam diferentes dietas no pré-parto.
- Analisar o cálcio ionizado e o total, para observar o sucesso da aplicação do produto X em relação às vacas do grupo que receberam placebo, no pré-parto.
- Padronizar a dose que seja eficiente em diminuir o cálcio ionizado ao patamar subclínico por até 6 horas, para que possamos assim fazer uma forma farmacêutica eficaz.

3 Revisão da Literatura

3.1 Cálcio no organismo de vacas

O cálcio representa 1,5 % do peso do animal, cerca de 99% é encontrado nos ossos e dentes na forma de hidroxapatita e o restante (1%) nos fluidos corporais (Wilkins et al., 2012a). Do cálcio extracelular, 50% está na forma ionizada (Ca_i), que é a forma fisiologicamente ativa, 45% está ligado as proteínas, principalmente à albumina e 5% está complexado com outros compostos como fosfatos e bicarbonatos, a união destas três formas disponíveis do cálcio no organismo é chamado de cálcio total (Ca_t) (Hansen et al., 2000), sendo que seus níveis podem variar com a concentração de proteínas e alterações do pH sanguíneo (Wilkins et al., 2013).

O cálcio possui várias funções no organismo de mamíferos, intracelularmente, está envolvido na proliferação, diferenciação e motilidade celular, no controle da contração muscular, secreção hormonal e metabolismo do glicogênio, além de atuar como segundo mensageiro e cofator enzimático (Kimura et al., 2006). Extracelularmente, participa do processo de coagulação sanguínea, adesão celular, manutenção da integridade dos ossos e regulação da excitabilidade extracelular (Martinez et al., 2012).

No periparto, o requerimento de cálcio de uma vaca leiteira varia. No pré-parto, as necessidades são de aproximadamente 30g/dia, sendo este direcionado para o feto e para a glândula mamária. No pós-parto imediato, há uma perda de cálcio de aproximadamente 2,1g/L direcionados para a produção de colostro, sendo esta quantidade 9 vezes superior a todo Ca_i plasmático. Para a produção de leite, as perdas deste são em torno de 1,22g/L (Fox e Tylutki, 1998), aumentando, com isso as necessidades diárias, que podem chegar até 100g/dia (Fox e Tylutki, 1998, DeGaris et al., 2010).

Além da mobilização de cálcio para a manutenção do animal, para o feto, produção de colostro e leite, há ainda perdas urinárias (0,5 g/dia) e fecais (5-8 g/dia). Logo, para manter os níveis fisiológicos de Ca_t circulante é necessário que o organismo ative mecanismos homeostáticos (Martinez et al., 2012, Goff, 2014).

Quando estes mecanismos de regulação falham, os animais podem desenvolver manifestações clínicas nas primeiras 72 horas em relação ao parto (Goff, 2008).

Outra consequência grave da hipocalcemia é a diminuição da IMS, o que leva a vários problemas metabólicos, como, síndrome da vaca caída (Brozos et al., 2011), retenção de placenta, prolapso do útero, deslocamento de abomaso (Chapinal et al., 2011), cetose (Kara, 2013) e redução no desempenho reprodutivo devido ao prolongamento do anestro pós-parto (Martinez et al., 2012). A hipocalcemia resulta em maior liberação de cortisol plasmático que exacerba a imunossupressão originalmente presente no parto (Goff, 2000).

Um fator que pode estar relacionado à imunidade é a baixa concentração de Ca_i intracelularmente, pois ele é um mineral importante que age como segundo mensageiro na transdução da sinalização celular. Esta que acontece devido ao aumento da concentração intracelular de cálcio é um indicador da resposta e função de células imunológicas (Kimura et al., 2006).

A diminuição dos níveis de cálcio no sangue, também pode causar uma redução de suas reservas celulares, prejudicando de forma direta a resposta imune, contribuindo para um estado de supressão imunitária (Martinez et al., 2012). Vacas com hipocalcemia subclínica apresentam uma proporção reduzida de neutrófilos com atividade fagocitária, prejudicando a ligação de células mononucleares com os antígenos, predispondo a vaca a desenvolver diversas outras doenças, principalmente mastite e metrite (Kimura et al., 2006, Martinez et al., 2012). Além disso, vacas que apresentam perda de 1mg/dL de cálcio abaixo de 8,59 mg/dL, aumenta o risco relativo em 22% de desenvolverem metrite, demonstrando que o cálcio é um elemento muito importante para o bom funcionamento do sistema imune.

3.1.1 Níveis séricos de cálcio no organismo de vacas leiteiras

A concentração sérica do cálcio da vaca leiteira normalmente é mantida dentro dos limites da normalidade, apesar das variações da ingestão diária e das perdas durante a gestação e lactação (Goff e Horst, 2003a). As medidas convencionais de cálcio são geralmente feitas através de dosagem do Ca_t , mas do ponto de vista fisiológico a medida do Ca_i é a mais importante por representar a forma ativa no organismo (Wilkins et al., 2012b).

As concentrações normais de Ca_i são mantidas entre 8,5-10,4 mg/dL (El-Samad et al., 2002), entretanto quase todos os animais no início da lactação passam por uma hipocalcemia subclínica a 8 mg/dL nas primeiras 24 horas após o parto (Chamberlin et al., 2013). Em alguns animais a hipocalcemia é mais severa, ocasionando a forma clínica dessa enfermidade, chegando a níveis inferiores a 5 mg/dL, causando disfunções neuromusculares, colapso circulatório e depressão da consciência, quando não tratada, pode apresentar níveis de cálcio de até 2 mg/dL o que é incompatível com a vida (Goff, 2008).

3.1.2 Homeostase do cálcio: fatores controladores e órgãos alvo

A regulação do cálcio no organismo é um sistema complexo que compreende vários fatores controladores como: concentrações circulantes de cálcio, fósforo, PTH e calcitriol, além de muitos outros fatores como hormônios esteroidais, íons como o magnésio (Mg) e vários órgãos alvo (glândula paratireóide, osso, rim e intestino) (Goff, 2000).

Nas glândulas paratireoides, bem como em outros elementos celulares, há receptores para o Ca_i (CaR), que são autênticos sensores que assinalam pequenas oscilações do cálcio desencadeando respostas que deprimem ou excitam a expressão do gene do pré-pro-paratormônio e assim reduzem ou aumentam a secreção de PTH (Sasaki et al., 2014). Os hormônios calciotrópicos como o PTH e o calcitriol são produzidos em resposta à hipocalcemia, aumentando a entrada de cálcio no plasma através da reabsorção óssea, maior absorção intestinal e maior reabsorção renal (Goff, 2008).

O tecido ósseo possui duas formas de cálcio: uma pequena quantidade está disponível em solução nos fluidos em torno das células ósseas e outra parte está dentro dos canalículos do osso. Com o estímulo do PTH, o cálcio do fluido ósseo é transferido para o fluido extracelular, devido a isso a redução do cálcio esquelético pode chegar de 9% até 13 %, podendo ocorrer uma osteoporose transitória, mas ao longo da lactação é repostado (Goff, 2006). Outro sistema de ajuste dos níveis de cálcio é através do trato gastrointestinal com absorção de cálcio via PTH - eixo vitamina D3, ocorrendo após 1 a 2 dias, o qual constitui um sistema de *feed-back* mais demorado (El-Samad et al., 2002). O PTH atua nos rins ativando a enzima 1- α -hidroxilase nas células do tubo contorcido proximal estimulando a conversão do metabólito inativo da

vitamina D3 (25- hidroxí- vitamina D3) a um metabólito ativo (calcitriol). O calcitriol atua no osso aumentando a reabsorção óssea e na mucosa gastro intestinal aumentando absorção de cálcio da dieta (Wilkens et al., 2012b).

A hipocalcemia causada por alterações clínicas pode ocorrer em virtude da produção de PTH ou de calcitriol biologicamente não ativos, ou devido aos órgãos alvos não responderem adequadamente a esses hormônios por causa de um defeito bioquímico específico ou uma lesão num órgão alvo (Goff, 2008). Na falta de ação do PTH, o clearance de fosfato é diminuído e a hiperfosfatemia é um achado comum (Goff, 2014). A deficiência de ação do PTH e a hiperfosfatemia impede a produção renal de calcitriol causando uma menor absorção de cálcio proveniente da dieta pelo epitélio intestinal, resultando numa hipocalcemia mais severa (Wilkens et al., 2012a).

3.2 Fatores que podem afetar a homeostase do cálcio

3.2.1 Alcalose Metabólica

É o resultado de uma dieta que fornece mais cátions como potássio, sódio, cálcio, e magnésio (K^{+1} , Na^{+1} , Ca^{+2} e Mg^{+2} , respectivamente) do que ânions cloreto, sulfeto e fosfato (Cl^{-1} , SO_4^{-2} e PO_4^{-3} , respectivamente) para a corrente sanguínea, causando uma disparidade de carga elétrica nos fluidos corporais. Para restaurar a eletro neutralidade para o sangue carregado positivamente, uma carga positiva sob a forma de um íon de hidrogênio (H^{+}) é perdido e o pH do sangue é aumentado (Goff, 2000). Todo este processo altera a conformação dos receptores do PTH, tornando os tecidos menos sensíveis ao PTH, gerando uma falta de responsividade ao PTH pelo tecido ósseo, o que diminui a ativação dos osteoclastos e a reabsorção de cálcio (Brozos et al., 2011). Como há alterações dos receptores do PTH também a nível renal, a enzima α -1-hidroxilase não é ativada e os rins não conseguem converter a 25- hidroxí- vitamina D3 em calcitriol, comprometendo a eficiência da absorção intestinal de cálcio dietético (Goff, 2008). Recentemente Goff et al. 2014, observaram que dietas que causam uma leve alcalose, pode também induzir um pseudo hipoparatiroidismo, diminuindo os receptores de PTH. Champion et al., 2015 demonstraram em testes *in vitro* com células renais da paratireóide, que pH alcalino no meio extracelular ativam CaR, entrando mais Ca_i para o meio intracelular, a

consequência disso é que ocorre uma diminuição da secreção do PTH, podendo agravar ainda mais o quadro de hipocalcemia.

3.2.2 Hipomagnesemia

A hipomagnesemia, independentemente da alcalose metabólica, pode também interferir na capacidade de ação do PTH sobre os seus tecidos alvo. Estudos comprovam que concentrações plasmáticas de Mg inferiores a 0,65 mmol/L (1,5 mg / dL) no periparto de vacas, pode aumentar a susceptibilidade à hipocalcemia (Goff, 2006). Normalmente receptores de PTH no osso ou tecidos iniciam a ativação da adenilciclase, resultando na produção do segundo mensageiro (AMP cíclico) (Goff, 2008). Interações do receptor do PTH deve também causar a ativação da fosfolipase C em alguns tecidos, resultando na produção de segundos mensageiros, como o diacilglicerol e o inositol1,4,5-trifosfato (IP₃). Ambas as enzimas adenilciclase e fosfolipase C têm um Mg²⁺ local de ligação que age como co-fator para plena atividade do PTH, com a diminuição de Mg²⁺, essas enzimas não conseguem sintetizar os seus respectivos segundos mensageiros, ocorrendo uma hipocalcemia devido a hipomagnesemia (Brozos et al., 2011).

3.2.3 Hiperfosfatemia

Níveis séricos de fósforo (P) acima do limite fisiológico superior (2 mmol/L) possuem efeito inibidor sobre a enzima α -1-hidroxilase (Pallesen et al., 2008). Portanto, mesmo se ocorrer secreção de PTH a vaca não será capaz de produzir a quantidade de hormônio necessário para a ativação de transporte intestinal, prejudicando a homeostasia do cálcio (Thilsing-Hansen et al., 2002a). Embora concentrações de P não são tão rigidamente regulamentada como as de cálcio, ambos estão intimamente relacionados com concentrações de fosfato no plasma regulados diretamente pelo calcitriol e indiretamente pelo *feedback* negativo do PTH / Ca_i (Goff et al., 2014).

3.3 Estratégias de prevenção da hipocalcemia

Existem várias estratégias para a prevenção da hipocalcemia, como: dieta aniônica, dieta deficiente de cálcio, administração de calcitriol no pré-parto e tratamento com cálcio oral no pós-parto. Outras medidas de prevenção da hipocalcemia são utilizadas, mas não são específicas, como o controle da condição corporal, o controle da ingestão de hidratos de carbono no peri-parto e a redução da ordenha no início da lactação (Thilsing-Hansen et al., 2002b).

3.3.1 Dieta aniônica pré-parto

Todos os cátions e ânions de uma dieta são capazes de exercer uma influência sobre a carga elétrica do sangue, sendo que a diferença entre o número de partículas de cátions e de ânions absorvidos pela dieta determina o equilíbrio ácido-base geral e, portanto, o pH do sangue (DeGroot et al., 2010).

A dieta aniônica consiste na suplementação de sais aniônicos na dieta pré-parto de vacas, com o objetivo de diminuir os níveis do pH do sangue. O estado de acidose permite uma maior concentração de Ca_i , no soro, pois aumenta a mobilização de cálcio dos ossos, permite a perda de cálcio urinário e há aumento da absorção de cálcio da dieta através do aumento das concentrações de calcitriol (Goff et al., 2014). A eficácia de acidificação pode ser monitorizada pelo pH, podendo estes serem verificados na urina, o pH pode ser verificado 48 horas ou mais após a mudança de dieta, abaixo de 6.8 é aceitável como indicador da administração correta dos sais aniônicos (Chan et al., 2006).

Os períodos do fornecimento desta dieta podem variar, porém, é sugerido que seja de até 10 dias antes do parto, apesar de 4-5 dias serem tempo suficiente para ocorrer uma acidose metabólica descompensada (Oetzel, 2000). O mecanismo pelo qual a queda do pH afeta o metabolismo e homeostase do cálcio ainda não foi elucidado (Wilkens et al., 2012a). Entretanto, é sugerido que através da diminuição do pH, o PTH é estimulado, aumentando a concentração de hidroxiprolina (aminoácido encontrado fundamentalmente no tecido ósseo) (Goff et al., 2014). A dieta aniônica não é palatável, com isso há maiores chances de diminuir a ingesta alimentar e agravar o BEN, causando outros transtornos metabólicos (Chapinal et al., 2012).

3.3.2 Dieta deficiente em cálcio para estimular a secreção de PTH no pré-parto

Trata-se de uma técnica de manejo nutricional para a prevenção da hipocalcemia através da diminuição nas concentrações de cálcio e fósforo na dieta pré-parto, aumentando as concentrações sanguíneas de calcitriol e PTH (Oetzel, 2013). Com isso no momento do parto e no início da lactação, onde existe um grande direcionamento do cálcio da circulação para a glândula mamária, os níveis sanguíneos destes hormônios aumentam e estimulam uma maior absorção ativa de cálcio no intestino, alterando os mecanismos de reabsorção óssea (Goff, 2008).

A administração de dietas com baixo teor de cálcio (< 20 g/dia) no período pré-parto teve excelentes resultados, mas este método foi praticamente abandonado porque é quase impossível manter a ingestão de cálcio suficientemente baixa (Oetzel, 2013). O aumento da ingestão pré-parto de 60 g/dia de Ca ou < 90 g/dia também foi sugerido. No entanto, a concentração de cálcio no pré-parto teve pouca influência sobre a incidência de febre do leite quando administradas a níveis acima das necessidades diárias, a qual é cerca de 30 g de cálcio por dia em vacas leiteiras (Goff, 2000).

Métodos têm sido estudados para reduzir a absorção do cálcio da dieta. A incorporação de zeólitos (uma partícula de silicato) na dieta, que liga cálcio, é usada para reduzir a absorção intestinal de cálcio. Entretanto, o método é muito complicado, porque grandes quantidades de zeólitos devem ser ingeridas diariamente (0,5-1 kg/dia durante 2 semanas antes do parto) para ter efeito significativo na absorção (Thilsing-Hansen et al., 2002a). Outro método envolve a administração de óleos vegetais, que se ligam cálcio para formar um sabão insolúvel e impedir sua absorção intestinal (Pallesen et al., 2008). Estudos demonstraram claramente que a inclusão de cálcio na dieta aniônica em níveis exigidos pelo National Research Council (NRC, 2001) ou níveis acima do NRC não influenciam o grau de hipocalcemia pela vaca ao parto (Horst et al., 1997).

3.3.3 Administração de calcitriol

Os metabólitos da vitamina D têm efeito hipercalcêmico, aumentando a capacidade de absorção do cálcio e possivelmente aumentando a reabsorção óssea. A maior desvantagem desta estratégia é a dificuldade de predizer a data do parto, uma vez que a vitamina D é mais efetiva entre um e quatro dias antes e também doses repetidas podem ser tóxicas (Goff et al., 2014).

Um estudo foi realizado utilizando um análogo da vitamina D3, o alfa-calcidol (1 α -hidroxivitamina D3). Esse composto é hidroxilado à 1,25-dihidroxivitamina D3 no fígado, com isso esse estimula a absorção intestinal de cálcio da dieta e, também, a mobilização de cálcio dos ossos foi observado que houve redução da incidência de hipocalcemia de 33% para 8,3%. Em vacas leiteiras com histórico de hipocalcemia, a incidência baixou de 50% para 12,5% (Hodnett et al., 1992).

No momento do parto existe uma diminuição na concentração de receptores para vitamina D3 (VDR), o que poderia reduzir a habilidade dos animais em responder ao aumento na concentração sanguínea de calcitriol. Desta forma, a causa indireta da hipocalcemia não seria baixa produção de calcitriol, mas sim na sua atividade nos tecidos alvos (intestino, ossos e rins) para manter constante a concentração de cálcio no sangue no momento do parto (Wilkins et al., 2012a).

3.3.4 Tratamentos com cálcio via oral, subcutâneo e intravenoso

A suplementação oral de cálcio no pós-parto faz com que vacas tenham a capacidade de utilizar o transporte ativo em células intestinais, sendo os melhores resultados obtidos com doses de cálcio entre 50 e 125 g de Ca/dose (Mulligan et al., 2006).

O carbonato de cálcio em água usado como suplemento oral, não aumenta as concentrações de cálcio, isso pode ser explicado por sua baixa disponibilidade e por seu potencial de poder provocar uma alcalose, o que iria enfraquecer a mobilização do cálcio para o sangue. O carbonato de cálcio é usado como suplemento de cálcio para atender as necessidades de cálcio de longa duração. Sua escolha não é adequada como suplemento oral de vacas pós-parto já que a vaca precisa de um acesso rápido ao cálcio adicionado (Oetzel, 2013). Grandes ou repetidas doses de cloreto de cálcio podem induzir a uma acidose metabólica descompensada na vaca,

especialmente se a vaca já está sendo alimentada com dieta aniônica (Goff e Horst, 2003b).

O propionato de cálcio pode servir como um precursor gliconeogênico no momento em que a vaca está no balanço energético negativo. No parto, ele aumenta a glicose no sangue 24 horas após a sua administração, e reduz os ácidos graxos não esterificados durante os dois primeiros dias pós-parto (Liu et al., 2010). O propionato, além de ser uma fonte de três carbonos para síntese de glicose pelo fígado, também fornece cálcio que será absorvido no intestino delgado e pode ajudar na prevenção de hipocalcemia pós-parto (Bunting et al., 2000).

A combinação de cloreto de cálcio e sulfato de cálcio, num revestido Bolus de gordura (Bovicalc, Boehringer Ingelheim Vetmedica), resultou em melhorias na concentração de cálcio no sangue, do que as observadas com cloreto de cálcio e propionato de cálcio diluídos em água (Sampson et al., 2009).

A administração de cálcio subcutâneo é utilizada para auxiliar as concentrações de cálcio no sangue em torno de parto, mas a administração de cálcio por via subcutânea requer perfusão periférica adequada. Ele pode ser ineficaz em vacas que são severamente hipocalcêmicas ou desidratadas (Oetzel, 2013). As injeções subcutâneas de cálcio são irritantes e pode provocar necrose dos tecidos, a administração deve ser limitada. A cinética do cálcio administrado subcutaneamente indica que é bem absorvida inicialmente, mas que as concentrações sanguíneas caem por volta de 6 horas. Assim, doses repetidas são necessárias para igualar a apoio sustentado de cálcio no sangue que é possível com bolus orais de cálcio (Goff, 1999).

A via intravenosa (IV) de cálcio, não é recomendada para o tratamento de vacas que ainda estão de pé. Tratamento com IV de cálcio aumenta rapidamente concentrações de cálcio no sangue e com nível extremamente perigoso. As concentrações podem causar complicações cardíacas fatais e talvez o mais importante, desativar a capacidade própria de uma vaca para mobilizar o cálcio necessário neste tempo crítico. Vacas tratadas com cálcio IV, muitas vezes sofrem uma recaída da hipocalcemia em torno de 12 a 18 horas mais tarde (Oetzel, 2013).

Diante de toda essa problemática é importante que se tenha no mercado farmacêutico veterinário, um produto que auxilie ou previna a hipocalcemia clínica e subclínica em vacas leiteiras, pois a prevalência dessa enfermidade ainda é grande e todas as estratégias que o mercado veterinário possui ainda não conseguiu diminuir esses índices, a proposta para a síntese de um novo produto para a prevenção de

hipocalcemia, não deve agredir o organismo, ser de fácil administração, barato e se possível somente uma administração, na presente Tese fizemos somente uma aplicação do sal a ser testado e observamos sua eficiência no pós-parto recente de vacas leiteiras.

4 Artigos

4.1 Artigo 1

Dynamics of acute phase proteins in dairy cows with subclinical hypocalcemia

J. O. FEIJÓ, R. A. PEREIRA, P. MONTAGNER, F. A. B. DEL PINO, E. SCHMITT
and M. N. CORRÊA

Aceito na revista Canadian Journal of Animal Science

Dynamics of acute phase proteins in dairy cows with subclinical hypocalcemia

J. O. FEIJÓ¹, R. A. PEREIRA¹, P. MONTAGNER¹, F. A. B. DEL PINO¹, E. SCHMITT¹ and
M. N. CORRÊA^{*1}

¹Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária - Livestock Research, Education and Extension Center (NUPEEC – www.ufpel.edu.br/nupeec), Universidade Federal de Pelotas, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brazil.

*Correspondence: Marcio Nunes Corrêa: marcio.nunescorrea@gmail.com).

Abstract

This study was conducted to evaluate the effects of subclinical hypocalcemia (SCH) on serum concentrations of acute phase proteins (APP) during the peripartum period of Holstein cows and to correlate this disorder with biochemical parameters, body condition score (BCS), body weight (BW) and milk production. According to total calcium concentrations (Ca_t) before calving, the animals were divided into two groups: normocalcemic (NC > 8.5 mg/dL, $n = 13$) and SCH (≤ 8.5 mg/dL, $n = 7$).

Blood samples were collected in the pre and postpartum to determine serum concentrations of glucose, aspartate aminotransferase, phosphorus, Ca_t , non-esterified fatty acids (NEFA), insulin and APP: albumin (ALB), haptoglobin (HP) and paraoxonase (PON) were analysed. Prepartum, SCH group showed an increase in HP concentrations and decreased ALB related to NC. Postpartum, SCH group showed a greater decrease in BCS and BW, a reduction in negative acute phase proteins ALB and PON and increased HP, and lower milk production than NC cows. We observed that during the peripartum SCH cows experienced more evident changes in their metabolism, alterations in the synthesis of APP, BCS, BW and milk production, there by demonstrating the importance of calcium homeostasis for health and production of dairy cows.

Key words: Calcium; Dairy cows; Immune system; Peripartum

RÉSUMÉ

Cette étude a été conduite pour évaluer les effets de l'hypocalcémie sous-clinique (HSC) dans les niveaux sériques de protéines dans la phase aiguë (PPA) pendant la période prénatale de vaches Hoolstein et corrélérer cette désordre avec des paramètres biochimiques, score de condition corporelle (SCC), poids corporel (PC) et production de lait. On a utilisé 20 vaches avec trois, ou plus de trois, lactations et aucun historique de désordre clinique dans la dernière lactation. Selon le total des niveaux de calcium (Ca_t) avant le vêlage, les animaux ont été séparé en deux

groupes : normocalcémie (NC > 8.5 mg/dL, n = 13) et hypocalcémie sous-clinique (HSC ≤ 8.5 mg/dL, n = 7).

Des échantillons de sang ont été prélevés au prénatale et au postpartum afin de déterminer les concentrations sériques de glucose, aspartate aminotransférase, phosphore, Ca_t , acides gras non estérifiés, insuline et PPA: albumine (ALB), haptoglobine (HP) et paraoxonase (PON), ont été analysés. Prénatal, le groupe HSC a présenté une augmentation des niveaux de l'HP et une baisse de l'ALB, liée à la NC. Postpartum, le groupe HSC a montré une grande baisse du SCC et du PC, une réduction au négatif des protéines de phase aigüe, ALB et PON et augmentation de l'HP, et moins de production laitière que dans les vaches NC. Nous avons observé que, pendant le prénatale, les vaches HSC ont expérimenté des modifications plus évidentes dans leur métabolisme, par exemple: altérations dans la synthèse de PPA, SCC, PC et production laitière, ce qui démontre l'importance de l'homéostasie du calcium pour la santé et la production des vaches laitières.

Mots-clés: calcium ; vaches laitières ; système immunitaire ; prénatal.

Abbreviations: **ALB**, albumin; **APP**, acute phase proteins; **AST**, aspartate aminotransférase **BCS**, body condition score; **BW**, body weight; **CV**, coefficients of variation; **DMI**, dry matter intake; **EDTA**, ethylenediaminetetraacetic acid; **ELISA**, enzyme-linked immunosorbent assay; **GLU**, glucose; **HP**, haptoglobina; **INS**, insulin; **SCH**, subclinical hypocalcemia; **NEB**, negative energy balance; **NC**, normocalcemic ; **NEFA**, non-esterified fatty acids; **PON**, paraoxonase; **P**, phosphorus **Ca_t**, Total Calcium.

INTRODUCTION

Maintaining the health and productivity of dairy cows in the transition period is one of the most difficult charges for production systems (Chapinal et al. 2012). When mechanisms regulating the body homeostasis are affected in the peripartum period (between three weeks before and after calving), this increases in the prevalence of the “production diseases” highlighting hypocalcemia as one of the most frequent (Oetzel 2013).

Hypocalcemia in cattle is caused by a decrease in calcium concentrations, which typically occurs in early lactation, soon after calving, but may arise before that time or during lactation (Brozos et al. 2011). Cows with serum calcium concentrations between 8 and 5 mg/dL are considered to have subclinical hypocalcemia (SCH) (Reinhardt et al. 2011), which brings as a serious consequence a decrease in dry matter intake (DMI), leading to several metabolic disorders (Brozos et al. 2011), such as retained placenta, uterine prolapse, displaced abomasum (Chapinal et al. 2011), ketosis (Kara 2013) and prolonged anestrus after calving (Chamberlin et al. 2013).

A decrease in calcium concentrations in the blood can also cause a reduction in cell reserves, thus directly damaging the immune response and contributing to a state of immune suppression (Kimura et al. 2006). Cows with SCH have a reduced proportion of neutrophils with phagocytic activity and impaired binding of mononuclear cells with antigen, these events predispose the cow to developing several other diseases, particularly mastitis and metritis (Kimura et al. 2006; Martinez et al. 2012). Additionally, an increase of 1 mg/dL of total serum calcium concentration in cows with SCH (less than 8.59 mg/dL) decreases the relative risk of developing metritis in dairy cows by 22%, demonstrating that calcium is an essential element to the proper functioning of the immune system (Ducusin et al. 2003; Martinez et al. 2012).

During the postpartum period, there is a change in the release of inflammatory mediators, known as acute phase proteins (APP), which are synthesized in the liver. They may

be negative, as in the case of paraoxonase (PON) and albumin (ALB), whose serum concentrations are reduced in response to inflammation (Bionaz et al. 2007), but can also be positive such as haptoglobin (HP), which increases in response to inflammation (Schneider et al. 2013). Several studies have shown that alterations in the concentrations of APP prior to calving can predict the occurrence of postpartum diseases (Sheldon et al. 2001; Huzzey et al. 2009; Schneider et al. 2013; Krause et al. 2014). Markers such as APP can be useful in early detection of subclinical diseases or changes in animal health status, and serve as important tools for managing and monitoring the effectiveness of treatments (Cerón et al. 2005).

Therefore, this study aims to evaluate the effects of subclinical hypocalcemia (SCH) on serum concentrations of APP during the peripartum period of Holstein cows and to correlate this disorder with biochemical parameters, body condition score (BCS), body weight (BW) and milk production. We hypothesized that dairy cows with SCH would have greater changes in APP concentrations during the peripartum period than normocalcemic (NC) cows, since calcium is an important element for the immune system.

MATERIALS AND METHODS

This study was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation at University Federal of Pelotas, registered under the number 23110.

Experimental design

We selected 20 Holstein cows, starting their third or greater lactation with 7891 ± 1184 kg/ 305 days average of milk production in their previous lactation. All animals received the same diet (Table 1 and 2) and were kept under the same environmental conditions on a commercial farm in southern Brazil (32° 16 'S, 52 ° 32' W, elevation of 7 meters) and monitored from 25 days before calving to 23 days after calving. The cows were divided into two groups

according to the serum concentrations of total calcium (Ca_t) before calving: cows with calcium concentrations greater than 8.5 mg/dL were considered normocalcemic (NC; $n = 13$) and those with calcium concentrations lower or equal to 8.5 mg/dL were considered with subclinical hypocalcemia (SCH $n = 7$; lower concentration in at least two blood samples in the prepartum period).

Milk production, BCS and BW

The cows were milked twice daily (3:00 am and 3:00 pm), and milk production (kg/cow) was recorded daily through an automated system (ALPRO Tetra LavalGroup[®], Sweden, Kansas City, USA) from day 16 until 46 after calving, because the system only allowed the collection of information from the 16th day. The animals were evaluated every day from -25 to calving, and we select the specific days -23, -14, -7, -3, 0, 3, 6, 9, 16 and 23 in relation to calving. The BW was measured by a weighing platform (5-EziWeigh TRU-Test[®], Tech Group Farm, Ljutomer, Slovenia) and BCS was rated on a scale of 1 to 5 (Wildman et al. 1982).

Blood sample collection

Blood samples were collected by puncture of the arteriovenous coccygeal complex on days -23, -14, -7, -3, 0, 3, 6, 9, 16 and 23 in relation to calving. The samples were collected into tubes without anticoagulant (10 mL Vacuplast[®], Shandong, China) to obtain serum, centrifuged at 1.800 xg for 15 min and cryopreserved at -80°C for later analysis.

Biochemical analysis

Non-esterified fatty acid (NEFA) blood concentrations were measured using a commercial kit (Wako NEFA-HR, Wako Chemicals[®], USA, Richmond, USA) by the method described by Ballou et al. (2009) and analyzed by a microplate reader (Thermo Plate[®] TP-

Reader, São Paulo, Brazil). The insulin (INS) concentration was analyzed by a commercial ELISA kit (Ins-Easia[®], Source Day, Catalogue number: KAP1251 Louvain-La-Neuve, Belgium, with no cross-reaction for cows) according to Beitinger et al. (2012). PON activity was determined by an enzymatic technique using a commercial kit (ZeptoMetrix[®] Corporation, Buffalo, NY) according to Schneider et al. (2013). The concentration of HP was analyzed by a colorimetric technique described by Jones and Mould (1984) adapted by Schneider et al. (2013) using a microplate reader (Thermo Plate[®] TP-Reader, São Paulo, Brazil). Total Calcium concentrations (Ca_t), ALB, phosphorus (P) and aspartate aminotransferase (AST), glucose (GLU) were measured by a colorimetric spectrophotometer (Biospectro[®], SP-220, Curitiba PR, Brazil) using commercial kits (Labtest Diagnóstica[®], Lagoa Santa, MG, Brazil). The intra and inter assay coefficients of variation (CV) for Ca_t, P, NEFA, PON, HP, INS, GLU, ALB and AST were less than 10%.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed using SAS version 9.1 (SAS[®] Institute Inc., Cary, NC, USA, 2009). The blood concentrations of GLU, ALB, Ca_t, P, AST, HP, INS, NEFA, PON, BW, BCS and milk production were analyzed by analysis of variance (ANOVA) with the MIXED procedure, evaluating the effect of group and time (days) and their interactions. The CORR procedure was used to test the Pearson correlation between the parametric variables within each group. The statistical model and analysis of data considered before calving and after calving separately and values with $P < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

The Ca_t blood concentrations in animals with SCH remained at subclinical concentrations even after calving ($P < 0.001$, Figure 1). During the prepartum period, SCH cows had an increased HP concentration ($P = 0.02$) and reduced ALB ($P < 0.001$). After calving, SCH cows had increased serum concentrations of HP ($P = 0.02$) and decreased of PON ($P = 0.001$) and ALB ($P < 0.001$, Figure 2).

The average serum concentrations of NEFA, GLU, INS, AST, and P were not different between groups, but throughout the prepartum and postpartum periods, some metabolites presented differences. On days -7 and -3 before calving, an increase of the blood NEFA concentration ($P = 0.01$) and AST activity ($P = 0.01$, Table 3) were observed. After calving, on days 6 and 9 there was an increase in AST activity ($P < 0.001$), while on days 0, 3, 6 and 9 the NEFA blood concentration was increased ($P < 0.001$) and on days 16 and 23 the insulin concentration was increased ($P = 0.03$, Table 4).

The SCH cows had reduced BCS ($P = 0.03$) and BW ($P = 0.01$) only after calving (Figure 3). The NC cows produced 28.01 ± 0.75 L milk/cow/day, while the SCH group produced 24.98 ± 1.15 L of milk/cow/day, a difference of 3.03 L between groups ($P = 0.03$).

Correlation analysis on NC cows during the prepartum period showed a positive correlation between BCS and BW ($r = 0.79$; $P < 0.001$), BCS and ALB ($r = 0.46$; $P = 0.02$), BCS and PON ($r = 0.31$; $P = 0.03$), Ca_t and BW ($r = 0.38$; $P = 0.02$), ALB and NEFA ($r = 0.30$; $P = 0.04$), ALB and PON ($r = 0.36$; $P = 0.001$), and PON and INS ($r = 0.33$; $P = 0.01$), P and INS ($r = 0.44$; $P = 0.003$), and a negative correlation between blood GLU and INS ($r = -0.3$; $P = 0.05$), GLU and PON ($r = -0.37$; $P = 0.01$). After calving, there was a positive correlation between BW and BCS ($r = 0.74$; $P < 0.001$), ALB and P ($r = 0.23$; $P = 0.04$), and AST and NEFA ($r = 0.30$; $P = 0.008$), and there was a negative correlation between Ca_t and NEFA ($r = -0.28$; $P = 0.02$), INS and NEFA ($r = -0.36$; $P = 0.001$), NEFA and GLU ($r = -0.25$; $P = 0.03$), and HP and PON ($r = -0.37$; $P = 0.001$).

SCH cows during the prepartum period showed a positive correlation between BW and BCS ($r = 0.90$; $P < 0.0001$), ALB and BW ($r = 0.44$; $P = 0.02$), Ca_t and P ($r = 0.85$; $P = 0.001$), and Ca_t and BW ($r = 0.43$; $P = 0.001$), Ca_t and GLU ($r = 0.41$; $P = 0.03$) and a negative correlation between INS and NEFA ($r = -0.65$; $P = 0.001$), HP and PON ($r = -0.38$; $P = 0.002$). After calving, there was a positive correlation between BW and BCS ($r = 0.68$; $P = 0.0008$) and BW and INS ($r = 0.48$; $P = 0.01$), BW and HP ($r = 0.38$; $P = 0.05$), ALB and NEFA ($r = 0.40$; $P = 0.01$) and a negative correlation between BCS and AST ($r = -0.71$; $P = 0.0001$), ALB and HP ($r = -0.36$; $P = 0.02$) NEFA and Ca_t ($r = -0.36$; $P = 0.03$). Correlations have been summarized in Table S1 and S2 in supplementary material.

DISCUSSION

To the author's knowledge, this is the first report association of SCH with APP in dairy cows. The results presented in this study demonstrate the importance of calcium for the synthesis of APP and the consequences of alterations on these pathways, which may impact dairy cows health and milk production.

It was observed that SCH cows had altered APP synthesis already in the prepartum period. Cows with SCH had decreased ALB and increased HP concentrations pre and postpartum; moreover, there was also a reduction in PON concentrations postpartum. The SCH cows had in the prepartum a negative correlation between PON and HP, and in the postpartum period between ALB and HP, demonstrating that animals with SCH may be more susceptible to inflammatory diseases. According to Schneider et al. (2013) and Krause et al. (2014), a decrease in the concentration of ALB before calving and PON after calving is associated with an increased incidence of uterine diseases.

The APP are induced by proinflammatory cytokines acting as messengers between the local site of injury and the hepatocytes (Gabay et al. 2001), and have been proposed as sensitive

and rapid indicators of inflammatory disorders in ruminants (González et al. 2011). In cattle, HP is effective in the diagnosis and prognosis of mastitis, peritonitis, pneumonia and endocarditis (Murata et al. 2004; Petersen et al. 2004). The PON and ALB negative APP, are associated with fatty liver (Farid et al. 2013).

Calcium is widely important in the mammalian body, acting in cell proliferation, differentiation and motility, muscle contraction, hormone secretion, glycogen metabolism second messenger and as enzyme cofactor (Goff et al. 2014). Therefore the induced of hypocalcemia increased the cortisol and proinflammatory cytokines concentration, causing an acute phase response in the liver (Riond et al. 1999). This result can be related to our data, since the SCH indicated an alteration in APP synthesis.

In a study by Martinez et al. (2012), SCH cows (serum calcium < 8.59 mg/dL) had reduced concentrations of neutrophils in the postpartum period. In addition, a reduction in phagocytic capacity and oxidative burst of neutrophils was observed, which resulted in a 49% increase in the incidence of metritis (64% SCH cows and 15% normocalcemia cows). Martinez et al. (2014) induced SCH but did not observe decreased concentrations of neutrophils, but rather a reduction in the concentration of intracellular calcium. This reduction in the intracellular calcium can impair immune cell responses by decreasing the release of second messengers into the cytoplasm, resulting in lower activity of these cells and making infections more possible to occur, such as metritis and mastitis. The lower concentration of calcium in the SHC associated with an altered synthesis of APP, probably make this group more susceptible to disease.

A higher frequency of metabolic disorders is observed in the peripartum period, when endocrine, nutritional and metabolic disorders occur and require the animal to possess a high capacity for adaptation (Chapinal et al. 2011). When these requirements are not reach there is an energy imbalance known as negative energy balance (NEB), resulting in an increased lipid

mobilization with intense lipolysis of adipose tissue, causing increases in NEFA and β -hydroxybutyrate (BHB), which are synthesized to supply energy demands (Chapinal et al. 2012). In this study, the NEB was not intense because these cows were of medium milk yield, once the NEFA concentrations did not differ between groups.

During the last weeks of pregnancy, cows dramatically decrease DMI as a physiological response to calving mechanisms, reaching concentrations up to 30%, especially in the week before calving (Chapinal et al. 2011). This may explain the positive prepartum correlation between BW and Ca_t and the negative correlation between postpartum Ca_t and NEFA in SCH cows. The NEFA has negative effects on immunity, because they can bind to the toll-like receptor, activating the expression of cytokines, promote an inflammatory response, resulting in an animal more susceptible to various diseases (Sordillo et al. 2009).

The lower milk production in the SCH group can be explained by the decrease in intake caused by, among other factors, a drop in the ruminal motility (Martinez et al. 2014), besides that a greater release of plasma cortisol that could act as a stressor to cow, exacerbating the immunosuppression originally present at calving and also decreasing the DMI (Goff 2000; Oetzel 2000).

Spontaneous hypocalcemia increases serum NEFA concentration which may also affect insulin release (Littledike et al. 1968, Fukao et al. 2004). Experiments with different animal species and *in vitro* with human pancreatic β cells have demonstrated that calcium influx into the cytosol is required to release insulin granules (Witzel and Littledike 1973; Rorsman et al. 2012), justifying the negative correlation in SCH cows in the prepartum period between INS and NEFA. This high correlation may have triggered the decrease of BW and BCS in the postpartum period.

CONCLUSIONS

We observed that a small reduction in Ca_t had a strong relationship with inflammatory mediators, such as APP, which can be associated with impaired postpartum immune function and interfering with productivity performance. Cows with total serum calcium concentrations below 8.5 mg/dL in the prepartum period had altered APP synthesis, leading to postpartum consequences, such as decreased BW, BCS and milk production and probably increasing the chances of the emergence of typical diseases of the peripartum period.

ACKNOWLEDGMENTS

Josiane Feijó was supported by a fellowship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) from the Brazilian Ministry of Education, and the project was approved and accomplished at the Federal University of Pelotas, Department of Clinical Veterinary, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil.

Conflict of interest: All authors declare that they have no conflicts of interest.

REFERENCES

- Ballou M. A., Gomes R. C., Juchem S. O., DePeters E. J. 2009.** Effects of dietary supplemental fish oil during the peripartum period on blood metabolites and hepatic fatty acid compositions and total triacylglycerol concentrations of multiparous holstein cows. *J. Dairy Sci.* **92**: 657-669.
- Beitinger P. A., Fulda S., Dalal M. A., Wehrle R., Keckeis M., Wetter T. C., Han F. 2012.** Glucose tolerance in patients with narcolepsy. *Sleep.* **35**: 231-236.
- Bionaz M., Trevisi E., Calamari L., Librandi F., Ferrari A., Bertoni G. 2007.** Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* **90**: 1740-1750.
- Brozos C., Mavrogianni V. S., Fthenakis G. C. 2011.** Treatment and Control of Periparturient Metabolic Diseases: Pregnancy Toxemia, Hypocalcemia, Hypomagnesemia. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **27**: 105-113.

- Cerón L. L., Eckersall P. D., Martínez-Subiela S., 2005.** Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet. Clin. Pathol.* **34**: 85-99.
- Chamberlin W. G., Middleton J. R., Spain J. N., Johnson G. C., Eilersieck M. R., Pithua P., 2013.** Subclinical hypocalcemia, plasma biochemical parameters, lipid metabolism, postpartum disease, and fertility in postparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* **96**: 7001-7013.
- Chapinal, N., Carson, M., Duffield, T. F., Capel, M., Godden, S., Overton, M., Santos, J. E. P., Leblanc, S. J., 2011.** The association of serum metabolites with clinical disease during the transition period. *J. Dairy Sci.* **94**: 4897-4903.
- Chapinal N., Carson M. E., LeBlanc S. J., Leslie K. E., Godden S., Capel M., Santos J. E. P., Overton M. W., Duffield T. F., 2012.** The association of serum metabolites in the transition period with milk production and early-lactation reproductive performance. *J. Dairy Sci.* **95**: 1301-1309.
- Ducusin R. J., Uzuka Y., Satoh E., Otani M., Nishimura M., Tanabe S., Sarashina T., 2003.** Effects of extracellular Ca^{2+} on phagocytosis and intracellular Ca^{2+} concentrations in polymorphonuclear leukocytes of postpartum dairy cows. *Res. Vet. Sci.* **75**: 27-32.
- Farid A. S., Honkawa K., Fath E. M., Nonaka N., Horii Y. 2013.** Serum paraoxonase-1 as biomarker for improved diagnosis of fatty liver in dairy cows. *BMC Vet Res.* **9**:73.
- Fukao T., Lopaschuk G. D., G. Mitchell A., 2004.** Pathways and control of ketone body metabolism: On the fringe of lipid biochemistry. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* **70**: 243-251.
- Gabay C., Gigley J., Sipe J., Arend W. A., Fantuzzi G. 2001.** Production of IL-1 receptor antagonist by hepatocytes is regulated as an acute-phase protein *in vivo*. *Eur. J. Immunol.* **31**: 490-499.
- Goff J. P., 2000.** Pathophysiology of calcium and phosphorous disorders. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **16**: 319-337.
- Goff J. P., Liesegang A., Horst R. L., 2014.** Diet-induced pseudohypoparathyroidism: A hypocalcemia and milk fever risk factor. *J. Dairy Sci.* **97**: 1-9.
- González F. H., Hernández F., Madrid J., Martínez-Subiela S., Tvarijonaviciute A., Cerón J. J., Tecles F. 2011.** Acute phase proteins in experimentally induced pregnancy toxemia in goats. *J Vet Diagn Invest.* **23**: 57-62.
- Huzzey J. M., Duffield T. F., Leblanc S. J., Veira D. M., Weary D. M., Von Keyserlingk M. A. 2009.** Short communication: Haptoglobin as an early indicator of metritis. *J. Dairy Sci.* **92**: 621-5.

- Jones G. E., Mould D. L. 1984.** Adaptation of the guaiacol (peroxidase) test for haptoglobins to a microtitration plate system. *Res. Vet. Sci.* **37**: 87-92.
- Kara Ç., 2013.** Physiological and metabolic changes during the transition period and the use of calcium propionate for prevention or treatment of hypocalcemia and ketosis in periparturient cows. *J. Environ. Sci.* **7**: 9-7.
- Kimura K., Reinhardt T. A., Goff J. P., 2006.** Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* **89**: 2588-2595.
- Krause A. R. T., Pfeifer L. F. M. , Montagner P., Weschenfelder M. M., Schwegler E., Lima M. E., Xavier E. G., Brauner C. C., Schmitt E., Del Pino F. A. B., Martins C. F., Corrêa M. N., Schneider A. 2014.** Associations between resumption of postpartum ovarian activity, uterine health and concentrations of metabolites and acute phase proteins during the transition period in holstein cows. *Anim. Reprod. Sci.* **145**: 8-14.
- Littlelike E. T., Witzel D. A., Whipp S. C., 1968.** Insulin: Evidence for inhibition of release in spontaneous hypocalcemia. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **129**: 135-139.
- Martinez N., Risco C. A., Lima F. S., Bisinotto R. S., Greco L. F., Ribeiro E. S., Maunsell F., Galvão K., Santos J. E. P., 2012.** Evaluation of periparturient calcium status, energetic profile and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. *J. Dairy Sci.* **95**: 7158-7172.
- Martinez N., Sinedino L. D. P., Bisinotto R. S., Ribeiro E. S., Risco C. A., Gomes G. C., Lima F. S., Greco L. F., Risco C. A., Galvão K., Taylor-Rodriguez D., Driver J. P., Thatcher W. W., Santos J. E., 2014.** Effect of induced subclinical hypocalcemia on physiological responses and neutrophil function in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **97**: 874-887.
- Murata H., Shimada N., Yoshioka M. 2004.** Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet. J.* **168**: 28-40.
- Oetzel G R., 2000.** Management of dry cows for the prevention of milk fever and other mineral disorders. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **16**: 369-386.
- Oetzel, G. R., 2013.** Oral Calcium Supplementation in Periparturient Dairy Cows. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **29**: 447-455.
- Petersen H. H., Nielsen J. P., Heegaard P. M. H. 2004.** Application of acute phase protein measurement in veterinary clinical chemistry. *Vet. Rec.* **35**: 163-187.
- Reinhardt T. A., Lippolis J. D., McCluskey B. J., Goff J. P., Horst R. L., 2011.** Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. *Vet. J.* **188**: 122-124.

- Riond J. L., Liesegang A., Wanner M., Kaiser C., Döbeli M., Joller-Jemelka H. I. 1999.** Effects of EDTA-induced hypocalcaemia and stress on plasma TNF-alpha, IL-1-ra, G-CSF, GM-CSF and S-100 in dairy cows. *Vet Res Commun.* **23**: 299-306.
- Rorsman P., Braun M., Zhang Q., 2012.** Regulation of calcium in pancreatic α - and β -cells in health and disease. *Cell Calcium.* **51**: 300-308.
- Sordillo L. M., Contreras G. A., Aitken S. L. 2009.** Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows. *Anim Health Res Rev.* **10**: 53-63.
- Schneider A., Corrêa M. N., Butler W. R. 2013.** Short communication: acute phase proteins in holstein cows diagnosed with uterine infection. *Res Vet Sci.* **95**: 269-271.
- Sheldon I. M., Noakes D. M., Rycroft A., Dobson H., 2001.** Acute phase protein responses to uterine bacterial contamination in cattle after calving. *Vet. Rec.* **148**: 172-175.
- Wildman E. E., Jones G. M., Wagner P. E., Boman R. L., Troutt H. F., Lesch T. N. 1982.** A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *J. Dairy Sci.* **65**: 495-501.
- Witzel D.A., Littledike E.T. 1973.** Suppression of insulin secretion during induced hypocalcemia. *Endocrinology.* **93**: 761-766.

Figures

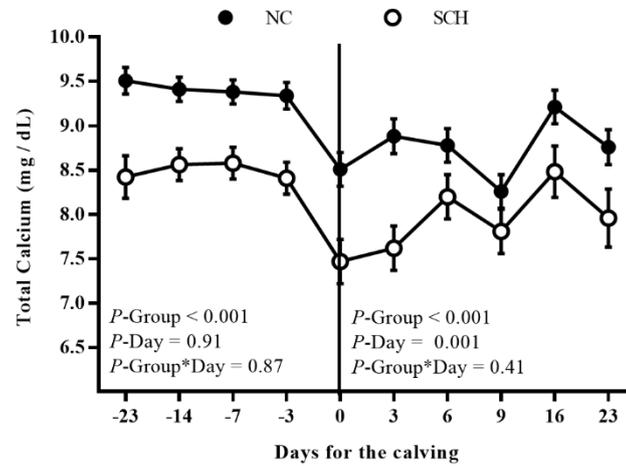


Figure 1. Total calcium serum concentrations (mg / dL) during the peripartum period of Holstein cows with subclinical hypocalcemia (SCH) and normocalcemic cows (NC). SCH was defined as serum total calcium ≤ 8.5 mg/dL. $P \leq 0.05$ indicates significant values.

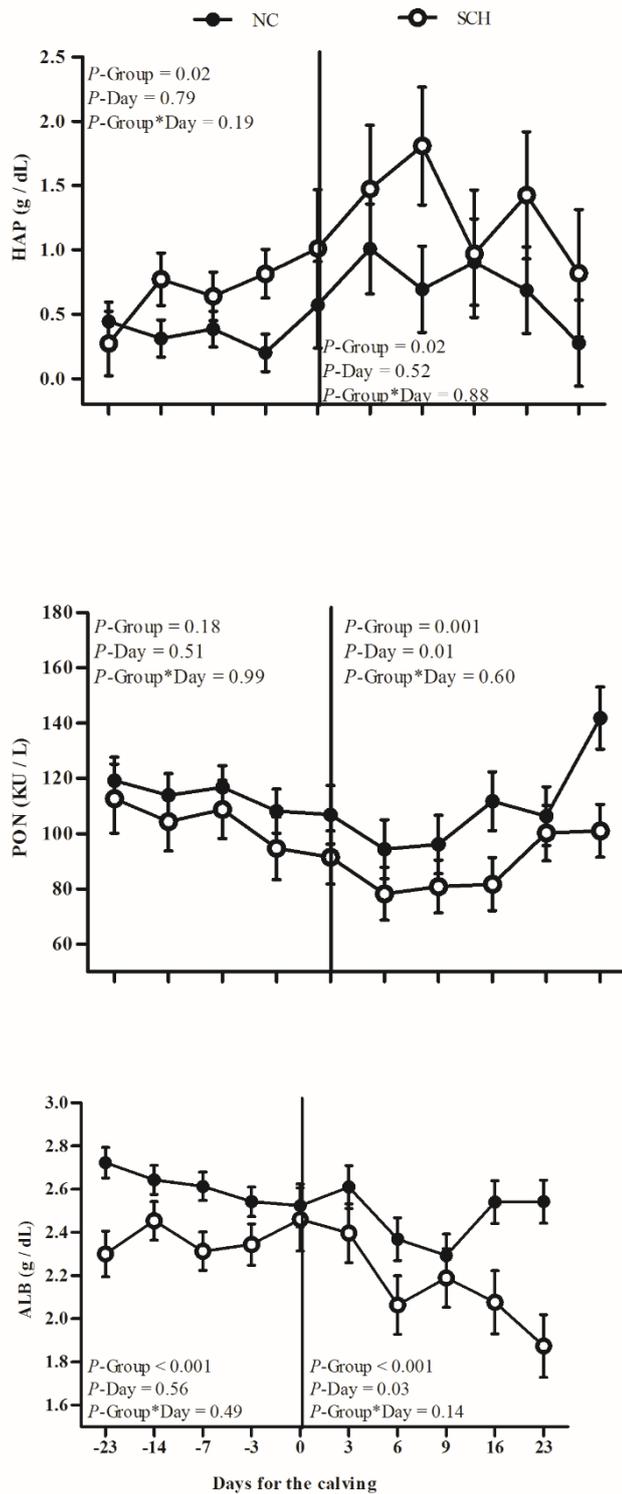


Figure 2. Serum concentrations of acute phase proteins, haptoglobin (HP – g / dL), albumin (ALB – g / dL), paraoxonase (PON – KU / L) in peripartum dairy cows with subclinical hypocalcemia (SCH) and normocalcemic (NC). $P \leq 0.05$ value indicates significant values.

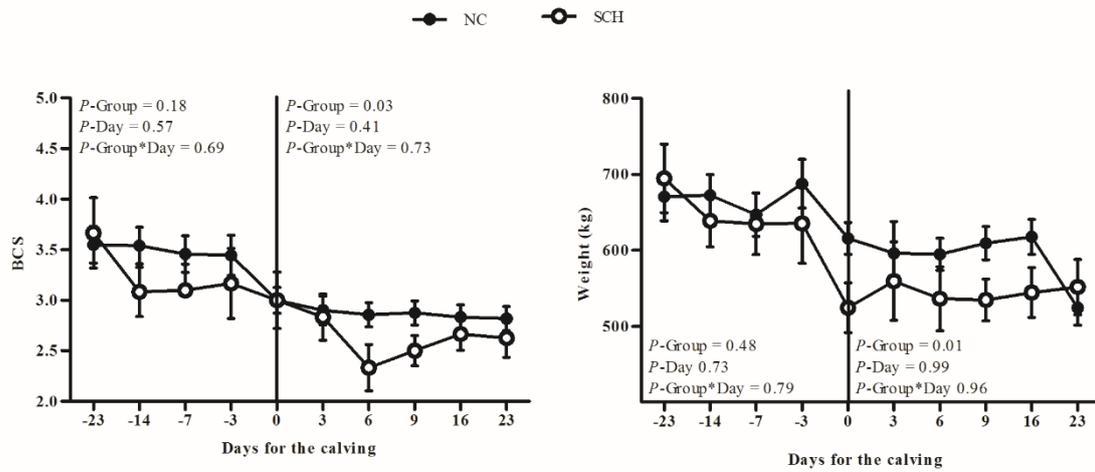


Figure 3. Body condition score (BCS) and body weight (BW) of Holstein cows with subclinical hypocalcemia (SCH) and normocalcemic cows (NC) in the peripartum period. $P \leq 0.05$ value indicates significant values

Table 1: Ingredients (kg) of diets offered to the animals before and after calving during the trial period

Food	Prepartum	Postpartum
Native pasture	<i>Ad libitum</i>	-
Forage sorghum	-	<i>Ad libitum</i>
Haylage	-	15
Wheat bran	0.5	1.5
Soybean meal	1	2.4
Rice bran	0.68	2.88
Ground corn	1.05	3
Ground sorghum	1.05	2.13
Mineral supplement	0.4	0.11
Urea	-	0.09
Sodium bicarbonate	-	0.19
Limestone	0.12	0.19
Salt	-	0.002
Protected fat	0.2	-

Table 2: Nutritional composition of diets offered to the animals before and after calving during the trial period.

	<i>Prepartum (%)</i>		<i>Postpartum (%)</i>		
	Forage	Concentrate	Forage	Haylage	Concentrate
Dry Matter	89.2	87.67	27.4	52.94	87.31
NDF ¹	67.65	47.42	64.32	63.46	32.57
ADF ²	51.37	13.56	41.74	45.75	13.14
Protein	9.16	15.61	9.84	8.88	14.92
Ether extract	1.73	3.57	2.02	2.00	4.01
Total mineral	9.23	8.9	9.99	8.84	9.02

¹NDF- Neutral detergent fiber; ²ADF- Acid detergent fiber

Table 3: Serum NEFA concentrations (mmol/L), glucose (mg/dL), insulin (U/L), AST (U/L) and phosphorus (mg/dL) during the prepartum period in cows with subclinical hypocalcemia (SCH) and in normocalcemic cows (NC).

Parameter	-23		-14		-7		-3		Value <i>P</i>		
	NC	SCH	NC	SCH	NC	SCH	NC	SCH	Group	Day	Group*Day
NEFA ¹ (mmol/L)	0.33±0.05 ^B	0.30±0.06 ^B	0.36±0.04 ^B	0.32±0.06 ^B	0.41±0.04 ^A	0.40±0.06 ^A	0.43±0.04 ^A	0.53±0.09 ^A	0.94	0.01	0.15
Glucose (mg/dL)	64.79±5.61 ^A	69.77±10.75 ^A	69.02±5.61 ^A	63.71±7.03 ^A	68.68±5.37 ^A	74.27±7.03 ^A	67.29±5.61 ^A	61.84±7.03 ^A	0.99	0.73	0.74
Insulin (μU/L)	11.61±2.93 ^A	18.42±4.35 ^A	14.42±2.69 ^A	14.85±3.68 ^A	12.20±2.69 ^A	10.45±3.67 ^A	10.22±2.80 ^A	4.11±3.67 ^A	0.95	0.08	0.32
AST ² (U/L)	60.08±4.51 ^B	57.29±6.15 ^B	57.91±4.9 ^B	60.14±6.15 ^B	78.73±4.91 ^A	68±9.39 ^A	81.33±4.69 ^A	68.42±6.15 ^A	0.16	0.01	0.53
Phosphorus (mg/dL)	7.07±1.24 ^A	7.16±1.24 ^A	7.10±1.14 ^A	10.47±1.19 ^A	4.22±2.05 ^A	7.64±1.56 ^A	6.53±1.56 ^A	8.47±1.56 ^A	0.30	0.08	0.66

¹NEFA- non-esterified fatty acids, ²AST- aspartate aminotransferase. ^{A, B} different capital letters in the same line indicate difference between the days. $P \leq 0.05$ value indicates significant values; Group*Day (P value for the interaction between group and day).

Table 4: Serum NEFA concentrations (mmol/L), glucose (mg/dL), insulin (U/L), AST (U/L) and phosphorus (mg/dL) during the postpartum period in cows with subclinical hypocalcemia (SCH) and in normocalcemic cows (NC).

Parameter	0		3		6		9		16		23		Value <i>P</i>		
	NC	SCH	NC	SCH	NC	SCH	NC	SCH	NC	SCH	NC	SCH	Group	Day	Group*Day
NEFA ¹ (mmol/L)	0.65±0.1 ^A	0.71±0.1 ^A	0.53±0.1 ^A	0.60±0.1 ^A	0.62±0.1 ^A	0.73±0.1 ^A	0.84±0.1 ^A	0.71±0.1 ^A	0.42±0.1 ^B	0.30±0.14 ^B	0.33±0.1 ^B	0.25±0.15 ^B	0.82	<0.001	0.74
Glucose (mg/dL)	84.55±9.2 ^A	81.71±10.1 ^A	83.01±9.6 ^A	78.09±12.1 ^A	74.98±9.2 ^A	80.31±13 ^A	77.23±9.2 ^A	65.82±12.0 ^A	81.07±9.6 ^A	73.11±14.3 ^A	81.20±8.8 ^A	80.83±16.01 ^A	0.58	0.92	0.98
Insulin (μU/L)	12.67±2.6 ^{A,B}	8.53±3.5 ^{A,B}	13.62±2.6 ^{A,B}	10.72±3.5 ^{A,B}	6.54±2.6 ^B	6.86±3.5 ^B	9.92±2.6 ^{A,B}	15.19±3.5 ^{A,B}	13.62±2.6 ^A	19.24±3.8 ^A	20.10±2.60 ^A	12.53±3.84 ^A	0.76	0.03	0.25
AST ² (U/L)	75.38±5.2 ^B	51.17±7.7 ^B	60.00±5.4 ^B	66.86±7.1 ^B	81.08±5.2 ^A	91.86±7.1 ^A	77.42±5.4 ^A	76.85±7.2 ^A	62.50±5.4 ^B	63.80±8.4 ^B	62.92±5.23 ^B	76.80±8.43 ^B	0.73	<0.001	0.07
Phosphorus (mg/dL)	6.91±0.4 ^A	6.77±0.5 ^A	6.12±0.4 ^A	6.05±0.5 ^A	6.10±0.4 ^A	6.53±0.5 ^A	5.89±0.4 ^A	7.06±0.5 ^A	5.79±0.4 ^A	6.77±0.5 ^A	5.85±0.4 ^A	6.18±0.59 ^A	0.10	0.56	0.64

¹NEFA- non-esterified fatty acids, ²AST- aspartate aminotransferase. ^{A, B} different capital letters in the same line indicate difference between the days. $P \leq 0.05$ value indicates significant values; Group*Day (*P* value for the interaction between group and day).

Table 1S: Correlation of zootechnical and metabolic indices, during the pre-partum period in cows with subclinical hypocalcemia (SCH) and in normocalcemic cows (NC).

Pre-partum NC	BSC ¹	BW ²	NEFA ³	INS ⁴	ALB ⁵	HP ⁶	PON ⁷	GLU ⁸	Ca _t ⁹	P ¹⁰	AST ¹¹
Body condition score ¹	.	+0.79*	+0.34*	+0.34*	+0.46*	-0.16	+0.31*	-0.01	+0.38*	+0.35*	-0.16
Body weight ²	.	.	+0.29	+0.32*	+0.14	-0.07	-0.02	+0.04	+0.16	+0.31*	-0.07
Non-esterified fatty acids ³	.	.	.	-0.25	+0.30*	+0.05	-0.01	-0.32*	-0.02	-0.03	-0.09
Insulin ⁴	+0.17	-0.06	+0.33*	-0.32*	-0.04	+0.44*	+0.13
Albumin ⁵	+0.07	+0.36*	+0.02	+0.39	+0.16	-0.14
Haptoglobin ⁶	+0.09	+0.12	+0.11	-0.22	+0.01
Paraoxonase ⁷	-0.37*	+0.08	+0.24	+0.09
Glucose ⁸	-0.19	-0.08	+0.12
Total calcium ⁹	+0.20	-0.14
Phosphorus ¹⁰	-0.15
Aspartate aminotransferase ¹¹
Pre-partum SCH	BSC	BW	NEFA	INS	ALB	HP	PON	GLU	Ca _t	P	AST
Body condition score ¹	.	+0.90*	-0.03	+0.38	+0.38	+0.11	+0.17	-0.07	-0.36	-0.40	-0.39
Body weight ²	.	.	+0.20	+0.26	+0.44*	-0.02	+0.11	-0.12	+0.43*	-0.26	-0.25
Non-esterified fatty acids ³	.	.	.	-0.65*	+0.13	+0.06	-0.16	+0.17	-0.17	+0.18	+0.24
Insulin ⁴	+0.20	-0.27	+0.19	-0.15	-0.15	-0.33	-0.21
Albumin ⁵	+0.07	-0.07	-0.07	-0.30	-0.33	-0.05
Haptoglobin ⁶	-0.38*	-0.11	-0.01	-0.10	-0.16
Paraoxonase ⁷	+0.30	-0.24	+0.29	-0.19
Glucose ⁸	+0.41*	+0.17	-0.03
Total calcium ⁹	+0.85*	+0.13
Phosphorus ¹⁰	-0.09
Aspartate aminotransferase ¹¹

Indicate statistical difference $P \leq 0.05$

Table 2S: Correlation of zootechnical and metabolic indices, during the postpartum period in cows with subclinical hypocalcemia (SCH) and in normocalcemic cows (NC).

Postpartum NC	BSC ¹	BW ²	NEFA ³	INS ⁴	ALB ⁵	HP ⁶	PON ⁷	GLU ⁸	Ca _t ⁹	P ¹⁰	AST ¹¹
Body condition score ¹	.	+0.74*	+0.17	-0.06	-0.11	-0.04	+0.06	+0.12	+0.06	+0.02	-0.01
Body weight ²	.	.	+0.16	-0.07	-0.06	+0.08	-0.01	+0.02	+0.11	+0.06	-0.26
Non-esterified fatty acids ³	.	.	.	-0.36*	-0.04	+0.20	-0.11	-0.25*	-0.28*	+0.04	+0.30*
Insulin ⁴	-0.15	-0.01	+0.14	+0.15	+0.07	+0.24*	-0.27*
Albumin ⁵	-0.04	-0.04	-0.13	+0.11	+0.24*	-0.15
Haptoglobin ⁶	-0.37*	+0.14	-0.15	-0.23*	-0.06
Paraoxonase ⁷	-0.01	-0.09	+0.12	+0.09
Glucose ⁸	-0.23*	-0.04	-0.14
Total calcium ⁹	+0.05	+0.13
Phosphorus ¹⁰
Aspartate aminotransferase ¹¹
Postpartum SCH	BSC ¹	BW ²	NEFA ³	INS ⁴	ALB ⁵	HP ⁶	PON ⁷	GLU ⁸	Ca _t ⁹	P ¹⁰	AST ¹¹
Body condition score ¹	.	+0.66*	-0.05	+0.11	+0.09	+0.30	-0.05	-0.07	+0.12	-0.09	-0.71*
Body weight ²	.	.	+0.20	+0.48*	+0.04	+0.38*	-0.03	+0.22	-0.01	+0.37*	-0.34
Non-esterified fatty acids ³	.	.	.	-0.05	+0.40*	+0.06	-0.14	+0.02	-0.35*	-0.06	+0.19
Insulin ⁴	-0.23	+0.13	-0.01	-0.05	-0.07	-0.03	-0.19
Albumin ⁵	-0.36*	+0.24	+0.17	-0.13	+0.01	-0.01
Haptoglobin ⁶	-0.16	+0.31*	-0.02	+0.14	-0.15
Paraoxonase ⁷	+0.25	-0.19	+0.15	-0.24
Glucose ⁸	-0.27	+0.07	-0.06
Total calcium ⁹	-0.17	+0.06
Phosphorus ¹⁰	+0.06
Aspartate aminotransferase ¹¹

* Indicate statistical difference $P \leq 0.05$

4.2 Artigo 2

**Diferentes dietas cátion-aniônica na prevenção de hipocalcemia sobre
avaliação hemogasométrica e parâmetros bioquímicos clínicos de vacas
leiteiras**

J. O. FEIJÓ, R. A. PEREIRA, C. PIZONI, F. A. B. DEL PINO, E. SCHMITT, M. N.
CORRÊA

Será submetido à revista Arquivos de Medicina Veterinária e Zootecnia

Diferentes dietas cátion-aniônica na prevenção de hipocalcemia sobre avaliação hemogasométrica e parâmetros bioquímicos clínicos de vacas leiteiras

J. O. FEIJÓ¹, R. A. PEREIRA¹, C. PIZONI¹, F. A. B. DEL PINO¹, E. SCHMITT¹, M. N. CORRÊA¹

¹Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC - www.ufpel.edu.br/nupeec), Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Clínicas Veterinária, sala 8A. CEP: 96010-900, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

*Correspondência do autor:

Marcio Nunes Corrêa

E-mail: marcio.nunescorrea@gmail.com

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a hemogasometria e metabólitos nas primeiras horas pós-parto de vacas leiteiras que receberam diferentes dietas cátion-aniônica no pré-parto. Foram selecionadas 14 vacas da raça holandês, múltiparas entre a terceira e quarta lactação. Divididas em dois grupos, dieta ANIÔNICA (-41 mEq/ 100g Matéria seca; n=7) e dieta NEUTRA (-3mEq/100g Matéria seca; n=7) distribuídas aleatoriamente nos grupos conforme o escore de condição corporal (ECC). As amostras de sangue foram coletadas aos 21 ou 15 dias antes do parto e após o parto nas horas 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60 e 72, sempre após a ordenha. Para verificar a concentração sérica de cálcio ionizado (Ca_i), pH (potencial hidrogênio iônico) HCO_3 (bicarbonato), pCO_2 (pressão parcial de gás carbônico), pO_2 (pressão de oxigênio), sO_2 (saturação do oxigênio), TCO_2 (teor de gás carbônico), N^+ (sódio), K^+ (potássio), hemoglobina (HB) e hematócrito (HTC) e glicose (GLI), cálcio total (CaT), magnésio (Mg), albumina (ALB), ureia (URE), gama glutamiltransferase (GGT), proteínas totais (PPT), e creatinina (CRE). Em relação aos metabólicos, observa-se que a concentração de Ca_i são maiores, as de PPT e GGT são menores no grupo ANIÔNICA comparadas com o grupo dieta NEUTRA, nos índices hemogasométricos observa-se que a concentração do pH, HCO_3 e TCO_2 são menores no grupo ANIÔNICA. Em até 72 horas após o parto o equilíbrio ácido-básico ainda não é totalmente reestabelecido, com isso ocorre aumento da concentração de Ca_i , mas isso não implica que esse irá fazer seu papel no organismo, pois o pH ácido altera receptores de cálcio na célula. Além disso há diminuição das PPT as quais não foram alteradas devido a albumina, ocorrendo menor síntese ou até mesmo maior eliminação de globulinas. É importante que o equilíbrio-ácido básico seja reestabelecido rapidamente, pois a alteração do pH sanguíneo por um tempo prolongado pode diminuir a concentração de globulinas no organismo, podendo afetar a imunidade da vaca e pode acentuar a ocorrência de doenças pós-parto.

Palavras- Chave: ácido-base, hipocalcemia subclínica, hemogasometria

Abstract

The aim of this study was to evaluate the blood gas analysis and metabolites in the first hours postpartum dairy cows receiving different cation-anion diets during labor. We selected 14 cows of the Dutch race, multiparous between the third and fourth lactation. Divided into two groups, ANIÔICA diet (-41 mEq / 100 g dry matter; n = 7) and NEUTRAL diet (- 3mEq / 100g dry matter; n = 7) randomly distributed in groups according to body condition score (BCS). Blood samples were collected after 21 or 15 days before delivery and after delivery hours at 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60 and 72, always after milking. To check the serum ionized calcium (Ca_i), pH (potential hydrogen ion) HCO_3 (bicarbonate), pCO_2 (partial pressure of carbon dioxide), pO_2 (oxygen pressure), SO_2 (oxygen saturation), TCO_2 (content carbon dioxide), Na^+ (sodium), K^+ (potassium), hemoglobin (Hb) and hematocrit (HTC) and glucose (GLU), total calcium (Ca_t), magnesium (Mg), albumin (ALB), urea (URE) , gamma glutamyl transferase (GGT), total protein (PPT) and creatinine (CRE). It is observed that Ca_i concentrations are higher, the PPT and GGT are smaller in anionic group compared with the NEUTRAL diet group, the blood gas indices is observed that the concentration of the pH, HCO_3 and TCO_2 are smaller the anionic group. In up to 72 hours after delivery the acid-basic is not yet fully re-established, thus there is an increased concentration of Ca_i , but this does not imply that this will make its role in the body because the pH acid alters calcium receptor cellular. In addition there is a reduction of PPT which has not changed because albumin, occurring less synthesis or even greater elimination of globulins. It is important that the acid-base balance is reestablished rapidly since the change in blood pH for an extended time can decrease the concentration of globulins in the body, which may affect the immunity of the cow and can accentuate the occurrence of postpartum diseases.

Key-words: acid-base, subclinical hypocalcemia, blood gas analysis

Introdução

O período do periparto da vaca leiteira, o qual compreende três semanas pré e três pós-parto, é caracterizado por importantes alterações endócrinas, metabólicas e nutricionais que exigem do animal uma alta capacidade de adaptação (Chapinal et al., 2012). Manter a saúde e produtividade neste período é uma das tarefas mais difíceis para rebanhos leiteiros, pois aproximadamente 75% das doenças acontecem no primeiro mês após o parto (LeBlanc et al., 2006). Durante as últimas semanas de gestação o animal diminui drasticamente a ingestão de matéria seca (IMS) como resposta fisiológica aos mecanismos do parto, podendo atingir níveis de até 30% especialmente na semana anterior ao parto (Chapinal et al., 2011).

Neste período, o requerimento de cálcio total (Ca_t) de uma vaca leiteira varia. No pré-parto, as necessidades são de aproximadamente 30g/dia, sendo este direcionado para o feto e para a glândula mamária. Já no pós-parto imediato, há uma perda de cálcio de aproximadamente 2,1g/L direcionados para a produção de colostro, sendo esta quantidade 9 vezes superior a todo Ca_i (cálcio ionizado) plasmático. Para a produção de leite, as perdas deste são em torno de 1,22g/L (Fox e Tylutki, 1998), aumentando, com isso as necessidades diárias, que podem chegar até 100g/dia (Fox e Tylutki, 1998, DeGaris et al., 2010). Para manter os níveis fisiológicos de Ca_t circulante é necessário que o organismo ative mecanismos homeostáticos (Martinez et al., 2012, Goff, 2014). Quando estes mecanismos de regulação falham, os animais podem desenvolver manifestações clínicas nas primeiras 72 horas em relação ao parto (Goff, 2008). No animal hipocalcêmico pode ocorrer uma casacata de eventos como, diminuição da IMS, síndrome da vaca caída (Brozos et al., 2011), retenção de placenta, prolapso do útero, deslocamento de abomaso (Chapinal et al., 2011), cetose (Kara, 2013) e redução no desempenho reprodutivo devido ao prolongamento do anestro pós-parto (Martinez et al., 2012). A diminuição dos níveis de cálcio no sangue, também pode causar uma redução de suas reservas celulares, prejudicando de forma direta a resposta imune, contribuindo para um estado de supressão imunitária (Martinez et al., 2012). Atualmente há no mercado veterinário algumas estratégias para a prevenção da hipocalcemia, como: dieta deficiente de cálcio, administração de vitamina D3, aplicação de paratormônio (PTH) no pré-parto e administração de cálcio oral no pós-parto recente, a estratégia mais adotada é o fornecimento de dieta aniônica no pré-parto, essa é baseada no fornecimento de sais aniônicos e com isso, assim reduzir o BCAD (Balanço cátion-aniônico da dieta) (Goff et al., 2014).

O BCAD representa a diferença entre os cátions e os ânions presentes na dieta, podendo ser calculado em mEq de $(Na+K) - (Cl^- + SO_4^-)$ por 100g de matéria seca (MS). Para que se

tenha uma adequada dieta aniônica é necessário que a soma dos miliequivalentes (mEq) dos seus ingredientes seja de aproximadamente -10 a -20 mEq/100g MS. Sua principal ação é atuar na regulação do equilíbrio ácido-base, ou seja, na regulação da concentração do íon hidrogênio nos líquidos corporais (Apper-Bossard et al., 2010), ela pode influenciar os parâmetros ácido-base do sangue, sendo que as variáveis mais afetadas são a concentração plasmática de bicarbonato (HCO_3^-) e o pH (Hu and Murphy, 2004). A dieta aniônica consiste na suplementação de sais aniônicos, com o objetivo de diminuir os níveis do pH do sangue. O estado de acidose permite uma maior concentração de Ca_i , no soro, pois aumenta a mobilização de cálcio dos ossos, permite a perda de cálcio urinário e há aumento da absorção de cálcio da dieta através do aumento das concentrações de calcitriol (Goff et al., 2014). A eficácia de acidificação pode ser monitorizada pelo pH, podendo estes serem verificados na urina, o pH pode ser verificado 48 horas ou mais após a mudança de dieta, abaixo de 6.8 é aceitável como indicador da administração correta dos sais aniônicos (Chan et al., 2006).

A resposta do organismo animal à adição da dieta aniônica é rapidamente perceptível, em 48 horas após o início do fornecimento dessa, o pH sanguíneo já estará levemente acidificado (Tucker et al., 1988). Porém acredita-se que seja necessário de cinco a sete dias para que o efeito da redução do pH sanguíneo se manifeste nos mecanismos de homeostase do cálcio, contudo nos sistemas produtivos o uso desta dieta é geralmente indicado durante no mínimo 21 dias (Oetzel, 1991). Sendo assim, a hipótese deste trabalho é que o fornecimento de diferentes dietas cátion-aniônica durante o pré-parto, influencia os índices hemogasométricos e bioquímicos no pós-parto recente de vacas leiteiras. Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar a hemogasometria e parâmetros metabólitos nas primeiras horas pós-parto de vacas leiteiras que receberam diferentes dietas cátion-aniônica no pré-parto.

Materiais e Métodos

Animais

Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas registrado pelo número 23110. Sendo realizado em uma propriedade leiteira ao sul do Rio Grande do Sul, no município de Rio Grande, nas coordenadas geográficas 32 ° 16 'S, 52 ° 32' L. Foram selecionadas 14 vacas da raça holandês, múltiparas entre terceira e quarta lactação, em período gestacional. Divididas em dois grupos, dieta ANIÔNICA (n=7) e dieta NEUTRA (n=7) distribuídas aleatoriamente nos grupos conforme o escore de condição corporal (ECC) (Hady et al., 1994). No grupo dieta ANIÔNICA (n=7) a

alimentação foi de acordo com o rebanho da propriedade (-41,40mEq/100g MS) e grupo dieta NEUTRA (n=7) (Tabela 1) a alimentação foi balanceada (-3 mEq/100g MS), ambas foram fornecidas 30 dias antes do parto. O pH da urina foi verificado no pré-parto através do phmetro de bancada (TecnoPON,PA-210- SP, Brasil), sendo analisado de 3 em 3 dias a partir do início da suplementação. A análise bromatológica e mineral da pastagem, silagem e do concentrado fornecido para os diferentes grupos foi realizada pelo laboratório 3rLab através do método de *Near Infrared spectroscopy* (NIRS- Minas Gerais, Brasil) (Tabela 1). Devido ao número limitado de animais avaliados e os resultados promissores que foram encontrados, este pode ser considerado como um estudo inicial que garante mais investigação com um número maior de animais.

Tabela1. Ingredientes e composição nutricional da dieta pré-parto, dos animais do grupo dieta aniônica e neutra

Ingredientes (%)	Palha de arroz	Pastagem	Concentrado*	Concentrado*	Silagem	BDCA
Dieta Aniônica	33,3	25	41,6	-	-	-27,13mEq/100gMS
Dieta Neutra	16,8	8,3	-	41,6	33,3	-3,25mEq/100g MS
Composição Nutricional (%)						
Matéria Seca	82,59	94,23	94,67	93,72	33,22	
Proteína Bruta	7,84	19,98	22,65	22,78	6,35	
FDN ¹	74,32	47,41	28,05	16,60	31,95	
FDA ²	54,16	31,02	18,59	9,70	3,91	
Lignina	-	2,95	-	-	7,76	
Lipídeos (EE)	1,72	1,90	2,95	7,55	3,78	
Cinzas	17,08	11,50	9,46	12,14	4,32	
Cálcio	-	0,69	1,46	1,73	0,18	
Fósforo	-	0,29	0,82	1,26	0,23	
Potássio	-	3,02	1,26	1,30	0,97	
Magnésio	-	0,18	0,61	0,73	0,18	
Enxofre	-	0,20	1,05	0,90	0,10	

¹Concentrado composto por 33,7% de Milho Moído, 28% de Farelo de Soja, 30% de Farelo de Arroz, 3,3% de Calcário, 4% de Sal Aniônico e 1% de Premix Vitamínico. ²PIDN %PB - Proteína insolúvel em detergente neutro relativa a % de proteína bruta ³PIDEA%PB - Proteína insolúvel em detergente ácido relativa a % de proteína bruta; ⁴FDN - Fibra detergente neutra; ⁵FDA - Fibra detergente Ácida; ⁶DCAD - Dieta cátion-aniônica. Dcad aniônica:-27,13mEq/100g; Dcad neutra: -3,25mEq/100g

Amostras de sangue

As coletas de sangue (10mL) de ambos os grupos foram realizadas por punção do complexo arterio-coccigeo, utilizando o sistema Vacutainer (BD Diagnostics, São Paulo, Brasil) em um tubo sem nenhuma solução, para obtenção de soro para a realização das análises.

Foram coletadas amostras de sangue nos dias (21 ou 15 dias antes do parto, o qual foi considerado -1) e após o parto nas horas 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60 e 72. Para verificar a concentração sérica de cálcio ionizado (Cai), pH (potencial hidrogênio iônico) HCO₃⁻ (bicarbonato), pCO₂ (pressão parcial de gás carbônico), pO₂ (pressão de oxigênio), sO₂ (saturação do oxigênio), TCO₂ (teor de gás carbônico), Na⁺(sódio), K⁺ (potássio), hemoglobina (HB) e hematócrito (HTC) e glicose (GLI) foi utilizado o medidor bioquímico portátil I-Stat (Abboot -EUA) utilizando cartuchos GC+8.

Imediatamente após as coletas, o cartucho CG8+ era preenchido com sangue e a leitura era verificada no I-Stat, o restante do sangue foi submetido à centrifugação a 1800 x g para obtenção do soro, as quais foram divididas em 2 microtubos de 1,5 mL e congelados a -80 °C, para posterior análise de, cálcio total (CaT), magnésio (Mg), albumina (ALB), ureia (URE),

gama glutamiltransferase (GGT), proteínas totais (PPT), e creatinina (CRE), estes foram realizados utilizando kits comerciais (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil), por calorimetria, sendo as análises realizadas no aparelho bioquímico automático (Lambax Plenno- Labtest Diagnóstica S.A., Brasil).

Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando SAS versão 9.1 (SAS ® Institute Inc., Cary, NC, EUA, 2009). As concentrações sanguíneas de todos os metabólitos e índices hemogasométricos, foram analisados por análise de variância (ANOVA) com o procedimento MIXED para avaliar o efeito de grupo e horas e suas interações e Qui Quadrado para avaliação de frequência de hipocalcemia subclínica ou não. Foi considerado diferença estatística $P \leq 0,05$.

Resultados

Nenhum animal apresentou hipocalcemia clínica durante o experimento. Os resultados da verificação do pH da urina ficaram em média: grupo ANIÔNICA 5,8 e do grupo dieta NEUTRA 7,7, comprovando a eficácia da dieta aniônica, que segundo Goff (2014), uma dieta aniônica eficiente o pH da urina.

Avaliando individualmente as concentrações de Ca_i de cada animal foi possível observar que 66,7% dos animais que receberam dieta NEUTRA tiveram hipocalcemia subclínica ($Ca_i \leq 4\text{mg/dL}$) em pelo menos um ponto da análise pós-parto, já o grupo dieta ANIÔNICA apresentaram 33,3% dos animais ($P \leq 0,05$), mesmo que não tenha havido diferença entre os grupos durante o período ($P > 0,05$). Observa-se que há maiores concentrações de Ca_i nas vacas que receberam dieta ANIÔNICA ($P = 0,002$ - Figura 1A) em relação as que receberam dieta NEUTRA, o mesmo não foi observado nas concentrações de Ca_t (Figura 1B).

Há uma diminuição o pH sérico nos animais que receberam dieta ANIÔNICA ($P = 0,005$ –Figura 1C) em relação aos animais que receberam dieta NEUTRA, esse pH diminuído deve-se ao fato de que os animais ainda não conseguiram regular o pH devido a suplementação de dieta aniônica por tempo prolongado (Hu et al., 2007). Observa-se que o HCO_3 diminuiu ($P = 0,0001$ - Figura 1D) juntamente com o pH, nos animais que receberam dieta ANIÔNICA em relação aos animais que receberam dieta NEUTRA, mas a pCO_2 não foi alterado entre os grupos (tabela 3). Já o TCO_2 foi menor no grupo dieta ANIÔNICA ($P = 0,001$ - Figura 1E). A

concentração de proteínas totais foi menor no grupo que recebeu dieta ANIÔNICA ($P = 0,003$ - Figura 1 F). Os demais metabólitos e índices hemogasométricos podem ser verificados nas tabelas 2 e 3.

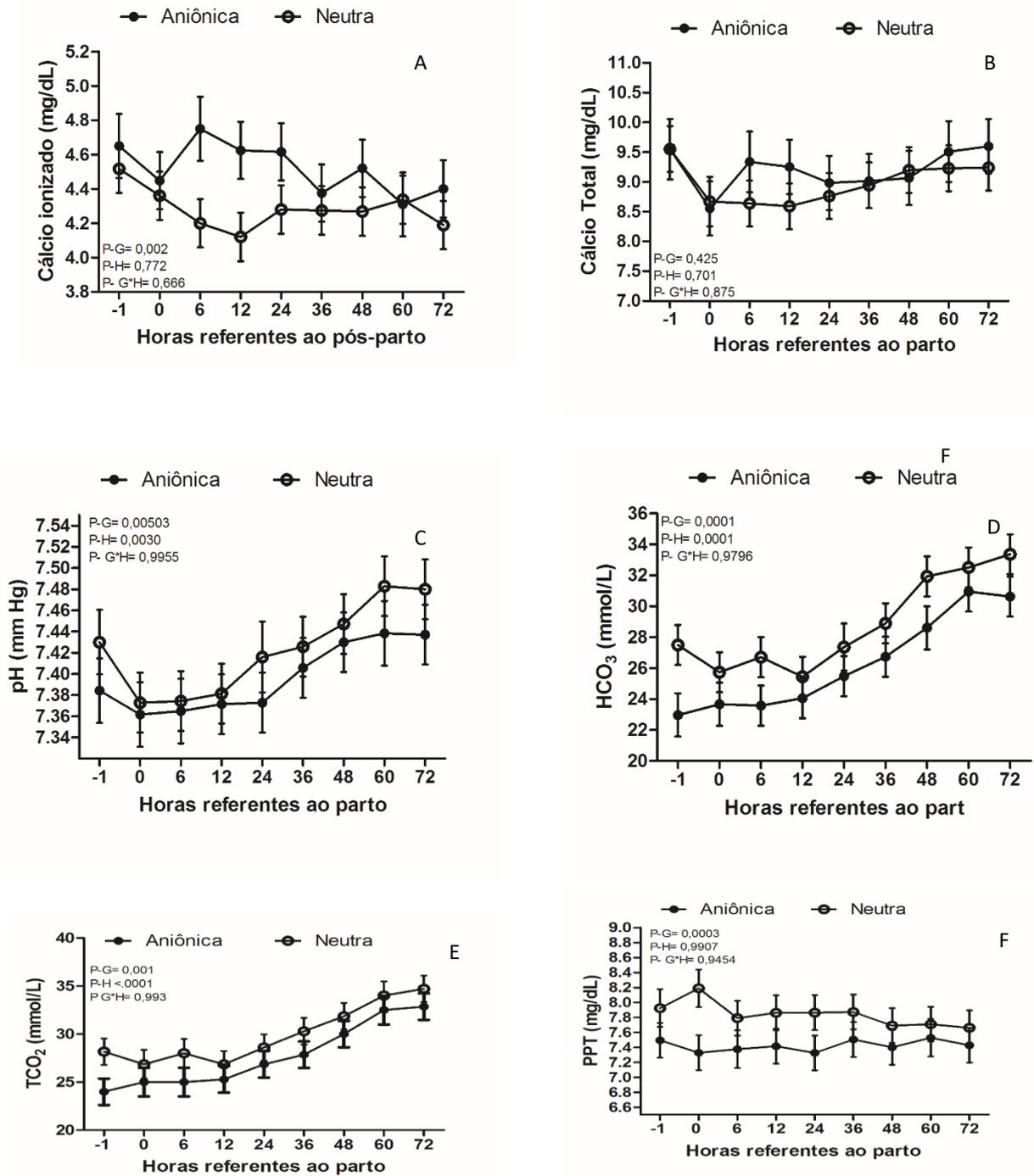


Figura 1. Metabólitos pós-parto de animais suplementados com dieta ANIÔNIA (-41mEq) e NEUTRA (-3mEq) no pré-parto. (A) Cálcio ionizado; (B) cálcio total; (C) pH (potencial hidrogênio iônico); (D) HCO₃⁻ (bicarbonato); (E) TCO₂ (Teor de gás carbônico); (F) PPT- Proteínas Totais. Valor de P ≤ 0,05 é considerado diferença significativa. P-G (Valor de P do grupo); P-H (Valor de P das horas); P-G*H (Valor de P da interação do grupo com as horas).

Tabela 2. Metabólitos pré e pós-parto de animais que foram suplementados com dieta NEUTRA (-3mEq) e dieta ANIÔNICA (-41mEq) no pré-parto

HORAS	GRUPO	GLI (mg/dL) ¹	GGT (U/L) ²	ALB (g/dL) ³	Mg (mg/dL) ⁴	URE (mg/dL) ⁵	CRE (mg/dL) ⁶	Na ⁺ (mmol/L) ⁷	K ⁺ (mmol/L) ⁸
-1	ANIÔNICA	57,00 ± 4,90 ^B	28,43 ± 2,15 ^A	2,95 ± 0,11 ^A	2,10 ± 0,15 ^{ACDE}	58,84 ± 5,24 ^A	1,40 ± 0,10 ^A	142,14 ± 0,94 ^{ACD}	4,39 ± 0,17 ^A
	NEUTRA	62,50 ± 5,30 ^B	29,71 ± 2,15 ^A	2,74 ± 0,11 ^A	1,66 ± 0,15 ^{ACDE}	59,76 ± 5,24 ^A	1,21 ± 0,10 ^A	141,17 ± 1,02 ^{ACD}	4,37 ± 0,18 ^A
0	ANIÔNICA	75,57 ± 4,90 ^A	29,14 ± 2,15 ^A	2,88 ± 0,11 ^A	2,21 ± 0,15 ^{ABC}	67,22 ± 5,24 ^{AB}	1,54 ± 0,10 ^A	144,29 ± 0,94 ^B	4,41 ± 0,17 ^A
	NEUTRA	69,00 ± 4,90 ^A	30,33 ± 2,32 ^A	3,19 ± 0,12 ^A	2,16 ± 0,16 ^{ABC}	60,78 ± 5,66 ^{AB}	1,44 ± 0,10 ^A	145,86 ± 0,94 ^B	4,16 ± 0,17 ^A
6	ANIÔNICA	66,00 ± 5,30 ^{AB}	31,00 ± 2,32 ^A	3,05 ± 0,12 ^A	2,35 ± 0,16 ^B	77,27 ± 5,66 ^B	1,43 ± 0,10 ^A	145,50 ± 1,02 ^B	4,65 ± 0,18 ^A
	NEUTRA	59,29 ± 4,90 ^{AB}	31,43 ± 2,15 ^A	3,20 ± 0,11 ^A	2,41 ± 0,15 ^B	67,23 ± 5,24 ^B	1,32 ± 0,10 ^A	144,57 ± 0,94 ^B	4,49 ± 0,17 ^A
12	ANIÔNICA	57,86 ± 4,90 ^B	29,43 ± 2,15 ^A	3,13 ± 0,11 ^A	2,16 ± 0,15 ^B	68,57 ± 5,24 ^{AB}	1,41 ± 0,10 ^A	145,00 ± 0,94 ^B	4,51 ± 0,17 ^A
	NEUTRA	55,86 ± 4,90 ^B	28,57 ± 2,15 ^A	3,14 ± 0,11 ^A	2,36 ± 0,15 ^B	68,00 ± 5,24 ^{AB}	1,42 ± 0,10 ^A	143,00 ± 0,94 ^B	4,49 ± 0,17 ^A
24	ANIÔNICA	55,33 ± 5,30 ^B	29,00 ± 2,15 ^A	2,98 ± 0,11 ^A	2,10 ± 0,15 ^{ABCD}	55,21 ± 5,24 ^A	1,39 ± 0,11 ^A	145,14 ± 0,94 ^B	4,51 ± 0,17 ^A
	NEUTRA	57,33 ± 5,30 ^B	34,00 ± 2,15 ^A	3,19 ± 0,11 ^A	2,18 ± 0,15 ^{ABCD}	62,07 ± 5,24 ^A	1,44 ± 0,10 ^A	143,67 ± 1,02 ^B	4,62 ± 0,18 ^A
36	ANIÔNICA	54,14 ± 4,90 ^B	29,14 ± 2,15 ^A	2,91 ± 0,11 ^A	2,11 ± 0,15 ^{ABCD}	44,86 ± 5,24 ^C	1,44 ± 0,10 ^A	144,14 ± 0,94 ^B	4,30 ± 0,17 ^A
	NEUTRA	53,29 ± 4,90 ^B	31,00 ± 2,15 ^A	3,17 ± 0,11 ^A	2,11 ± 0,15 ^{ABCD}	50,01 ± 5,24 ^C	1,27 ± 0,10 ^A	143,29 ± 0,94 ^B	4,43 ± 0,17 ^A
48	ANIÔNICA	51,57 ± 4,90 ^B	28,86 ± 2,15 ^A	2,93 ± 0,11 ^A	1,85 ± 0,15 ^{CDE}	43,35 ± 5,24 ^C	1,31 ± 0,10 ^A	144,43 ± 0,94 ^{AB}	4,34 ± 0,17 ^A
	NEUTRA	53,43 ± 4,90 ^B	33,71 ± 2,15 ^A	3,10 ± 0,11 ^A	1,97 ± 0,15 ^{CDE}	46,31 ± 5,66 ^C	1,38 ± 0,10 ^A	142,14 ± 0,94 ^{AB}	4,39 ± 0,17 ^A
60	ANIÔNICA	49,50 ± 5,30 ^B	29,33 ± 2,32 ^A	2,91 ± 0,12 ^A	1,85 ± 0,16 ^{DE}	50,04 ± 5,66 ^C	1,37 ± 0,10 ^A	143,17 ± 1,02 ^{CD}	4,35 ± 0,18 ^A
	NEUTRA	61,57 ± 4,90 ^B	32,00 ± 2,15 ^A	2,97 ± 0,11 ^A	1,91 ± 0,15 ^{DE}	37,29 ± 5,66 ^C	1,28 ± 0,10 ^A	143,00 ± 0,94 ^{CD}	4,29 ± 0,17 ^A
72	ANIÔNICA	50,86 ± 4,90 ^B	29,43 ± 2,15 ^A	2,93 ± 0,11 ^A	1,66 ± 0,15 ^E	40,25 ± 5,24 ^C	1,28 ± 0,10 ^A	142,00 ± 0,94 ^D	4,29 ± 0,17 ^A
	NEUTRA	57,57 ± 4,90 ^B	31,71 ± 2,15 ^A	2,76 ± 0,11 ^A	1,86 ± 0,15 ^E	38,99 ± 5,24 ^C	1,22 ± 0,10 ^A	141,14 ± 0,94 ^D	4,03 ± 0,17 ^A
Valor de P	P-G	0,574	0,046	0,111	0,729	0,506	0,158	0,057	0,479
	P-H	0,004	0,932	0,079	0,0006	<.0001	0,401	0,001	0,279
	P-G*H	0,644	0,922	0,274	0,559	0,632	0,896	0,684	0,941

¹GLI- Glicose; ²GGT- gama glutamiltransferase; ³ALB- Albumina; ⁴Mg- Magnésio; ⁵URE- Ureia; ⁶CRE- Creatinina; ⁷Na⁺- sódio; ⁸K⁺- Potássio. Valor de P ≤ 0,05 é considerado diferença significativa. P-G (Valor de P do grupo); P-H (Valor de P das horas); PG*H (Valor de P da interação do grupo com as horas).

Tabela 3. Índices hemogasométricos pré e pós-parto de animais que foram suplementados com dieta NEUTRA (-3mEq) e dieta ANIÔNICA (-41mEq) no pré-parto

HORAS	GRUPO	pCO ₂ (mmHg) ¹	pO ₂ (mmHg) ²	sO ₂ (%) ²	TCO ₂ (mmol/L) ⁴	HTC (%) ⁵	HB (g/dL) ⁶
-1	ANIÔNICA	36,33 ± 3,52 ^A	101,43 ± 21,41 ^A	88,86 ± 5,72 ^A	24,00 ± 1,38 ^D	25,00 ± 1,60 ^A	8,50 ± 0,26 ^A
	NEUTRA	40,58 ± 3,80 ^A	109,27 ± 23,13 ^A	95,67 ± 6,17 ^A	28,17 ± 1,49 ^D	24,83 ± 1,73 ^A	8,43 ± 0,28 ^A
0	ANIÔNICA	46,25 ± 3,80 ^A	113,17 ± 23,13 ^A	92,17 ± 6,17 ^A	25,00 ± 1,49 ^D	25,57 ± 1,60 ^A	8,70 ± 0,26 ^A
	NEUTRA	46,06 ± 3,52 ^A	80,06 ± 21,41 ^A	88,00 ± 5,72 ^A	26,86 ± 1,38 ^D	23,03 ± 1,60 ^A	8,44 ± 0,26 ^A
6	ANIÔNICA	42,35 ± 3,80 ^A	92,50 ± 23,13 ^A	90,83 ± 6,17 ^A	25,00 ± 1,49 ^D	26,33 ± 1,73 ^A	8,93 ± 0,28 ^A
	NEUTRA	45,20 ± 3,52 ^A	71,00 ± 21,41 ^A	84,00 ± 5,72 ^A	28,00 ± 1,38 ^D	23,97 ± 1,60 ^A	8,99 ± 0,26 ^A
12	ANIÔNICA	41,57 ± 3,52 ^A	113,00 ± 21,41 ^A	95,43 ± 5,72 ^A	25,29 ± 1,38 ^D	25,14 ± 1,60 ^A	8,54 ± 0,26 ^A
	NEUTRA	42,51 ± 3,52 ^A	89,86 ± 21,41 ^A	85,57 ± 5,72 ^A	26,86 ± 1,38 ^D	23,17 ± 1,60 ^A	8,69 ± 0,26 ^A
24	ANIÔNICA	44,56 ± 3,52 ^A	85,71 ± 21,41 ^A	89,00 ± 5,72 ^A	26,86 ± 1,38 ^{CD}	24,71 ± 1,60 ^A	8,41 ± 0,26 ^A
	NEUTRA	42,20 ± 4,17 ^A	79,83 ± 23,13 ^A	76,20 ± 6,76 ^A	28,60 ± 1,63 ^{CD}	22,17 ± 1,60 ^A	8,33 ± 0,28 ^A
36	ANIÔNICA	41,11 ± 3,52 ^A	66,14 ± 21,41 ^A	81,43 ± 5,72 ^A	27,86 ± 1,38 ^{BC}	24,86 ± 1,60 ^A	8,47 ± 0,26 ^A
	NEUTRA	45,47 ± 3,52 ^A	82,43 ± 21,41 ^A	80,43 ± 5,72 ^A	30,29 ± 1,38 ^{BC}	22,01 ± 1,60 ^A	8,34 ± 0,26 ^A
48	ANIÔNICA	42,41 ± 3,52 ^A	75,86 ± 21,41 ^A	83,57 ± 5,72 ^A	30,00 ± 1,38 ^B	25,29 ± 1,60 ^A	8,61 ± 0,26 ^A
	NEUTRA	46,26 ± 3,52 ^A	84,00 ± 21,41 ^A	85,71 ± 5,72 ^A	31,86 ± 1,38 ^B	23,40 ± 1,60 ^A	8,74 ± 0,26 ^A
60	ANIÔNICA	44,90 ± 3,80 ^A	43,67 ± 23,13 ^A	74,33 ± 6,17 ^A	32,50 ± 1,49 ^A	25,17 ± 1,73 ^A	8,58 ± 0,28 ^A
	NEUTRA	45,04 ± 3,52 ^A	97,43 ± 21,41 ^A	86,29 ± 5,72 ^A	34,00 ± 1,38 ^A	25,43 ± 1,60 ^A	8,66 ± 0,26 ^A
72	ANIÔNICA	45,34 ± 3,52 ^A	62,29 ± 21,41 ^A	75,00 ± 5,72 ^A	32,86 ± 1,38 ^A	25,00 ± 1,60 ^A	8,50 ± 0,26 ^A
	NEUTRA	45,01 ± 3,52 ^A	73,86 ± 21,41 ^A	85,29 ± 5,72 ^A	34,71 ± 1,38 ^A	24,71 ± 1,60 ^A	8,41 ± 0,26 ^A
Valor de P	P-G	0,382	0,881	0,889	0,001	0,040	0,841
	P-H	0,638	0,632	0,243	<.0001	0,942	0,501
	P-G*H	0,988	0,686	0,365	0,993	0,976	0,998

¹pCO₂- Pressão parcial de dióxido de carbono; ²pO₂- Pressão parcial de oxigênio; ³sO₂- Saturação do oxigênio; ⁴TCO₂- Teor de dióxido de carbono; ⁵HTC-Hematócrito; ⁶HB- Hemoglobina. Valor de P ≤ 0,05 é considerado diferença significativa. P-G (Valor de P do grupo); P-H (Valor de P das horas); PG*H (Valor de P da interação do grupo com as horas).

Discussão

Apesar do grupo que recebeu dieta aniônica ter tido porcentagem menor de hipocalcemia, a análise corrobora com Reinhardt et al. (2011), que relata que mesmo com a administração de dieta aniônica à prevalência de sua forma subclínica ainda é alta variando de 24-54%, de acordo com o número de lactações do animal.

Dietas aniônicas tendem a diminuir o pH sanguíneo, para otimizar a homeostase do cálcio no pós-parto (Goff et al., 2014). Estudos demonstram que, quando o pH está diminuído a tendência que o Ca_i aumente na tentativa de auxiliar o sistema tampão do organismo, esse Ca_i pode ter sido obtido pela reabsorção óssea, pela atuação do paratormônio (PTH) ou até mesmo pelo desacoplamento do Ca_i das proteínas principalmente a albumina (Jackson and Hemken, 1994, Champion et al., 2015), isso pode ter acontecido pelo fato de que o pH sanguíneo ainda está baixo do grupo ANIÔNICA em relação ao NEUTRA, por pelo menos 72 horas pós-parto.

A verificação da hemogasometria é importante, para avaliação da oxigenação do sangue, a qual é observada principalmente pela sO_2 e da pCO_2 , ventilação pulmonar que pode ser verificada pela pCO_2 e avaliação do equilíbrio-ácido base, através da concentração do pH e HCO_3^- . O pH sanguíneo pode variar de 7,35-7,45, abaixo desse intervalo pode ocorrer uma acidose metabólica, e acima pode ocorrer uma alcalose (Constable, 1999). A diminuição do pH faz com que o PTH seja mais secretado, atuando assim nos osteoclastos ocorrendo uma maior reabsorção óssea de íons como $CaPO_4$ e $CaCO_3$ na tentativa de regular o pH, sendo um importante mecanismo de regulação tanto para o pH ácido quanto para a diminuição do cálcio sérico (Champion et al., 2015).

Um dos tampões mais importantes do organismo é o HCO_3^- , o qual encontra-se entre 19-24mmol/L no plasma, em animais com o pH equilibrado, quando o pH diminui, o HCO_3^- tende a diminuir também, captando íons H^+ , formando H_2CO_3 (ácido carbônico), para que ocorra uma compensação respiratória, diminuindo a pCO_2 (DEGROOT et al., 2010). No presente estudo observa-se que o HCO_3^- diminuiu ($P = 0,0001$ - Figura 1D) juntamente com o pH, nos animais que receberam dieta ANIÔNICA em relação aos animais que receberam dieta NEUTRA, mas a pCO_2 não foi alterada entre os grupos (tabela 3). Já o TCO_2 foi menor no grupo dieta ANIÔNICA ($P= 0,001$). Uma desvantagem da diminuição do pH sanguíneo por um tempo prolongado, é que pode ocorrer a diminuição do pH intracelular, diminuindo a atividade de células, no estudo de Fernandes et al. 2005, utilizando células renais, foi observado que a diminuição do pH intracelular faz com que os níveis de cálcio dentro da célula sejam diminuídos, sendo o cálcio um importante mineral, agindo com segundo mensageiro e também

como sinalizador de células imunes (Kimura et al., 2006). Em um trabalho utilizando vacas hipocalcêmicas, foi observado uma diminuição de cálcio intracelular em células imunes, relacionado a hipocalcemia subclínica com o aumento relativo de metrite em 22% do que vacas normocalcêmicas (Martinez et al., 2012).

Um trabalho mais recente demonstrou que a acidez metabólica altera os receptores de Ca_i em células renais e nas da paratireoide, fazendo com que ocorra a diminuição da entrada de Ca_i para o meio intracelular, podendo causar grandes consequências como diminuição da contratilidade celular e com isso diminuir a atividade da célula (Campion et al., 2015).

Possivelmente ocorreu uma queda nos níveis de globulinas, pois não houve diferença entre os grupos nos níveis de albumina, sendo que as proteínas totais é igual a soma da concentração de albumina com as globulinas. Devido a acidez provocada pela dieta aniônica, pode ter ocorrido maior permeabilidade do rim em excretar globulinas, ou até mesmo a diminuição de sua síntese, pois mudanças no pH podem alterar receptores celulares e diminuir a síntese de proteínas como as globulinas.

Conclusão

O fornecimento de dieta aniônica aumenta a concentração de Ca_i na corrente circulatória, devido a acidez do pH sanguíneo, mas não significa que aumente a disponibilidade desse mineral para o interior das células, nesse estudo foi demonstrado que há uma diminuição na síntese de globulinas, demonstrado pela diminuição das proteínas totais no soro.

Referências

- APPER-BOSSARD, E.; FAVERDIN, P.; MESCHY, F.; PEYRAUD, J. L. Effects of dietary cation-anion difference on ruminal metabolism and blood acid-base regulation in dairy cows receiving 2 contrasting levels of concentrate in diets. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 9, p. 4196-210, Sep, 2010.
- BROZOS, C.; MAVROGIANNI, V. S.; FTHENAKIS, G. C. Treatment and control of peri-parturient metabolic diseases: pregnancy toxemia, hypocalcemia, hypomagnesemia. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 27, n. 1, p. 105-13, Mar, 2011.
- CAMPION, K. L.; MCCORMICK, W. D.; WARWICKER, J.; KHAYAT, M. E.; ATKINSON-DELL, R.; STEWARD, M. C.; DELBRIDGE, L. W.; MUN, H. C.; CONIGRAVE, A. D.; WARD, D. T. Pathophysiologic Changes in Extracellular pH Modulate Parathyroid Calcium-Sensing Receptor

- Activity and Secretion via a Histidine-Independent Mechanism. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 26, n. 9, p. 2163-71, Sep, 2015.
- CHAN, P. S.; WEST, J. W.; BERNARD, J. K. Effect of prepartum dietary calcium on intake and serum and urinary mineral concentrations of cows. **Journal of dairy science**, v. 89, n. 2, p. 704-13, Feb, 2006.
- CHAPINAL, N.; CARSON, M.; DUFFIELD, T. F.; CAPEL, M.; GODDEN, S.; OVERTON, M.; SANTOS, J. E.; LEBLANC, S. J. The association of serum metabolites with clinical disease during the transition period. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 10, p. 4897-903, Oct, 2011.
- CHAPINAL, N.; CARSON, M. E.; LEBLANC, S. J.; LESLIE, K. E.; GODDEN, S.; CAPEL, M.; SANTOS, J. E.; OVERTON, M. W.; DUFFIELD, T. F. The association of serum metabolites in the transition period with milk production and early-lactation reproductive performance. . **Journal of dairy science**, v. 95, n. 3, p. 1301-9, Mar, 2012.
- CONSTABLE, P. D. Clinical assessment of acid-base status. Strong ion difference theory. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 15, n. 3, p. 447-71, Nov, 1999.
- DEGARIS, P. J.; LEAN, I. J.; RABIEE, A. R.; STEVENSON, M. A. Effects of increasing days of exposure to prepartum diets on the concentration of certain blood metabolites in dairy cows. **Australian veterinary journal**, v. 88, n. 4, p. 137-45, Apr, 2010.
- DEGROOT, M. A.; BLOCK, E.; FRENCH, P. D. Effect of prepartum anionic supplementation on periparturient feed intake, health, and milk production. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 11, p. 5268-79, Nov, 2010.
- FOX, D. G.; TYLUTKI, T. P. Accounting for the effects of environment on the nutrient requirements of dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 81, n. 11, p. 3085-95, Nov, 1998.
- GOFF, J. P. The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. **Veterinary journal**, v. 176, n. 1, p. 50-7, Apr, 2008.
- GOFF, J. P. Calcium and magnesium disorders. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 30, n. 2, p. 359-81, vi, Jul, 2014.
- GOFF, J. P.; LIESEGANG, A.; HORST, R. L. Diet-induced pseudohypoparathyroidism: A hypocalcemia and milk fever risk factor. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 3, p. 1520-8, Mar, 2014.
- HADY, P. J.; DOMEQ, J. J.; KANEENE, J. B. Frequency and precision of body condition scoring in dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 77, n. 6, p. 1543-7, Jun, 1994.
- HU, W.; MURPHY, M. R. Dietary cation-anion difference effects on performance and acid-base status of lactating dairy cows: a meta-analysis. **Journal of dairy science**, v. 87, n. 7, p. 2222-9, Jul, 2004.
- HU, W.; MURPHY, M. R.; CONSTABLE, P. D.; BLOCK, E. Dietary cation-anion difference and dietary protein effects on performance and acid-base status of dairy cows in early lactation. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 7, p. 3355-66, Jul, 2007.

JACKSON, J. A.; HEMKEN, R. W. Calcium and cation-anion balance effects on feed intake, body weight gain, and humoral response of dairy calves. **Journal of dairy science**, v. 77, n. 5, p. 1430-6, May, 1994.

Kara, Ç. Physiological and metabolic changes during the transition period and the use of calcium propionate for prevention or treatment of hypocalcemia and ketosis in periparturient cows. **Journal of Environmental Sciences**, v. 7, p. 9-17, Set, 2013.

KIMURA, K.; REINHARDT, T. A.; GOFF, J. P. Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 89, n. 7, p. 2588-95, Jul, 2006.

LEBLANC, S. J.; LISSEMORE, K. D.; KELTON, D. F.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E. Major advances in disease prevention in dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 89, n. 4, p. 1267-79, Apr, 2006

MARTINEZ, N.; RISCO, C. A.; LIMA, F. S.; BISINOTTO, R. S.; GRECO, L. F.; RIBEIRO, E. S.; MAUNSELL, F.; GALVAO, K.; SANTOS, J. E. Evaluation of periparturient calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 12, p. 7158-72, Dec, 2012.

OETZEL, G. R.; FETTMAN, M. J.; HAMAR, D. W.; OLSON, J. D. Screening of anionic salts for palatability, effects on acid-base status, and urinary calcium excretion in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 74, n. 3, p. 965-71, Mar, 1991.

REINHARDT, T. A.; LIPPOLIS, J. D.; MCCLUSKEY, B. J.; GOFF, J. P.; HORST, R. L. Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. **Veterinary journal**, v. 188, n. 1, p. 122-4, Apr, 2011.

TUCKER, W. B.; HARRISON, G. A.; HEMKEN, R. W. Influence of dietary cation-anion balance on milk, blood, urine, and rumen fluid in lactating dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 71, n. 2, p. 346-54, Feb, 1988.

5 Considerações Finais

A concentração de cálcio abaixo de 8,5 mg/dL, pode afetar a síntese de proteínas de fase aguda já no pré-parto, ocasionando perda de escore de condição corporal, peso e diminuição na produção de leite. Alterações na síntese de proteínas de fase aguda pode proporcionar a esses animais maiores chances de ocorrer doenças infecciosas, já que as essas proteínas são preditoras do processo inflamatório.

A suplementação de dieta aniônica no pré-parto pode manter o pH diminuído após o parto recente, proporcionando uma maior concentração de cálcio ionizado no sangue e uma diminuição na concentração de globulinas, diante disso poderá deixar o animal mais susceptível a doenças inflamatórias, pelo fato de que a maioria das globulinas participam do processo inflamatório e também por não ter certeza que esse cálcio disponível fará seu papel como segundo mensageiro, já que alterações no pH podem diminuir a ligação do receptor no cálcio em células da paratireóide e renais.

Referências

ALLEN, L. V. JR.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 9. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 716p.

APPER-BOSSARD, E.; FAVERDIN, P.; MESCHY, F.; PEYRAUD, J. L. Effects of dietary cation-anion difference on ruminal metabolism and blood acid-base regulation in dairy cows receiving 2 contrasting levels of concentrate in diets. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 9, p. 4196-210, Sep, 2010.

BALLOU, M. A.; GOMES, R. C.; JUCHEM, S. O.; DEPETERS, E. J. Effects of dietary supplemental fish oil during the peripartum period on blood metabolites and hepatic fatty acid compositions and total triacylglycerol concentrations of multiparous Holstein cows. **Journal of dairy science**, v. 92, n. 2, p. 657-69, Feb, 2009.

BEITINGER, P. A.; FULDA, S.; DALAL, M. A.; WEHRLE, R.; KECKEIS, M.; WETTER, T. C.; HAN, F.; POLLMACHER, T.; SCHULD, A. Glucose tolerance in patients with narcolepsy. **Sleep**, v. 35, n. 2, p. 231-6, Feb, 2012.

BIONAZ, M.; TREVISI, E.; CALAMARI, L.; LIBRANDI, F.; FERRARI, A.; BERTONI, G. Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 4, p. 1740-50, Apr, 2007.

BRASILIA. Decreto nº 1.662, de 6 de Outubro de 1995. Aprova o Regulamento de fiscalização de produtos de uso veterinário e dos estabelecimentos que os fabriquem e/ou comerciem, e dá outras providências. **Coleção de Leis do Brasil, Brasília**, v. 10, p. 4459, Oct, 1995.

BROZOS, C.; MAVROGIANNI, V. S.; FTHENAKIS, G. C. Treatment and control of peri-parturient metabolic diseases: pregnancy toxemia, hypocalcemia, hypomagnesemia. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 27, n. 1, p. 105-13, Mar, 2011.

BUNTING, L. D.; TARIFA, T. A.; CROCHET, B. T.; FERNANDEZ, J. M.; DEPEW, C. L.; LOVEJOY, J. C. Effects of dietary inclusion of chromium propionate and calcium propionate on glucose disposal and gastrointestinal development in dairy calves. **Journal of dairy science**, v. 83, n. 11, p. 2491-8, Nov, 2000.

CAMPION, K. L.; MCCORMICK, W. D.; WARWICKER, J.; KHAYAT, M. E.; ATKINSON-DELL, R.; STEWARD, M. C.; DELBRIDGE, L. W.; MUN, H. C.; CONIGRAVE, A. D.; WARD, D. T. Pathophysiologic Changes in Extracellular pH Modulate Parathyroid Calcium-Sensing Receptor Activity and Secretion via a Histidine-Independent Mechanism. **Journal of the American Society of Nephrology** : JASN, v. 26, n. 9, p. 2163-71, Sep, 2015

CERÓN, L.L.; ECKERSALL, P.D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, p. 85–99, Jun, 2005.

CHAMBERLIN, W. G.; MIDDLETON, J. R.; SPAIN, J. N.; JOHNSON, G. C.; ELLERSIECK, M. R.; PITHUA, P. Subclinical hypocalcemia, plasma biochemical parameters, lipid metabolism, postpartum disease, and fertility in postparturient dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 11, p. 7001-13, 2013.

CHAN, P. S.; WEST, J. W.; BERNARD, J. K. Effect of prepartum dietary calcium on intake and serum and urinary mineral concentrations of cows. **Journal of dairy science**, v. 89, n. 2, p. 704-13, Feb, 2006.

CHAPINAL, N.; CARSON, M.; DUFFIELD, T. F.; CAPEL, M.; GODDEN, S.; OVERTON, M.; SANTOS, J. E.; LEBLANC, S. J. The association of serum metabolites with clinical disease during the transition period. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 10, p. 4897-903, Oct, 2011.

CHAPINAL, N.; LEBLANC, S. J.; CARSON, M. E.; LESLIE, K. E.; GODDEN, S.; CAPEL, M.; SANTOS, J. E.; OVERTON, M. W.; DUFFIELD, T. F. Herd-level association of serum metabolites in the transition period with disease, milk production, and early lactation reproductive performance. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 10, p. 5676-82, Oct, 2012.

CONSTABLE, P. D. Clinical assessment of acid-base status. Strong ion difference theory. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 15, n. 3, p. 447-71, Nov, 1999.

DEGARIS, P. J.; LEAN, I. J.; RABIEE, A. R.; STEVENSON, M. A. Effects of increasing days of exposure to prepartum diets on the concentration of certain blood metabolites in dairy cows. **Australian veterinary journal**, v. 88, n. 4, p. 137-45, Apr, 2010.

DEGROOT, M. A.; BLOCK, E.; FRENCH, P. D. Effect of prepartum anionic supplementation on periparturient feed intake, health, and milk production. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 11, p. 5268-79, Nov, 2010.

DUCUSIN, R.J.; UZUKA, Y.; SATOH, E.; OTANI, M.; NISHIMURA, M.; Tanabe, S.; Sarashina, T. Effects of extracellular Ca²⁺ on phagocytosis and intracellular Ca²⁺ concentrations in polymorphonuclear leukocytes of postpartum dairy cows. **Research in Veterinary Science**, v. 75, p. 27–32, Aug, 2003.

EL-SAMAD, H.; GOFF, J. P.; KHAMMASH, M. Calcium homeostasis and parturient hypocalcemia: an integral feedback perspective. **Journal of theoretical biology**, v. 214, n. 1, p. 17-29, Jan 7, 2002.

FARID, A. S.; HONKAWA, K.; FATH, E. M.; NONAKA, N.; HORII, Y. Serum paraoxonase-1 as biomarker for improved diagnosis of fatty liver in dairy cows. **BMC Veterinary Research**, v. 11, p. 9:73. Abr, 2013.

FOX, D. G.; TYLUTKI, T. P. Accounting for the effects of environment on the nutrient requirements of dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 81, n. 11, p. 3085-95, Nov, 1998.

FUKAO, T.; LOPASCHUK, G. D.; MITCHELL, G. A. Pathways and control of ketone body metabolism: on the fringe of lipid biochemistry. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, v. 70, n. 3, p. 243-51, Mar, 2004.

GABAY, C.; GIGLEY, J.; SIPE, J.; AREND, W. A.; FANTUZZI, G. Production of IL-1 receptor antagonist by hepatocytes is regulated as an acute-phase protein *in vivo*. **European Journal of Immunology**, v.31, p. 490-499, Jan, 2001.

GOFF, J. P. Treatment of calcium, phosphorus, and magnesium balance disorders. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 15, n. 3, p. 619-39, Nov, 1999.

GOFF, J. P. Pathophysiology of calcium and phosphorus disorders. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 16, n. 2, p. 319-37, Jul, 2000.

GOFF, J. P. Major advances in our understanding of nutritional influences on bovine health. **Journal of dairy science**, v. 89, n. 4, p. 1292-301, Apr, 2006.

GOFF, J. P. The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. **Veterinary journal**, v. 176, n. 1, p. 50-7, Apr, 2008.

GOFF, J. P. Calcium and magnesium disorders. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 30, n. 2, p. 359-81, Jul, 2014.

GOFF, J. P.; HORST, R. L. Milk fever control in the United States. **Acta veterinaria Scandinavica. Supplementum**, v. 97, p. 145-7, 2003a.

GOFF, J. P.; HORST, R. L. Role of acid-base physiology on the pathogenesis of parturient hypocalcaemia (milk fever)--the DCAD theory in principle and practice. **Acta veterinaria Scandinavica. Supplementum**, v. 97, p. 51-6, 2003b

GOFF, J. P.; LIESEGANG, A.; HORST, R. L. Diet-induced pseudohypoparathyroidism: A hypocalcemia and milk fever risk factor. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 3, p. 1520-8, Mar, 2014.

GONZÁLEZ, F. H.; HERNÁNDEZ, F.; MADRID, J.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; TVARIJONAVICIUTE, A.; CERÓN, J. J.; TECLES, F. Acute phase proteins in experimentally induced pregnancy toxemia in goats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. **23**, p. 57-62, Jan, 2011.

HADY, P. J.; DOMEQ, J. J.; KANEENE, J. B. Frequency and precision of body condition scoring in dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 77, n. 6, p. 1543-7, Jun, 1994.

HANSEN, S. S.; JENSEN, A. L.; JORGENSEN, R. J. Evaluation of a transportable [Ca⁺⁺] and pH analyser and of the impact of different anticoagulants and sampling sites in cattle. **Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine**, v. 47, n. 9, p. 541-51, Nov, 2000.

HODNETT, D. W.; JORGENSEN, N. A.; DELUCA, H. F. 1 alpha-hydroxyvitamin D3 plus 25-hydroxyvitamin D3 reduces parturient paresis in dairy cows fed high dietary calcium. **Journal of dairy science**, v. 75, n. 2, p. 485-91, Feb, 1992.

HORST, R. L.; GOFF, J. P.; REINHARDT, T. A.; BUXTON, D. R. Strategies for preventing milk fever in dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 80, n. 7, p. 1269-80, Jul, 1997.

HU, W.; MURPHY, M. R. Dietary cation-anion difference effects on performance and acid-base status of lactating dairy cows: a meta-analysis. **Journal of dairy science**, v. 87, n. 7, p. 2222-9, Jul, 2004.

HU, W.; MURPHY, M. R.; CONSTABLE, P. D.; BLOCK, E. Dietary cation-anion difference and dietary protein effects on performance and acid-base status of dairy cows in early lactation. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 7, p. 3355-66, Jul, 2007.

HUZZEY, J. M.; DUFFIELD, T. F.; LEBLANC, S. J.; VEIRA, D. M.; WEARY, D. M.; VON KEYSERLINGK, M. A. Short communication: Haptoglobin as an early indicator of metritis. **Journal of dairy science**, v. 92, n. 2, p. 621-5, Feb, 2009.

JACKSON, J. A.; HEMKEN, R. W. Calcium and cation-anion balance effects on feed intake, body weight gain, and humoral response of dairy calves. **Journal of dairy science**, v. 77, n. 5, p. 1430-6, May, 1994.

JONES, G. E.; MOULD, D. L. Adaptation of the guaiacol (peroxidase) test for haptoglobins to a microtitration plate system. **Research in veterinary science**, v. 37, n. 1, p. 87-92, Jul, 1984.

KARA, Ç. Physiological and metabolic changes during the transition period and the use of calcium propionate for prevention or treatment of hypocalcemia and ketosis in periparturient cows. **Journal of Environmental Sciences**, v. 7, p. 9:17, Set, 2013.

KIMURA, K.; REINHARDT, T. A.; GOFF, J. P. Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 89, n. 7, p. 2588-95, Jul, 2006.

KRAUSE, A. R.; PFEIFER, L. F.; MONTAGNER, P.; WESCHENFELDER, M. M.; SCHWEGLER, E.; LIMA, M. E.; XAVIER, E. G.; BRAUNER, C. C.; SCHMITT, E.; DEL PINO, F. A.; MARTINS, C. F.; CORREA, M. N.; SCHNEIDER, A. Associations between resumption of postpartum ovarian activity, uterine health and concentrations of metabolites and acute phase proteins during the transition period in Holstein cows. **Animal reproduction science**, v. 145, n. 1-2, p. 8-14, Feb, 2014.

LEBLANC, S. J.; LISSEMORE, K. D.; KELTON, D. F.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E. Major advances in disease prevention in dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 89, n. 4, p. 1267-79, Apr, 2006.

LITTLEDIKE, E. T.; WITZEL, D. A.; WHIPP, S. C. Insulin: evidence for inhibition of release in spontaneous hypocalcemia. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 129, n. 1, p. 135-9, Oct, 1968.

LIU, Q.; WANG, C.; YANG, W. Z.; GUO, G.; YANG, X. M.; HE, D. C.; DONG, K. H.; HUANG, Y. X. Effects of calcium propionate supplementation on lactation performance, energy balance and blood metabolites in early lactation dairy cows. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 94, n. 5, p. 605-14, Oct, 2010.

MARTINEZ, N.; RISCO, C. A.; LIMA, F. S.; BISINOTTO, R. S.; GRECO, L. F.; RIBEIRO, E. S.; MAUNSELL, F.; GALVAO, K.; SANTOS, J. E. Evaluation of periparturient calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 12, p. 7158-72, Dec, 2012.

MARTINEZ, N.; SINEDINO, L. D.; BISINOTTO, R. S.; RIBEIRO, E. S.; GOMES, G. C.; LIMA, F. S.; GRECO, L. F.; RISCO, C. A.; GALVAO, K. N.; TAYLOR-RODRIGUEZ, D.; DRIVER, J. P.; THATCHER, W. W.; SANTOS, J. E. Effect of induced subclinical hypocalcemia on physiological responses and neutrophil function in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 2, p. 874-87, Feb, 2014.

MULLIGAN, F. J.; DOHERTY, M. L. Production diseases of the transition cow. **Veterinary journal**, v. 176, n. 1, p. 3-9, Apr, 2008.

MULLIGAN, F. J.; O'GRADY, L.; RICE, D. A.; DOHERTY, M. L. A herd health approach to dairy cow nutrition and production diseases of the transition cow. **Animal reproduction science**, v. 96, n. 3-4, p. 331-53, Dec, 2006.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **The Veterinary Journal**, v. 168, p. 28-40, Jul, 2004.

OETZEL, G. R.; FETTMAN, M. J.; HAMAR, D. W.; OLSON, J. D. Screening of anionic salts for palatability, effects on acid-base status, and urinary calcium excretion in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 74, n. 3, p. 965-71, Mar, 1991.

OETZEL, G. R. Management of dry cows for the prevention of milk fever and other mineral disorders. The Veterinary clinics of North America. **Food animal practice**, v. 16, n. 2, p. 369-86, Jul, 2000.

OETZEL, G. R. Oral calcium supplementation in peripartum dairy cows. The Veterinary clinics of North America. **Food animal practice**, v. 29, n. 2, p. 447-55, Jul, 2013.

PALLESEN, A.; PALLESEN, F.; JORGENSEN, R. J.; THILSING, T. Effect of pre-calving zeolite, magnesium and phosphorus supplementation on periparturient serum mineral concentrations. **Veterinary journal**, v. 175, n. 2, p. 234-9, Feb, 2008.

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

RAJALA-SCHULTZ, P. J.; GROHN, Y. T.; MCCULLOCH, C. E. Effects of milk fever, ketosis, and lameness on milk yield in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 82, n. 2, p. 288-94, Feb, 1999.

REINHARDT, T. A.; LIPPOLIS, J. D.; MCCLUSKEY, B. J.; GOFF, J. P.; HORST, R. L. Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. **Veterinary journal**, v. 188, n. 1, p. 122-4, Apr, 2011.

RIOND, J. L.; LIESEGANG, A.; WANNER, M.; KAISER, C.; DÖBELI, M.; JOLLER-JEMELKA, H. I. 1999. Effects of EDTA-induced hypocalcaemia and stress on plasma TNF-alpha, IL-1-ra, G-CSF, GM-CSF and S-100 in dairy cows. **Veterinary Research Communications**, v.23, p. 299-306, Aug, 1999.

RORSMAN, P.; BRAUN, M.; ZHANG, Q. Regulation of calcium in pancreatic alpha- and beta-cells in health and disease. **Cell calcium**, v. 51, n. 3-4, p. 300-8, Mar-Apr, 2012.

SAMPSON, J. D.; SPAIN, J. N.; JONES, C.; CARSTENSEN, L. Effects of calcium chloride and calcium sulfate in an oral bolus given as a supplement to postpartum dairy cows. **Veterinary therapeutics : research in applied veterinary medicine**, v. 10, n. 3, p. 131-9, Fall, 2009.

SASAKI, K.; YAMAGISHI, N.; KIZAKI, K.; SASAKI, K.; DEVKOTA, B.; HASHIZUME, K. Microarray-based gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells in dairy cows with experimental hypocalcemia and milk fever. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 1, p. 247-58, 2014.

SINDAN- Sindicato Nacional da Industria de produtos para a saude animal.
<Disponível em <http://www.sindan.org.br/sd/base.aspx?controle=8>> Acessado em 14-01-2016.

SCHNEIDER, A.; CORREA, M. N.; BUTLER, W. R. Short communication: acute phase proteins in Holstein cows diagnosed with uterine infection. **Research in veterinary science**, v. 95, n. 1, p. 269-71, Aug, 2013.

SHELDON, I. M.; NOAKES, D. E.; RYCROFT, A.; DOBSON, H. Acute phase protein responses to uterine bacterial contamination in cattle after calving. **The Veterinary record**, v. 148, n. 6, p. 172-5, Feb 10, 2001.

SORDILLO, L. M.; CONTRERAS, G. A.; AITKEN, S. L. 2009. Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows. *Animal Health Research Reviews Journal*. v.10, p. 53-63. Jun, 2009.

THILSING-HANSEN, T.; JORGENSEN, R. J.; ENEMARK, J. M.; LARSEN, T. The effect of zeolite A supplementation in the dry period on periparturient calcium, phosphorus, and magnesium homeostasis. **Journal of dairy science**, v. 85, n. 7, p. 1855-62, Jul, 2002a.

THILSING-HANSEN, T.; JORGENSEN, R. J.; OSTERGAARD, S. Milk fever control principles: a review. **Acta veterinaria Scandinavica**, v. 43, n. 1, p. 1-19, 2002b.

TUCKER, W. B.; HARRISON, G. A.; HEMKEN, R. W. Influence of dietary cation-anion balance on milk, blood, urine, and rumen fluid in lactating dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 71, n. 2, p. 346-54, Feb, 1988.

WILKENS, M. R.; COHRS, I.; LIFSCHITZ, A. L.; FRASER, D. R.; OLSZEWSKI, K.; SCHRODER, B.; BREVES, G. Is the metabolism of 25-hydroxyvitamin D3 age-dependent in dairy cows? **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 136, p. 44-6, Jul, 2013.

WILKENS, M. R.; OBERHEIDE, I.; SCHRODER, B.; AZEM, E.; STEINBERG, W.; BREVES, G. Influence of the combination of 25-hydroxyvitamin D3 and a diet negative in cation-anion difference on peripartal calcium homeostasis of dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 1, p. 151-64, Jan, 2012a.

WILKENS, M. R.; RICHTER, J.; FRASER, D. R.; LIESEGANG, A.; BREVES, G.; SCHRODER, B. In contrast to sheep, goats adapt to dietary calcium restriction by increasing intestinal absorption of calcium. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 163, n. 3-4, p. 396-406, Nov, 2012b.

WILDMAN, E.E.; JONES, G.M.; WAGNER, P.E.; BOMAN, R.L. A dairy body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. **Journal of Dairy Science**, v. 65, p. 495–501, Mar, 1982.

WITZEL, D. A.; LITTLEDIKE, E. T. Suppression of insulin secretion during induced hypocalcemia. **Endocrinology**, v. 93, n. 4, p. 761-6, Oct, 1973.

ZERBINI, C. A.; MCCLUNG, M. R. Odanacatib in postmenopausal women with low bone mineral density: a review of current clinical evidence. **Therapeutic advances in musculoskeletal disease**, v. 5, n. 4, p. 199-209, Aug, 2013.

Anexo



Pelotas, 08 de abril de 2011

De: Prof. Dr. Orlando Antonio Lucca Filho

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEE A)

Para: Prof. Marcio Nunes Correa

Faculdade de Veterinária

Senhor(a) Professor(a):

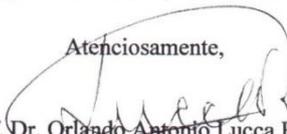
A CEE A analisou o projeto intitulado: **“Resistência a Insulina em ruminantes e sua relação com hipomagnesemia e hipocalcemia”**, processo nº 23110.002563/2011-51 sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução considerando ser o assunto pertinente e a metodologia compatível com os princípios éticos em experimentação animal e com os objetivos propostos.

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEE A.

Salientamos também a necessidade deste Projeto ser cadastrado junto ao Departamento de Pesquisa para posterior registro no COCEPE (Código para Cadastro nº CEE A 2563).

Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Orlando Antonio Lucca Filho

Presidente da CEE A

Ciente em:

09/04/2011

Assinatura do Professor Coordenador:

