

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Centro de Desenvolvimento Tecnológico**

**Curso de Biotecnologia**



**Trabalho de Conclusão de Curso**

**Avaliação da resposta imune no pós-parto de vacas holandesas  
normocalcemicas e hipocalcemicas no pré-parto**

**Uriel Secco Londero**

Pelotas, 2014

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

L847a Londero, Uriel Secco

Avaliação da resposta imune no pós-parto de vacas holandesas normocalcêmicas e hipocalcêmicas no pré-parto / Uriel Secco Londero ; Marcio Nunes Corrêa, orientador. — Pelotas, 2014.

28 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2014.

1. Cálcio. 2. Capacidade imunitária. 3. Hipocalcemia subclínica. I. Corrêa, Marcio Nunes, orient. II. Título.

CDD : 636.23

**Uriel Secco Londero**

**Avaliação da resposta imune no pós-parto de vacas holandesas  
normocalcemicas e hipocalcemicas no pré-parto**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Centro de Desenvolvimento Tecnológico da  
Universidade Federal de Pelotas, como requisito  
parcial para obtenção do título de Bacharel em  
Biotecnologia.

Orientador: Marcio Nunes Corrêa

Pelotas, 2014

Uriel Secco Londero

Avaliação da resposta imune no pós-parto de vacas holandesas normocalcemicas e hipocalcemicas no pré-parto

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 12 de dezembro de 2014

Banca Examinadora:

.....  
Viviane Rohrig Rabassa  
Doutora em Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas

.....  
Rubens Alves Pereira  
Doutor em Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas

.....  
Rafael da Rosa Ulguim  
Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

.....  
Ismael Mateus Cavazini  
Médico Veterinário pela Universidade Federal de Pelotas

**Dedico este trabalho a meus pais,  
minha irmã e todos os amigos e  
colegas.**

## **Agradecimentos**

Aos meus pais Aldemir Davi Londero e Marghete Juliana Secco Londero, pelo apoio e pela dedicação que tiveram em todos esses anos na minha criação, e por sempre estarem disponíveis para me ajudar e a incentivar a conclusão deste sonho.

A minha irmã Talissa Secco Londero, por estar sempre torcendo pelo meu sucesso

A meus familiares, por acreditarem e por me incentivarem a continuar a buscar sempre meus sonhos.

A Fernanda Kegles por me demonstrar como o amor é muito importante para uma vida.

Ao meu orientador, que tornou possível a elaboração deste projeto, além do incentivo para nunca desistir.

A Josiane Feijó e Ismael Cavazini pela dedicação em me auxiliar na conclusão deste trabalho.

Ao grupo NUPEEC, por ser uma grande família, onde fiz grandes amigos que vou levar para o resto de minha vida.

E a Deus, por me possibilitar a realização deste grande desafio e também pela possibilidade da conclusão deste trabalho.

## Resumo

LONDERO, Uriel Secco. Avaliação da resposta imune no pós-parto de vacas holandesas normocalcêmicas e hipocalcêmicas no pré-parto. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso – Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico.

O cálcio (Ca) tem diversas funções na célula, como a proliferação celular, contração muscular, neurotransmissão, entre outros; sendo que ele tem importante papel na sinalização celular de células fagocíticas. Na vaca leiteira, a deficiência de Ca causa diversas desordens produtivas e reprodutivas. Devido este ser um problema de grande impacto econômico, o objetivo do Trabalho de Conclusão de Curso avaliar a resposta imune no pós parto de vacas holandesas que desenvolveram hipocalcemia subclínica no pré-parto. Foram utilizadas 7 vacas primíparas, as quais foram divididas em dois grupos: Grupo Hipocalcemia Subclínica (GHS) e Grupo Controle (GC). Foram realizadas análises de contagem de células brancas (leucócitos), contagem diferencial de leucócitos, e também análise de proteínas totais (PPT) e fibrinogênio, além de cálcio ionizado ( $Ca^{+2}$ ) e cálcio total ( $Ca_t$ ) durante o pós parto. Houve diferenças entre os grupos no número de leucócitos ( $P=0,0178$ ), sendo maiores no grupo GHS. Também foi obtido diferenças na concentração de fibrinogênio ( $P=0,0442$ ), sendo que os níveis deste se mantiveram menores no GHS, além disso a concentração de linfócitos teve diferenças entre as horas dentro dos grupos, sendo que na hora do parto a concentração destes foi menor que nas demais. Outro ponto importante é que os animais que desenvolveram hipocalcemia subclínica no pré-parto, tiveram seus níveis de  $Ca^{+2}$  e  $Ca_t$  mais altos em relação ao GC ( $P=0,0010$ ). Em conclusão a este estudo, demonstra que o desenvolvimento de hipocalcemia subclínica no pré-parto melhorou a capacidade imunitária no pós-parto, fazendo com que os animais estejam menos susceptíveis a doenças que ocorrem durante o período de transição. Este estudo também demonstrou que o desenvolvimento de hipocalcemia subclínica no pré-parto, pode aumentar a retenção de Ca pelo animal no pós parto.

**Palavras Chaves:** Cálcio, Capacidade imunitária, Hipocalcemia subclínica

## Abstract

LONDERO, Uriel Secco. Evaluation of the immune response in postpartum Holstein cows normocalcemic and hypocalcemic in prepartum. 2014. Course Conclusion Work – Biotecnología, Centro de Desenvolvimento Tecnológico.

Calcium (Ca) has several functions in the cell, such as cell proliferation, muscle contraction, neurotransmission, and others; and that it plays an important role in cellular signaling phagocytic cells. In dairy cows, the Ca deficiency causes various productive and reproductive disorders. Because this is a problem of great economic impact, the goal of the Course Conclusion Work evaluate the immune response in postpartum Holstein cows who developed subclinical hypocalcemia during prepartum. We used 7 primiparous cows, which were divided into two groups: Group Subclinical hypocalcemia (GHS) and control group (GC). White cell count analysis (WBC), differential leukocyte count and also analysis of total protein (PPT) and fibrinogen, as well as ionized calcium (Ca + 2) and total calcium (CAT) during the postpartum period. There were differences between the groups in the number of leukocytes ( $P = 0.0178$ ), and higher in the GHS. Was also obtained differences in fibrinogen concentration ( $P = 0.0442$ ), while the levels remained lower in this GHS addition the concentration of lymphocytes was differences between the times within the groups, with at delivery concentration these was lower than in the other. Another important point is that animals that developed subclinical hypocalcemia during prepartum, had their levels of Ca + 2 and Cat higher than the GC ( $P = 0.0010$ ). In conclusion this study shows that the development of subclinical hypocalcemia during prepartum improved the immune capacity in the postpartum, causing the animals are less susceptible to diseases that occur during the transition period. This study also demonstrated that the development of subclinical hypocalcemia during prepartum can increase retention of Ca by the animal in the postpartum.

**Keywords:** Calcium, immune capacity, subclinical hypocalcemia



## Lista de Figuras

Figura 1	Gráfico Média de Células Sanguíneas Brancas no decorer do tempo entre o GHS e GC. b) Média fibrinogênio no decorrer do tempo entre o GHS e GC	20
Figura 2	Gráfico $Ca^{+2}$ (a) e $Ca_t$ (b) de vacas dos grupos GHS e GC submetidos a infusão do produto.....	20
Figura 3	Gráfico dos níveis de cálcio ionizado de vaca dos GHS e GC que tiveram hipocalcemia subclínica após o parto.....	21

## Lista de Tabelas

Tabela 1	Médias do GHS e GC .....	22
Tabela 2	Médias $\pm$ erro padrão da concentração de leucócitos para os GC e GHS no decorrer das horas.....	22
Tabela 3	Médias $\pm$ erro padrão de fibrinogênio para os GC e GHS no decorrer das horas.....	22
Tabela 4	Médias $\pm$ erro padrão de concentração de linfócitos para os GC e GHS no decorrer das horas.....	22

## Sumário

1 Introdução .....	12
1.1 Descrição do Local .....	12
1.1.1 Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária .....	12
1.2 Revisão de Literatura .....	14
1.3 Homeostase do Cálcio .....	14
1.4 Cálcio e Imunidade .....	15
1.5 Cálcio e NADPH .....	16
1.6 Cálcio e supressão imunológica .....	16
2 Desenvolvimento .....	18
2.1 Materiais e Métodos .....	18
2.1.1 Grupos experimentais e infusão do produto Y .....	18
2.1.2 Amostras de sangue .....	19
2.1.3 Análises Estatísticas.....	19
2.2 Resultados .....	20
2.3 Discussão .....	23
3. Considerações Finais .....	25
4. Referências .....	26

## **1 Introdução**

A produção leiteira nacional tem aumentado substancialmente nos últimos anos, de acordo com os dados do IBGE (2013) a produção passou de 26 para 35 bilhões de litros nos últimos seis anos, o que conseqüentemente trouxe também aumento na ocorrência de transtornos metabólicos no pós-parto de vacas leiteiras. A hipocalcemia subclínica é um dos principais transtornos que causam a perda de produtividade, sendo que ocorre diminuição dos níveis de cálcio (Ca), e isso pode prejudicar diversas funções nas células imunes. Devido ao interesse em qualificar os estudos em imunidade envolvendo o íon cálcio, o Trabalho de Conclusão de Curso em Biotecnologia foi realizado na Universidade Federal de Pelotas - UFPel, Departamento de Clínica Veterinárias, na qual está situado o Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC), que desenvolve pesquisas envolvendo transtornos metabólicos. Este possui parceria com a Granja 4 Irmãos S/A.

A escolha pelo grupo NUPEEC, ocorreu pelo fato de já participar de atividades do grupo. O NUPEEC é conceituado e reconhecido dentro da instituição e pela ênfase no processo de inovação. O estágio foi na área de inovação científica em pecuária leiteira, com início no dia 18 de agosto a 01 de dezembro de 2014, totalizando 450 horas.

O presente trabalho é parte de um projeto de inovação envolvendo prevenção de hipocalcemia subclínica, desenvolvido pela Doutoranda Josiane Oliveira Feijó. Durante o Trabalho de Conclusão de Curso, os animais foram analisados para a verificação se houve hipocalcemia subclínica no pré-parto, e no pós-parto foram feitas coletas de sangue para realização de contagem de leucócitos, esfregaço para contagem diferencial de leucócitos, leituras de proteínas totais e fibrinogênio, afim de analisar se houve alguma alteração na produção de células do sistema imune, que foram feitas no laboratório de Bioquímica Clínica da UFPel, além da verificação se houve alteração na concentração de Ca circulante.

### **1.1 Descrição do Local**

#### **1.1.1 Núcleo de pesquisa, ensino e extensão em pecuária (NUPEEC)**

O grupo NUPEEC está situado na cidade de Capão do Leão-RS, sendo um grupo que visa a formação pessoal e profissional do integrante, desenvolvendo trabalhos na área de ruminantes (bovinos de corte e leiteiro, e ovinos), além de trabalhos com a espécie suína. Desenvolve estudos que tem por objetivo a integração das áreas de nutrição, sanidade e reprodução, tendo como foco principal o metabolismo animal. Mais especificamente, o grupo busca o entendimento dos transtornos metabólicos, afim de obter soluções que possam maximizar a rentabilidade dos sistemas produtivos.

A equipe é constituída por professores/pesquisadores, graduandos e pós-graduandos, sendo composta por uma equipe multidisciplinar, que possui estudantes de Medicina Veterinária, Zootecnia, Biologia, Farmácia e Bioquímica, Biotecnologia.

## **1.2 Revisão da Literatura**

Manter a saúde e produtividade no período de transição das vacas leiteiras é uma das tarefas mais difíceis para rebanhos leiteiros. Aproximadamente 75% das doenças em vacas leiteiras acontece no primeiro mês após o parto (LEBLANC *et al.*, 2006), sendo que os principais transtornos metabólicos são: cetose, deslocamento de abomaso, retenção de placenta e hipocalcemia (CASTRO, 2009).

O período de transição é compreendido entre 21 dias anteriores e posteriores ao parto, sendo que a vaca passa de um estado de gestante não lactante para um estado de não gestante lactante. Este é um período crítico para o animal, caracterizado por importantes alterações endócrinas, metabólicas e nutricionais que exigem do animal uma alta capacidade de adaptação (CHAPINAL *et al.*, 2012).

A hipocalcemia na vaca leiteira é um transtorno metabólico, o qual é caracterizado pela diminuição drástica da  $[Ca^{+2}]$  no organismo, devido ao súbito aumento da necessidade desse íon no pré-parto para o desenvolvimento do feto, no parto para contração uterina e no pós-parto recente para produção de colostro e leite (LEAN, DEGARIS e MCNEIL, 2006).

Em vacas leiteiras, a hipocalcemia é uma doença economicamente importante, podendo causar perdas de quase 2,9 kg/leite/dia, até seis semanas pós-parto, reduzindo a vida produtiva de uma vaca em até 3,4 anos (RAJALA-SCHULTZ *et al.*, 1999). Com o aumento da idade da vaca aumenta o risco em 9% de haver

hipocalcemia, devido ao aumento do número de lactações (DEGARIS E LEAN, 2009). A hipocalcemia clínica possui uma incidência de 5-7% (GOFF, 2008; MULLIGAN E DOHERTY, 2008), enquanto que sua forma subclínica apresenta uma prevalência de 25-54%, dependendo do número de lactações (REINHARDT et al., 2011).

Uma consequência grave da hipocalcemia subclínica (HSC) é a diminuição da ingestão de matéria seca (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., 2012), cetose (KARA, 2013) e redução no desempenho reprodutivo devido ao prolongamento do anestro pós-parto (MARTINEZ et al., 2012). Além disso, pode reduzir a capacidade das células do sistema imune de responder a estímulos. Ducusin et al., 2003 e Martinez et al., 2012, observaram uma proporção reduzida de neutrófilos com atividade fagocitária em vacas hipocalcêmicas, prejudicando a resposta de células mononucleares para estimular a ligação do antígeno (KIMURA et al., 2006). Esta redução da resposta imune relacionou a hipocalcemia às doenças infecciosas de origem bacteriana, como a metrite (MARTINEZ et al., 2012) e a mastite (CURTIS et al., 1983).

Diante disso, o objetivo do Trabalho de Conclusão de Curso foi avaliar a resposta imune no pós parto de vacas leiteiras que desenvolveram a hipocalcemia subclínica no pré-parto.

### **1.3 Homeostase do cálcio**

A regulação do cálcio no organismo é um sistema complexo que compreende vários fatores controladores como: concentrações circulantes de cálcio, fósforo, PTH e calcitriol (1,25-diidroxivitamina D3), além de muitos outros fatores como hormônios esteroidais, íons como o magnésio (Mg) e vários órgãos alvo (glândula paratireoide, osso, rim e intestino) (GOFF, 2000).

Nas glândulas paratireoides, bem como em outros elementos celulares, há receptores para o  $Ca^{+2}$  (CaR), 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, a calcitonina é outro hormônio calciotrópico, mas age como antagonista ao PTH (GOFF, 2008).

#### 1.4 Cálcio e Imunidade

O cálcio (Ca) é um importante mineral no organismo dos mamíferos, sendo responsável por diversas funções, como contração muscular, regulação da pressão arterial, neurotransmissão, ativação de sistemas enzimáticos e hormonais, mensageiro de receptores celulares, também é importante para a coagulação sanguínea e equilíbrio ácido-base do organismo, podendo influenciar no transporte de íons através das membranas celulares. Compõe cerca de 1,5 a 2,0% do peso corporal e encontra-se principalmente como constituinte dos ossos e dentes (99%) (CARVALHO, 1999). Nos ossos e dentes, tem por função dar rigidez, além de ser uma importante reserva para mecanismos homeostáticos. Nos fluidos corporais, este elemento pode ser encontrado de formas diferentes, na sua forma biologicamente ativa, ou seja, ionizado ( $\text{Ca}^{+2}$ ), ligados a proteínas (cálcio total-  $\text{Ca}_t$ ), e também podem ser encontrados complexados com fosfatos e bicarbonatos (HANSEN et al. 2000; SARWAR et al., 2000).

Pelo fato do  $\text{Ca}^{+2}$  ser classificado como um importante segundo mensageiro em diversas células, como linfócitos e células fagocíticas, sua diminuição no citosol reduz a atividade de células imunes. Seu mecanismo de ação se dá através dos antígenos que se ligam a receptores na membrana e ativam a Fosfolipase C, que por sua vez quebra a molécula de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato gerando dois compostos: inositol-1,4,5-trifosfato ( $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ) e diacilglicerol. O  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  se liga a receptores que estão localizados na superfície do retículo endoplasmático (RE) onde o  $\text{Ca}^{+2}$  é armazenado, fazendo com que a concentração de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular aumente rapidamente para o citosol (OH-HORA, 2008).

Com a perda do  $\text{Ca}^{+2}$  no RE, é necessário que a concentração de cálcio seja restabelecida, o mecanismo responsável por isso é a SOCE (do Inglês, Store-operated calcium entry)<sup>4</sup>, sendo que o cálcio que foi lançado para o citosol, com os canais CRAC (do inglês, *calcium release-activated calcium*), um canal altamente seletivo para  $\text{Ca}^{+2}$ , abrindo estes para o influxo de  $\text{Ca}^{+2}$  para restabelecer a quantidade

desse dentro do RE, sendo que estes canais são responsáveis pela manutenção da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{+2}$  (OH-HORA, 2008). Este processo está relacionado a diversas funções dentro das células, sendo elas o controle da proliferação celular, apoptose, atividade enzimática e degranulação e motilidade de neutrófilos (BURGOS et al., 2011).

### **1.5 Cálcio e NADPH**

O  $\text{Ca}^{+2}$  também participa de outras funções importantes para a célula, como a translocação da proteína G Rac, ativação da proteína mieloide relacionada (MPR) e ativação da proteína quinase C (PKC), que são importantes para a ativação da NADPH oxidase, um dos mais importantes complexos enzimáticos responsáveis pelo aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs), importantes para a fagocitose. Isto é evidenciado quando há uma supressão na  $[\text{Ca}^{+2}]$  extracelular ocorrendo uma grande baixa na concentração de ROS (BRÉCHAD & TSCHIRHART, 2010).

Alguns estudos mostraram que o processo ingestão fagossomal é independente de  $\text{Ca}^{+2}$  (STOSSEL, 1973; SUNG et al., 1985), porém outros mais recentes demonstraram que a maturação do fagossoma é regulada por elevações na  $[\text{Ca}^{+2}]$  citoplasmático. A maturação fagossomal pode ser medida através da produção de EROs, isto foi comprovado através de estudos que fizeram a quelatação de cálcio intracelular obtendo como resultado a inibição na produção de EROs e subsequente inibição na morte de bactérias englobadas por neutrófilos, além de a diminuição na entrega de lactoferrina, um outro marcador para grânulos, sendo que também pode ser que a sobrevivência dos patógenos intracelular seja devido a uma queda na  $[\text{Ca}^{+2}]$  citoplasmático (YONG, 1984; ICHINOSE 1995).

### **1.6 Cálcio e supressão imunológica**

O  $\text{Ca}^{+2}$  pode estar diretamente envolvido com a supressão imunológica, estudos demonstraram que vacas com hipocalcemia tiveram uma redução na atividade de suas células imunitárias para combater patógenos, sendo que as principais células que foram prejudicadas foram os neutrófilos e linfócitos (MARTINEZ, et al., 2012).



Para comprovar isto, foram feitos estudos com vacas que passaram pelo processo de mastectomia, sendo que as vacas durante o pré-parto tiveram uma redução na atividade fagocitária dos neutrófilos, tanto vacas mastectomizadas como os controles, entretanto, no pós parto, as vacas mastectomizadas, tiveram a função dos seus neutrófilos recuperadas 7 dias após o parto contra 20 dias das vacas que não passaram por esse procedimento. Isto pode demonstrar que, a ausência da glândula mamária não pode evitar a supressão imunológica, entretanto, também pode demonstrar que o  $\text{Ca}^{+2}$  tem um papel importante na saúde das células imunitárias (GOFF e KIMURA, 2002), sendo assim pode-se atribuir que as demandas metabólicas estão relacionadas a produção leiteira (MARTINEZ et al., 2012).

## **2 Desenvolvimento**

### **2.1 Materiais e métodos**

O experimento foi realizado em uma propriedade comercial ao sul do Rio Grande do Sul, no município de Rio Grande, nas coordenadas geográficas 32 ° 16 'S, 52 ° 32' L. Foram selecionadas sete vacas da raça holandês, primíparas em período gestacional. A alimentação foi de acordo com o protocolo estipulado pela propriedade, ambos os grupos receberam dieta aniônica (-26mEq/100g MS).

As vacas foram monitoradas quanto a possíveis transtornos clínicos, que não aqueles esperados no experimento e foi realizada a avaliação da condição corporal (escala de 1 a 5), conforme Lowman, 1976.

#### **2.1.1 Grupos Experimentais**

Os animais foram distribuídos homogeneamente de acordo com o ECC, sendo divididos em dois grupos (Grupo Hipocalcemia Subclínica (GHS) (n=4) e Grupo Controle (GC) (n=3)) sendo que a verificação ocorreu 15 dias antes do parto. O GC não desenvolveu hipocalcemia subclínica durante o período de análise

O GHS foi verificado que desenvolveram hipocalcemia subclínica, sendo que estes animais foram monitorados a cada 60 minutos durante 10 horas, o qual a concentração de cálcio ionizado ( $Ca^{+2}$ ) se manteve  $\leq 1$  mmol/L. Este monitoramento foi feito pelo medidor bioquímico portátil I-STAT (Abboot) dotado de cartucho CG8+.

No pós-parto os animais foram monitorados por 72 horas para verificação do  $Ca^{+2}$ ,  $Ca_t$  e da resposta imunológica.

#### **2.1.2 Amostras de Sangue**

Foram coletadas amostras de sangue (10 mL) por punção da veia coccígea, utilizando o sistema de Vacutainer (BD Diagnósticos, São Paulo, Brasil) com tubos contendo 10% de EDTA para as análises de leucograma, e um tubo ativador de coágulo, para se obter o soro para análise do cálcio total ( $Ca_t$ ).

Para análise do hemograma foi utilizado o sangue total, foram analisados concentração de células brancas utilizando o contador de células semiautomático Celm CC-530 (Celm), a amostra foi diluída com o diluidor automático Celm DA-500 (Celm). Para a análise de hematócrito, proteínas totais e fibrinogênio, amostras de sangue foram colocadas em capilares com uma das extremidades fechadas, foi centrifugado por 5 minutos a uma rotação de 18.000 g na Centrifuga de Micro Hematócrito Digital LB-116/30 (Benfer). Para análise de proteínas plasmáticas totais (PPT) foi retirado o soro destes capilares e analisados no refratômetro, o fibrinogênio foi determinado imediatamente pelo método de precipitação por calor e leitura no refratômetro (JAIN, 1993).

Para o diferencial de leucócitos foram feitos esfregaços e as aminas coradas com Panótipo (Laborclin) e a leitura foi feita no microscópio Nikon Eclipse E200 (Nikon) com um aumento de 1000x.

A concentração de  $Ca^{2+}$  usando kits comerciais (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil) por calorimetria, sendo que a leitura foi feita por espectrofotometria de luz visível (FEMTO 700 *Plus*, FEMTO Indústria e Comércio de Instrumentos, São Paulo, Brasil). A análise de  $Ca^{2+}$  foi feito logo após a coleta, utilizando o equipamento I-STAT dotado do cartucho CG8+.

### **2.1.3 Análise Estatística**

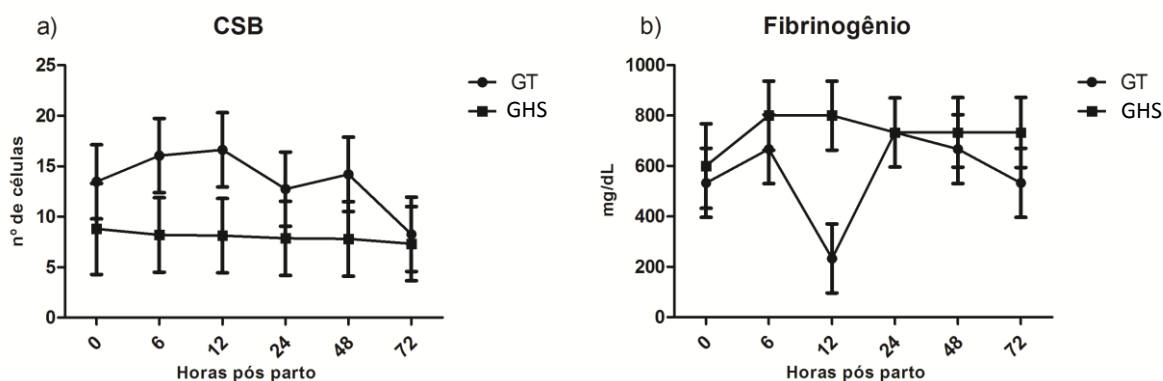
As análises estatísticas foram realizadas com o programa SAS versão 9.1 (SAS® Institute Inc., Cary, NC, EUA, 2009). As concentrações de leucócitos, PPT, fibrinogênio, monócitos, eosinófilos, bastonetes, segmentados e linfócitos foram avaliados por análise de variância (ANOVA) com procedimento MIXED, avaliando o efeito de grupo, tempo (dias) e sua interação (LITTELL et al., 1998). O procedimento CORR foi utilizado para testar a correlação Pearson entre as variáveis paramétricas dentro de cada grupo. Foram considerados valores com  $P < 0,05$  como significativos.

## **2.2 Resultados**

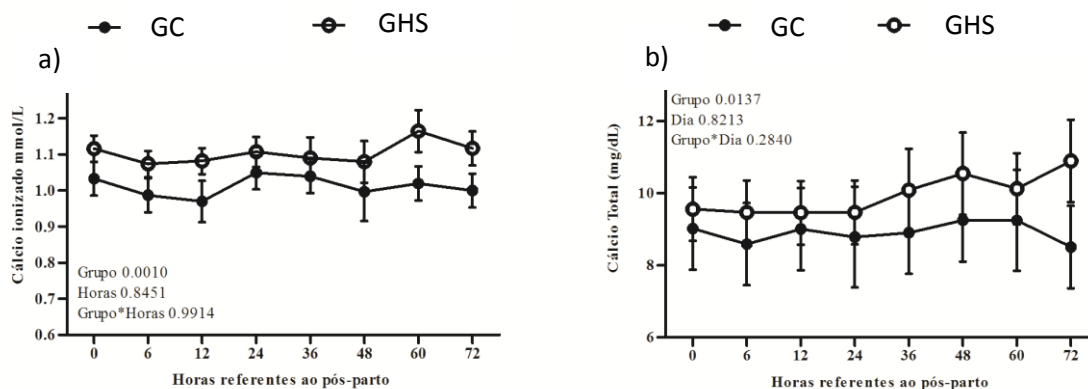
A concentração de leucócitos do GHS foi maior em comparação ao GC ( $P=0,0178$ ) (Tabela 2 e Figura 1.a). Quanto ao nível de fibrinogênio no GHS foi menor

que o grupo GC ( $P=0,0442$ ) (Tabela 3 e Figura 1.b). Também houve diferença entre as horas na análise linfocitária, sendo que nas horas iniciais houve menor contagem comparado com as horas finais ( $P=0,0249$ ) (Tabela 4). Não houve diferença nos parâmetros PPT, monócitos, eosinófilos, bastonetes e segmentados (Tabela 1).

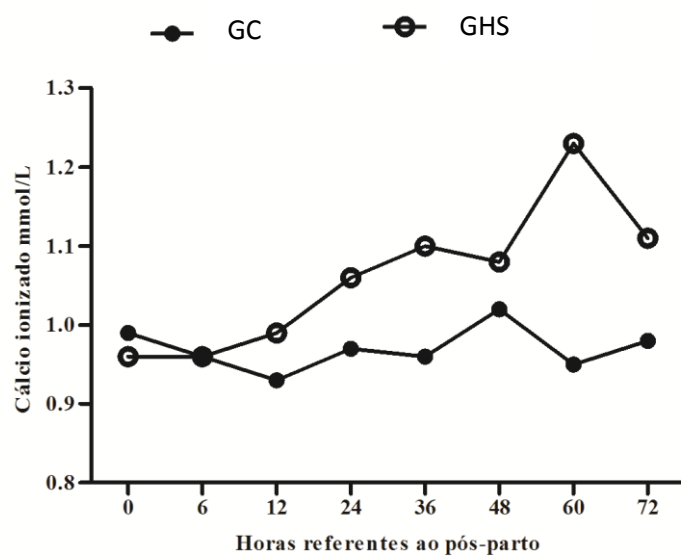
Os níveis de  $Ca^{+2}$  (Figura 2.a) e  $Ca_t$  (Figura 2.b) no pós-parto se mantiveram maiores no GHS em comparação ao GC. Um animal de cada grupo desenvolveu hipocalcemia subclínica no pós-parto, sendo que o animal do GHS os níveis de  $Ca^{+2}$  retornaram ao basal mais rapidamente que o do GC (Figura 3).



**Figura 1:** a) Média de Células Sanguíneas Brancas no decorrer do tempo entre o GHS e GC. b) Média fibrinogênio no decorrer do tempo entre o GHS e GC



**Figura 2:**  $Ca^{+2}$  (a) e  $Ca_t$  (b) de vacas dos grupos GHS e GC no pós-parto



**Figura 3:** Níveis de Ca<sup>2+</sup> de vaca dos GHS e GC que tiveram hipocalcemia subclínica após o parto.

**Tabela 1:** Médias do GHS e GC

	GHS	GC	Valor de p Grupo	Valor de p Hora	Valor de p Grupo*Hora
CBS	12083	7976	0.0178	0.8026	0.9225
PPT	6,53	7,01	0.1130	0.9474	0.9856
Fibrinogênio	545,83	741,18	0.0442	0.6919	0.3866
Monócitos	0,5	0,6	0.1474	0.2337	0.1366
Eosinófilos	5,55	3,9	0.2894	0.7450	0.8243
Bastonetes	1,6	1,5	0.2654	0.3171	0.1982
Segmentados	39,98	42,5	0.2136	0.2672	0.1766
Linfócitos	52,45	50,07	0.5433	0.0249	0.0795

GHS - Grupo Hipocalcemia Subclínica, GC - Grupo controle, CBS - Células brancas sanguíneas, PPT - proteínas plasmáticas totais

**Tabela 2:** Médias  $\pm$  erro padrão da concentração de leucócitos para os GC e GHS no decorrer das horas

	Média CSB <sup>1</sup>						Valor de p Grupo	Valor de p Hora	Valor de p Grupo * Hora
	0h	6h	12h	24h	48h	72h			
GHS <sup>2</sup>	13.46 $\pm$ 3.68	16.06 $\pm$ 3.68	16.63 $\pm$ 3.68	12.73 $\pm$ 3.68	14.20 $\pm$ 3.68	8.26 $\pm$ 3.68	0.0178	0.8026	0.9225
GC <sup>3</sup>	8.80 $\pm$ 4.51	8.20 $\pm$ 3.68	8.13 $\pm$ 3.68	7.86 $\pm$ 3.68	7.80 $\pm$ 3.68	7.33 $\pm$ 3.68			

<sup>1</sup> Células sanguíneas brancas, <sup>2</sup> Grupo Hipocalcemia Subclínica, <sup>3</sup> Grupo Controle

**Tabela 3:** Médias  $\pm$  erro padrão de fibrinogênio para os GC e GHS no decorrer das horas

	Média Fibrinogênio						Valor de p Grupo	Valor de p Hora	Valor de p Grupo*Hora
	0h	6h	12h	24h	48h	72h			
GHS <sup>1</sup>	533 $\pm$ 137	667 $\pm$ 137	233 $\pm$ 137	733 $\pm$ 137	667 $\pm$ 137	533 $\pm$ 137	0.0442	0.6919	0.3866
GC <sup>2</sup>	600 $\pm$ 168	800 $\pm$ 137	800 $\pm$ 137	733 $\pm$ 137	733 $\pm$ 138	733 $\pm$ 139			

<sup>1</sup> Grupo Hipocalcemia Subclínica, <sup>2</sup> Grupo Controle

**Tabela 4:** Médias  $\pm$  erro padrão de concentração de linfócitos para os GC e GHS no decorrer das horas

	Média Linfócito						Valor de p Grupo	Valor de p Hora	Valor de p Grupo * Hora
	0h	6h	12h	24h	48h	72h			
GHS <sup>1</sup>	32.50 $\pm$ 7.26a	40.0 $\pm$ 5.93a	42.33 $\pm$ 5.93	68.00 $\pm$ 5.93a	59.67 $\pm$ 5.93a	59.67 $\pm$ 5.94a	0.5433	0.0249	0.0795
GC <sup>2</sup>	44.00 $\pm$ 7.27a	50 $\pm$ 7.27a	48.00 $\pm$ 7.27b	31.00 $\pm$ 7.27bc	59.00 $\pm$ 7.27bc	57.5 $\pm$ 7.27bc			

a, b, c - letras diferentes nas linhas houve diferença entre as horas, <sup>1</sup> Grupo Hipocalcemia Subclínica, <sup>2</sup> Grupo Controle

### 2.3 Discussão

A redução da concentração de Ca extracelular, causa uma redução na quantidade de Ca intracelular, ocasionando assim uma redução na da fagocitose das células polimorfonucleares (DUCUSIN, 2003). O  $\text{Ca}^{+2}$  é importante iniciador fagocitário, pois ele é responsável pela ligação dos reservatórios de lisossomas com o fagossoma (SAYEED, 2000).

O valor de referência da concentração de leucócitos em bovinos para SAUT e BIRGEL JUNIOR (2004), são de aproximadamente 12.200-19.000 células/ $\text{mm}^3$ , com um desvio padrão de cerca de 5600 células/ $\text{mm}^3$  para o gado holandês. Neste trabalho observa-se que a concentração de leucócitos se encontra dentro dos valores de referência. Houve diferença entre os grupos, demonstrando que o Ca é um importante componente para a proliferação das células (BURGOS et al., 2011). Martinez et al. 2014, diferentemente dos resultados deste trabalho, não documentou uma redução na concentração de leucócitos em vacas não prenhes que passaram por uma indução de hipocalcemia, entretanto a mesma autora em 2012, obteve como resultado que vacas que tiveram hipocalcemia subclínica no pós-parto, a concentração de seus leucócitos foi reduzida, sendo que esses animais que tiveram este transtorno, tiveram maior incidência de metrite.

É importante ressaltar que existe a possibilidade de que as células possam ter uma ação fagocitária reduzida, isto devido o cálcio ser um importante ativador do sistema NADPH, que é responsável pelo aumento de EROs dentro das células (BRÉCHAD & TSCHIRHART, 2010), neste estudo os animais do GC obtiveram uma menor quantidade na  $[\text{Ca}^{+2}]$  extracelular o que pode acarretar neste problema. Não houve diferenças na concentração de neutrófilos, porém é necessário fazer mais testes, envolvendo o estudo da quantidade de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, e também na [ERO] para que se possa avaliar a ação fagocitária dessas células.

Os resultados de fibrinogênio demonstram que a uma importante relação com o Ca, pois o GHS teve menores valores que o GC. O fibrinogênio é uma proteína de fase aguda positiva, ou seja, quando há uma infecção sua concentração é elevada, sendo que estudos já relataram que sua concentração aumentada está relacionada

com um maior índice de acometimento de doenças infecciosas como a mastite (COLLA, et al. 2009).

Houve diferença entre as horas nos grupos GHS como no GC, sendo que no decorrer do tempo houve um aumento na concentração de linfócitos. Não houve diferença entre os grupos. Nossos resultados discordam com os de Martinez et al. (2014), o qual obteve diferença na quantidade de linfócitos, com uma quantidade reduzida no grupo com hipocalcemia subclínica no pré-parto em relação ao controle. Martinez et al. 2014 explica que vacas recém paridas, tem níveis de cálcio reduzido, fazendo com que o número de linfócitos diminua, porém a maioria dos animais deste estudo não desenvolveram hipocalcemia subclínica no pós-parto, explicando o motivo pelo qual os animais não diferirem entre os grupos. Também foi evidenciado que com o decorrer do tempo houve um aumento na concentração de linfócitos, o que vai contra os resultados de outros autores (SAUT e BIRGUEL JUNIOR, 2006), onde houve uma queda na quantidade de linfócitos no pós parto.

Os níveis de  $Ca^{+2}$  e  $Ca_t$  no pós-parto do GHS, obtiveram maior concentração em relação ao GC, além de que entre os animais que desenvolveram hipocalcemia subclínica no pós-parto, o animal do GHS teve seus níveis basais retomados mais rápido que o animal do GC, ou seja, o nível de  $Ca^{+2}$  começou a aumentar 12 horas após o parto. Demonstrando que a hipocalcemia subclínica no pré-parto pode aumentar a retenção de Ca no pós-parto.



### 3 Considerações Finais

Este trabalho me propiciou grandes conhecimentos na área de hipocalcemia subclínica de vacas leiteiras, sendo de suma importância para a complementação do meu curso, pois desenvolvi os conhecimentos que adquiri durante a graduação na prática. Ter a experiência de trabalhar ao lado de uma doutoranda, e também estar envolvido de alguma forma no processo de inovação.

Tendo em vista que o grupo NUPEEC é se localiza dentro do departamento de clínica veterinária, foi um grande desafio me adaptar aos novos métodos de experimentação e conhecimentos.

Foi observado algumas alterações na concentração de leucócitos entre os grupos, podendo sugerir que o Ca é importante para a proliferação dessas células, evitando assim diversas doenças que podem acometer o bovino leiteiro. Além disso, a quantidade de fibrinogênio foi maior no grupo controle, sendo que este em níveis elevados pode causar um aumento no acometimento de doenças infecciosas, e também houve diferença entre as horas na concentração de linfócitos. Tudo isso sugere que o Ca é um importante componente para diversas funções fisiológicas dentro das células imunes.

Os animais do GHS obtiveram maiores concentrações tanto de  $Ca^{+2}$  quanto de  $Ca_t$ , do que os animais GC. Já para os animais que desenvolveram hipocalcemia subclínica no pós-parto, as vacas do GHS conseguiram recuperar mais rapidamente o cálcio, diminuindo assim a possibilidade de acarretar transtornos como deslocamento de abomaso, cetose, distocia, prolapso uterino, metrite e endometrite.

A mensuração do cálcio intracelular não foi possível devido o experimento ser a campo, não havendo a possibilidade de armazenamento das amostras, visto que com o congelamento das mesmas ocorreria a lise das células leucocitárias.

#### 4 Referências

- BRÉCHARD, Sabrina; TSCHIRHART, Eric J. Regulation of superoxide production in neutrophils: role of calcium influx. **Journal of leukocyte biology**, v. 84, n. 5, p. 1223-1237, 2008.
- BROZOS, C.; MAVROGIANNI, V. S.; FTHENAKIS, G. C. Treatment and control of periparturient metabolic diseases: pregnancy toxemia, hypocalcemia, hypomagnesemia. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, 2011, v.27, n.1, p.105–113.
- BURGOS, R. A., CONEJEROS, I., HIDALGO, M. A., et al. Calcium influx, a new potential therapeutic target in the control of neutrophil-dependent inflammatory diseases in bovines. **Veterinary immunology and immunopathology**, 2011, v.143, n.1, p.1-10.
- CARVALHO, Paulo Roberto Carlos de. Medicina Ortomolecular: um guia completo sobre os nutrientes e suas propriedades terapêuticas. 4. ed. Rio de Janeiro: Nova Era, 1999.
- CASTRO, Dália; RIBEIRO, Carlos; SIMÕES, João. Medicina da produção: incidência e distribuição de doenças metabólicas em explorações de bovinos de elevada produção leiteira na Região de Aveiro, Portugal. **PUBVET**, Londrina, v. 3, n. 2, 2009.
- CHAPINAL, N., CARSON, M. E., LEBLANC, S. J., The association of serum metabolites in the transition period with milk production and early-lactation reproductive performance. **Journal of Dairy Science**, 2012, v.95, n. 3, p. 1301-1309.
- COLLA, Marcelo Fernando et al. Valores de haptoglobina plasmática em vacas com diferentes contagens de células somáticas em amostras de leite. **Ciência Animal Brasileira**, v. 1, p. 739-743, 2009.
- CURTIS, C. R. et al. Association of parturient hypocalcemia with eight periparturient disorders in Holstein cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 183, n. 5, p. 559-561, 1983.
- DEGARIS, P. A; LEAN, I. A review for nutritional professional veterinarians and farm advisers, Transition Cow Management, **Dairy Australia's Grains2Milk and InCalf programs**, 2010.
- DUCUSIN, R. J. T. et al. Effects of extracellular Ca<sup>2+</sup> on phagocytosis and intracellular Ca<sup>2+</sup> concentrations in polymorphonuclear leukocytes of postpartum dairy cows. **Research in veterinary science**, v. 75, n. 1, p. 27-32, 2003.

GOFF, J.P, KIMURA, K. Metabolic diseases and their effect on immune function and resistance to infectious disease. **41st Annual Meeting of National Mastitis Council**, 2002 Orlando, Florida USA.

GOFF, J.P. Pathophysiology of calcium and phosphorous disorders. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, vol.16, n.2, p. 319-337, 2000

GOFF, J.P. The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. **The Veterinary Journal**, vol.176, n.1, p. 50-57, 2008

HANSEN, S.S.; JENSEN, A.L. E JORGENSEN, R.J. Evaluation of a Transportable [Ca<sup>++</sup>] and pH Analyser and of the Impact of Different Anticoagulants and Sampling Sites in Cattle. **Journal of Veterinary Medicine**. 2000. v.47, n.9, p. 541-551.

ICHINOSE, M., ASAI, M., SAWADA, M. Endorphin enhances phagocytosis of latex particles in mouse peritoneal macrophages. **Scand. J. Immunol.** 42, 311–316, 1995.

JAIN N. C. 1993. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia, pp. 417.

KARA, Ç., ORMAN, A., UDUM, D. et al. Effects of calcium propionate by different numbers of applications in first week postpartum of dairy cows on hypocalcemia, milk production and reproductive disorders. **Journal of Animal Science**, 2009. v.8, n.2, p. 259-270.

KIMURA, K., REINHARDT, T.A. e GOFF, J.T. Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle. **Journal of Dairy Science**. 2006. v.89, n.7, p. 2588-2595.

LEAN, I.J.; DEGARIS, P.J.; MCNEIL, D.M. et al. Hypocalcemia in Dairy Cows: Meta-analysis and Dietary Cation Anion Difference Theory Revisited. **Journal of Dairy Science**. 2006. v.89, n.2, p. 669-684.

LeBLANC, S.J.; LISSEMORE, K.D., KELTON, D.F. et al. Major advances in disease prevention in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**. 2006. v.89, n.4, p. 1267-1279.

LOWMAN, B.G., SCOTT, N.A. e SOMERVILLE, S.M. 1976. Condition Scoring beef cattle. The east of Scotland College of Agriculture. Bulletin N° 6.

MARTINEZ, N. et al. Effect of induced subclinical hypocalcemia on physiological responses and neutrophil function in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 2, p. 874-887, 2014.

MARTINEZ, N., RISCO, C. A., LIMA, F. S. et al. 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**. 2012. v.95, n.12, p. 7158-7172.

MULLIGAN, F.J. e DOHERTY, M.L. Productions diseases of the transition cow. **The Veterinary Journal**, vol.176, n.1, p. 3-9, 2008.

OH-HORA, Masatsugu; RAO, Anjana. Calcium signaling in lymphocytes. *Current opinion in immunology*, v. 20, n. 3, p. 250-258, 2008.

RAJALA-SCHULTZ, P.J.; GROHN, Y.T. e MCCULLOCH, C.E. Effects of milk fever, ketosis, and lameness on milk yeld in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, vol.82, n.2, p. 288-294, 1999.

REINHARDT, A.; TIMOTHY, A. John, D.; LIPPOLIS, A.; Brian, J.; MCCLUSKEY, B.; JESSE, P.; GOFF, A. e HORST, R.L. Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. **The Veterinary Journal**, vol.188, n.1, p. 122-124, 2011.

SARWAR, M., ZIA-UL-HASAN, IQBAL, Z. Dietary Cation Anion Balance in the Ruminants I- Effects on Milk Fever. **International Journal of Agriculture & Biology**, v.2, n.1-2,p.151–158, 2000.

SASAKI, K.; YAMAGISHI, N.; KIZAKI, K.; et al. Microarray-based gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells in dairy cows with experimental hypocalcemia and milk fever. **Journal of Dairy Science**, 2014. v.97, n.1, p. 247-258.

SAUT, J. P. E.; BIRGEL JUNIOR, E. H. Influência do período pós-parto sobre o leucograma de fêmeas bovinas da raça holandesa. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.** São Paulo, v. 43, n. 5, p. 588-597, 2004

SAYEED, M. M. Exuberant Ca<sup>2+</sup> signaling in neutrophils: A cause for concern. **News Phys. Sci.** 15:130–136, 2000.

STOSSEL, T. P. Quantitative studies of phagocytosis. Kinetic effects of cations and heat-labile opsonin. **J. Cell Biol.** **58**, 346–356., 1973

SUNG, S. S., YOUNG, J. D., ORIGLIO, A. M., HEIPLE, J. M., KABACK, H. R., SILVERSTEIN, S. C. Extracellular ATP perturbs transmembrane ion fluxes, elevates cytosolic [Ca<sup>2+</sup>], and inhibits phagocytosis in mouse macrophages. **J. Biol. Chem.** **260**, 3442–3449., 1985

YOUNG, J. D., Ko, S. S., COHN, Z. A. (1984) The increase in intracellular free calcium associated with IgG<sub>2b</sub>/1 Fc receptor-ligand interactions: role in phagocytosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **81**, 5430–5434.

SAUT, João Paulo Elsen; JUNIOR, Eduardo Harry Birgel. Influência do período pós-parto sobre o leucograma de fêmeas bovinas da raça holandesa. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 5, p. 588-597, 2006