

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Veterinária



TESE

**Influência da hipocalcemia subclínica no
metabolismo energético de ruminantes**

EDUARDO SCHMITT

Pelotas, 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

EDUARDO SCHMITT

Influência da hipocalcemia subclínica no metabolismo energético de ruminantes

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

Orientador:

Marcio Nunes Corrêa, Dr.
Prof° Adjunto, UFPEL

Co-orientadores:

Francisco Augusto Burkert Del Pino, Dr.
Prof° Associado, UFPEL

Juan J. Loor, PhD
Assistent Professor , UICU - USA

Pelotas, 2009

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

S335i Schmitt, Eduardo

Influência da hipocalcemia subclínica no metabolismo energético de ruminantes / Eduardo Schmitt; orientador Marcio Nunes Corrêa ; co-orientadores Francisco Augusto Burkert Del Pini e Juna J. Loo. - Pelotas,2009.- 77f. : il. - Tese (Doutorado em Sanidade Animal) –Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Faculdade de Veterinária. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2009.

1. Ruminantes 2.Pós-parto 3.Balanço energético 4.
Hipocalcemia I Corrêa, Marcio Nunes (orientador) II .Título.
CDD 636.2082

BANCA EXAMINADORA

Charles Ferreira Martins, Dr.

Prof° Adjunto, UFPEL

Félix Hilario Diaz González, Dr.

Prof° Associado, UFRGS

Ivan Bianchi, Dr.

Prof° Adjunto, UFPEL

Victor Fernando Büttow Roll, Dr.

Prof° Adjunto, UFPEL

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho...

A minha mãe...

Helena de Oliveira Schmitt, soberana na forma de educar e exemplo de conduta.

A minha família...

*Irmãos Fernanda Schmitt Moraes e Gabriel Schmitt.
Pessoas que me lembram das coisas boas que a vida tem a cada reencontro.*

Ao meu amigo

Marcio Nunes Corrêa

*Gracias Irmão!!! Vencemos mais uma etapa juntos!!
Muito obrigado pelo crédito e ensinamentos!*

A minha esposa...

Nicole Terres Schmitt

Linda luz que brilha em meu caminho. Te amo!

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), instituições que apostaram e financiaram este projeto.

MUITO OBRIGADO....

Aos amigos da Fazenda São Carlos, Maurício Costa Vargas, Leonor Costa Vargas, Eugênio Vargas, Henrique Costa Vargas, Frederico Costa Vargas que me acolheram com grande distinção e viabilizaram este trabalho.

Aos funcionários do Hospital Veterinário da UFPEL, em especial ao seu Cláudio que auxiliou na viabilização do experimento três.

Todos amigos e colaboradores do NÚCLEO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENÇÃO EM PECUÁRIA – NUPEEC, grupo ao qual me orgulho em participar. Augusto Schneider e Maikel Alan Goulart pelas participações fundamentais. Um especial agradecimento aos grandes amigos e pessoas fiéis ao nosso trabalho: Tiago Farofa, Márcio Lima, Dustin André Chaves Hoffman, Paula Montagner, Mateus Lopes. As amigas Viviane Rabassa, Viviane Masieu e Raqueli França.

Aos professores: Isabela Silveira, Claudio Dias Timm e em especial ao amigo, professor e grande colaborador Francisco Augusto Burckler Del Pino.

A Grande pessoa e colaborador Professor Juan J. Loo da University of Illinois at Urbana-Champaign e ao Daniel Guargand, Paola Piatoni, Guido Invernizzi, Maximo Bionaz e Elisa Bionaz.

Ao professor José Eduardo Portela Santos da University of Florida.

A minha família “Oliveira da Rosa” padrinhos Sueli e Armando; primos Ricardo e Rodrigo que estão sempre na torcida pelas minhas conquistas.

Meus sinceros agradecimentos ao meu sogro e sogra Jairo Terres e Guacira Gomes Terres, pelo grande apoio.

Meu conselheiro e amigo Sérgio Silva da Silva e minhas amigas Rosa Maria Jawroski e Eduarda Silva.

Amigos de empreitada Fernando Mesquita, Sérgio Machado, Diego Diel, Felipe Cardoso, Ivan Biachi.

Ao Zilmar Coelho Lessa, pessoa plena de bondade que a vida colocou em meu caminho (Obrigado tio Ziza!!).

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

RESUMO

SCHMITT, EDUARDO. **Influência da hipocalcemia subclínica no metabolismo energético de ruminantes**. 2009. 77f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Com base em evidências de que o cálcio exerce um papel importante no metabolismo energético de ruminantes, foram conduzidos três experimentos. O primeiro experimento testou a possibilidade do uso da infusão de Ca_2Cl para diagnóstico de alterações na secreção de insulina e no metabolismo da glicose em ovelhas prenhes durante o teste de tolerância à glicose. Nos outros dois experimentos foram investigados os efeitos da hipocalcemia no perfil metabólico de vacas leiteiras com boa condição corporal no pré-parto e de ovelhas que estavam em balanço energético negativo crônico (BENC). A infusão de Ca_2Cl durante o final da gestação não modificou os padrões de secreção de insulina e metabolização de glicose durante o teste de tolerância à glicose. Entretanto novas investigações são necessárias quanto à forma de administração e a dose utilizada em ruminantes. Nas vacas leiteiras que estavam em bom estado corporal no pré-parto, a hipocalcemia teve influência na condição energética destes animais. No entanto, em ovelhas que foram induzidas à hipocalcemia, e que estavam em BENC, a condição energética não foi alterada. Os resultados permitem inferir que a hipocalcemia pode ser responsável por induzir o balanço energético negativo em ruminantes, porém este efeito parece ser dependente de adaptações metabólicas ligadas ao status nutricional do pré-parto, já que quando estabelecido o BENC, a hipocalcemia não alterou os metabólitos ligados ao status energético.

Palavras chave: Hipocalcemia, pós-parto, balanço energético, ruminantes

ABSTRACT

SCHMITT, EDUARDO. **Influence of subclinic hypocalcemia in energy metabolism of ruminants.** 2009. 77f. Thesis – Graduate Program in Veterinary. Federal University of Pelotas, Pelotas.

Three experiments were designed based in evidences that the calcium have the important role in the energetic metabolism of ruminants. The first experiment tested the possibility of use the Ca^{2+} as diagnostic in impaired of insulin secretion and glucose metabolism in pregnant ewes. In the others two we researched the hypocalcemia effects in the metabolic profile of dairy cows in good body score condition during prepartum and ewes that were in chronic negative energetic balance. The calcium infusion during the late gestation seems no change insulin secretion and glucose metabolism during the glucose tolerance test. However, new investigation about the form of administration and the dose to ruminant need to be review. In dairy cows that were in good body condition score in prepartum the hypocalcemia seem has been responsible to change the energetic status. Nevertheless hypocalcaemic ewes that were in chronic negative energetic balance, the energy status was not changed. These founds suggest that the hypocalcemia could be responsible to induce the negative energetic balance in ruminants, but this effect may be dependent of adaptations conditions in the prepartum.

Keywords: Hypocalcemia, postpartum, energetic balance, ruminant

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1.1. Médias das concentrações séricas de cálcio total (mg.dL^{-1}) durante o teste de tolerância de glicose em ovelhas gestantes ou não gestantes, com ou sem administração de cloreto de cálcio.	29
Figura 1.2. Médias das concentrações plasmáticas de glicose (mg.dL^{-1}) durante o teste de tolerância à glicose em ovelhas gestantes ou não gestantes, com ou sem administração de cloreto de cálcio.	30
Figura 1.3. Concentrações séricas de insulina ($\mu\text{U.dL}^{-1}$) durante o teste de tolerância à glicose em ovelhas gestantes ou não gestantes, com ou sem administração de cloreto de cálcio.	31
Figura 2.1. Médias da produção leiteira das vacas normocalcêmicas e hipocalcêmicas durante as primeiras semanas de lactação.	39
Figura 2.2. Médias dos níveis séricos de cálcio de vacas normocalcêmicas e hipocalcêmicas durante todo periparto.....	40
Figura 2.3. Níveis médios de AST de vacas normo e hipocalcêmicas durante o periparto.	41
Figura 2.4. Dinâmica da relação glucagon/insulina nas vacas normo e hipocalcêmicas durante o periparto.....	42

Figura 2.5. Escore de condição corporal de vacas normo e hipocalcêmicas durante o periparto	42
Figura 2.6. Níveis médios de glucagon de vacas normo e hipocalcêmicas durante o periparto	43
Figura 2.7. Níveis médios de AGNE de vacas normo e hipocalcêmicas durante o periparto.	44
Figura 3.1. Níveis de cálcio total e ionizado (no soro e plasma, respectivamente), dos grupos normo e hipocalcêmicas durante os cinco dias pós-parto.	57
Figura 3.2. Níveis séricos de uréia para grupos normo e hipocalcêmicas ao longo dos cinco dias pós-parto	57
Figura 3.3. Níveis de Ácidos Graxos não Esterificados (AGNE) nos cinco dias pós-parto para grupo normo e hipocalcêmicas.	59
Figura 3.4. Níveis séricos de gama glutamil transferase (GGT) dos grupos normo e hipocalcêmicas ao longo dos cinco dia pós-parto.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Porcentagem de fibra bruta, proteína bruta, extrato etéreo e cinzas por kilo de matéria seca das pastagens de *B. decumbens* e *P. maximun* duante o período experimental..... 37

Tabela 2. 1. Perfil metabólico dos grupos normocalcêmicas e hipocalcêmicas durante os cinco dias pós-parto. 62

SUMÁRIO

	Página
BANCA EXAMINADORA _____	4
DEDICATÓRIA _____	5
AGRADECIMENTOS _____	6
RESUMO _____	8
ABSTRACT _____	9
SUMÁRIO _____	13
1. INTRODUÇÃO GERAL _____	14
2. OBJETIVOS _____	17
3. ARTIGO I: EFEITO DE UMA INFUSÃO DE CÁLCIO DURANTE O TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE EM OVELHAS GESTANTES E NÃO GESTANTES	18
4. ARTIGO II: INFLUÊNCIA DA HIPOCALCEMIA SUBCLÍNICA NO BALANÇO ENERGÉTICO DE VACAS LEITEIRAS _____	32
5. ARTIGO III: O BALANÇO ENERGÉTICO NEGATIVO CRÔNICO NÃO É AGRAVADO PELA HIPOCALCEMIA SUBCLÍNICA EM OVELHAS DE CORTE LACTANTES _____	50
8. CONCLUSÕES GERAIS _____	68
10. REFERÊNCIAS _____	69

1. INTRODUÇÃO GERAL

Em ruminantes o período que compreende as últimas semanas de gestação e as primeiras de lactação (período de transição) é caracterizado por uma ingestão de nutrientes energéticos que costuma ser insuficiente para prover as demandas de manutenção e produção, determinando um estado de catabolismo conhecido como balanço energético negativo (GOFF et al., 1997; GARRETT, 2003; SCHEIA et al., 2005; WATHES et al., 2007). Este período crítico tem início com o final do crescimento fetal, que determina um aumento da demanda nutricional em torno de 75% a mais em relação a animais não gestantes (BAUMAN & CURRIE, 1980). Para isso são necessárias adaptações no metabolismo da gestante mediados por mecanismos homeorréticos, que passam pela maximização da ingestão calórica, aumento da resposta secretória de insulina, resistência à insulina em tecidos periféricos, além do aumento da lipólise com elevações nos níveis sanguíneos de ácidos graxos para fornecimento de energia (BRELJE et al., 1993). O acionamento destas rotas catabólicas que ocorre principalmente nos tecidos adiposo e hepático, se muito intenso, pode aumentar o risco de doenças metabólicas, com comprometimento dos índices produtivos e reprodutivos (LUCY, 2001; MANDEBVU et al., 2003; WATHES et al., 2007). A manifestação destas doenças metabólicas nem sempre ocorre na forma clínica, podendo ocorrer sob forma subclínica, que por sua vez trazem prejuízos ainda maiores para os sistemas produtivos, com dificuldades no diagnóstico e caracterização do problema, ainda que as perdas produtivas possam ser detectadas (NOORDHUIZEN, 2006). Destaca-se, por exemplo, que a hipocalcemia subclínica e lipidose hepática em ruminantes pode apresentar prevalência em torno de 50% (HOVE, 1986; Henze et al., 1994; INGVARTSEN, 2006). Já a cetose subclínica, outra importante doença metabólica que antecede a lipidose hepática, demonstra índices de prevalência acima de 34%

dependendo de fatores ligados a nutrição do rebanho e condições gerais de manejo (MILLS et al., 1986; DUFFIELD et al., 1997).

A hipocalcemia se manifesta quando as quantidades diárias de cálcio demandadas pela glândula mamária, sobrepõem a capacidade do paratormônio e vitamina D em manter a homeostase do cálcio sanguíneo. Por este motivo, fatores como a idade, alta produção e partos gemelares são os principais fatores de risco (GOFF, 2006). A alteração do bom funcionamento do sistema regulador do cálcio está ligada principalmente ao desequilíbrio cátion-aniônico durante o período de transição e é apontado como uma das principais causas da hipocalcemia. Dietas aniônicas no pré-parto em combinação com adequada suplementação de cálcio e magnésio no pós-parto aumentam o consumo de matéria seca e pode reduzir o balanço energético negativo no início da lactação (WILDE, 2006). Por isto, a interação de fatores endócrinos e metabólicos no período de transição tem sido foco de muitas pesquisas, assim como a participação dos minerais no equilíbrio energético pré e pós-parto (INGVARTSEN, 2006). Neste contexto, estudos em animais hipocalcêmicos tem demonstrado a importância do cálcio na manutenção dos níveis de glicose no plasma sanguíneo, destacando o efeito depressor na hipocalcemia na produção de glicose endógena quando associada a hiperetonemia, mostrando a importância desta enfermidade para o agravamento do balanço energético negativo (EL-SAMAD et al., 2002; SCHLUMBOHM & HARMEYER, 2003.; WALZ et al., 2007). Baixas concentrações de cálcio extra e intracelular prejudicam o aumento dos mediadores de glicose e a taxa de oxidação da glicose no músculo e tecido adiposo (DRAZNIN et al., 1987; YOUN et al., 1991), sendo que em humanos foi demonstrado, que o cálcio exerce um efeito lipogênico direto, pela abertura de canais de cálcio mediados pela 1,25 dihidroxi-vitamina D. Uma vez no interior da célula o cálcio promove aumento da expressão gênica da enzima ácido graxo sintetase, que por sua vez estimula a lipogênese e diminui a lipólise (ZEMEL et al., 2000ab; ZEMEL, 2001). No entanto, dietas com altas concentrações de cálcio diminuem as concentrações de 1,25 dihidroxi-vitamina D, pelo mecanismo de *down-regulation*, ocasionando diminuição do fluxo de cálcio no adipócito inibindo a enzima ácido graxo sintetase estimulando a lipólise consequentemente (ZEMEL, 2001). Isso demonstra a variabilidade da ação do cálcio no tecido adiposo de acordo com a relação de níveis de vitamina D e

receptores, com uma dupla ação do cálcio diretamente ligada a disponibilidade na dieta.

O cálcio é também um importante co-fator na exocitose dos grânulos de insulina nas células β pancreáticas, participando das duas fases de secreção (HARTER et al., 1976). A primeira fase é rápida e transitória (5-10 min), podendo ser induzida pela glicose e outros nutrientes, estimulando a secreção de insulina diretamente ou via canais de potássio dependentes de ATP. Estes estímulos envolvem fechamento de canais de potássio, despolarização da membrana e, subsequente, abertura dos canais de cálcio, aumentando sua concentração intracelular, que desencadeia a descarga de grânulos pré-formados contendo insulina do meio intracelular para o extracelular. O estímulo desta primeira fase pode ser desencadeado sem a presença de glicose, pela arginina ou pelo aumento dos níveis de potássio extracelular. Já a segunda fase desenvolve-se de forma mais lenta e sustentável, sendo considerada uma ampliação da primeira, em que os grânulos contendo insulina não estão pré-formados. Nesta fase, apenas metabólitos da glicose estimulam a liberação de insulina, sendo que o cálcio é a chave para exocitose atuando em múltiplos efetores *downstream* (HOLST. & GROMADA, 2004). Desta forma fica evidente que a secreção da insulina é dependente principalmente de glicose e cálcio, que por sua vez no período de transição de ruminantes costumam ser grande parte, desviados para produção de leite. Os recentes estudos tem focado na baixa disponibilidade de glicose em virtude de baixa ingestão de matéria seca, como causa principal da hipoinsulinemia pós-parto determinando uma maior mobilização de ácidos graxos não esterificados, bem como o agravamento do balanço energético negativo. Entretanto, o efeito da hipocalcemia subclínica na hipoinsulinemia pós-parto de ruminantes não tem sido investigado.

2. OBJETIVOS

Os objetivos desta tese foram através da utilização de ovelhas como modelos para vacas leiteiras:

1. Avaliar o efeito da administração de cálcio como método auxiliar de diagnóstico em disfunções na secreção de insulina e no metabolismo de carboidratos durante o teste de tolerância à glicose em ovelhas gestantes;
2. Investigar a presença de alterações no perfil metabólico de vacas leiteiras com hipocalcemia subclínica durante o parto;
3. Avaliar os efeitos da hipocalcemia subclínica em alguns marcadores relacionados ao balanço energético durante os primeiros cinco dias de lactação de ovelhas de corte em balanço energético negativo crônico.

3. ARTIGO I: Efeito de uma infusão de cálcio durante o teste de tolerância à glicose em ovelhas gestantes e não gestantes

**Submetido: *Revista Ciência Rural*
(Formatado segundo as normas da revista)**

Eduardo Schmitt¹ Augusto Schneider² Maikel Alan Goulart¹ Elizabeth Schwegler¹ Dustin André Chaves Hoffmann¹ Mateus Silveira Lopes¹ Lúcio Vendramin¹ José Wilson da Silva Neto¹ Lucas Teixeira Hax¹ Talita Bandeira Roos² Thomaz de Lucia Jr.¹ Francisco Augusto Burkert Del Pino³ Marcio Nunes Corrêa¹

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de uma infusão de cálcio como método auxiliar de diagnóstico em disfunções na secreção de insulina e no metabolismo de carboidratos durante o teste de tolerância à glicose em ovelhas gestantes e não gestantes. Dezesesseis ovelhas foram submetidas ao teste de tolerância à glicose, através da administração endovenosa de uma solução de glicose na dose de 500 mg/kg de peso vivo. O momento da administração da glicose foi considerado o momento zero (0), 150 e 180 minutos, para avaliação dos níveis de cálcio, glicose e insulina. As ovelhas foram divididas em quatro tratamentos: não gestantes controle (NGC, n=4); não gestantes tratamento (NGT, n=4); gestantes controle (GC, n=4); gestantes tratamento (GT, n=4). Os animais pertencentes aos grupos tratamento receberam duas doses de 1 mg/kg peso vivo de cloreto de cálcio (CaCl_2) nas coletas -15 e 0. Os níveis de cálcio foram similares entre os grupos durante todas as coletas, não influenciando a secreção de insulina ($P>0,05$). O padrão de desaparecimento da glicose foi semelhante entre os grupos, assim como o padrão de secreção de insulina, não havendo diferença ($P>0,05$) entre ovelhas gestantes e não gestantes. Os resultados permitem concluir que as infusões endovenosas CaCl_2 na dose de 1mg/kg de peso vivo não foram capazes de alterar os níveis séricos de cálcio, bem como o padrão secretório de insulina e a metabolização de glicose, em ovelhas gestantes ou não gestantes.

1 Departamento de Clínicas Veterinária, Hospital Veterinário, Universidade Federal de Pelotas - RS, Brasil

2 Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas - RS, Brasil

3 Instituto de Química e Geociências, Universidade Federal de Pelotas - RS, Brasil

Campus Universitário – 96010 900 - Pelotas/RS - www.ufpel.edu.br/nupeec

E-mail: e.schmitt@terra.com.br - Tel: (53) 3275 7295

Palavras chaves: glicose, insulina, cálcio, gestação, ovelhas.

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the effect of a calcium infusion as diagnostic auxiliary method in impaired of insulin secretion and glucose metabolism during Glucose Tolerance Test in pregnant or no pregnant ewes. Were used eight

pregnant ewes crossbreed (Texel x Corriedale) between 98-130 day of gestation and eight were not pregnant. The glucose was infused in the zero (0) moment, one dose 500 mg/kg of body weight of the Glucose was infused in all ewes and four ewes pregnant and four no pregnant also received 1mg/kg of body weight of CaCl₂ intravenous solution in the -15 and 0 moments, composing four groups: pregnant treatment (n=4), pregnant control (n=4), no pregnant treatment (=4) and no pregnant control (n=4). The blood samples were collected to measurements of calcium, glucose and insulin in the -15, 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 minutes. The calcium concentrations during all collections were similar between groups and did not influence in insulin secretion. The clearance rate of glucose was not different between groups, as well as the insulin secretion and clearance. The two infusions of calcium 1mg/kg were not enough to change serum calcium as well as the pattern of insulin secretion and glucose metabolism in pregnant or not pregnant ewes.

Key words: glucose, insulin, calcium, gestation, ewes.

INTRODUÇÃO

A gestação induz diversas alterações no metabolismo materno, aumentando em aproximadamente 75% a exigência de nutrientes no período final da gestação (BAUMAN & CURRIE, 1980). Para atender esta demanda são necessárias adaptações, tais como, a maximização da ingestão calórica, aumento da resposta secretória de insulina, resistência à insulina em tecidos periféricos, além de alterações no metabolismo lipídico e protéico (BRELJE et al., 1993). Neste período aproximadamente 35% da glicose circulante da gestante é direcionada para satisfazer as demandas energéticas da unidade fetoplacentária (HAY et al., 1983). Desta forma, o feto desenvolve uma vantagem competitiva para seu desenvolvimento através de adaptações no metabolismo de carboidratos da gestante, destacando-se o aumento da resistência a insulina nos tecidos periféricos de forma progressiva e reversível (BAAZIZ & CURRY, 1993; HOLNESS & SUGDEN, 1999).

A demanda de cálcio também atinge seu pico ao final da gestação devido à mineralização do esqueleto fetal o que também determina adaptações no metabolismo mineral e ósseo da gestante (WONG et al., 1980; BROMMAGE &

DELUCA, 1985). Em ovinos HENZE et al. (1994) evidenciaram que cerca de 50% das ovelhas gestantes apresentam concentrações plasmáticas de cálcio menores que 8,4 mg/dL nas últimas semanas da gestação, enquanto ovelhas saudáveis não-gestantes possuem média de 10 mg/dL. A importância deste mineral nas funções metabólicas está ligada à participação do cálcio no mecanismo de segundo mensageiro celular, fundamental para a exocitose dos mediadores químicos envolvidos no funcionamento dos sistemas endócrino, imune, nervoso e muscular (OHEIM et al., 2006). Já na década de 1970 foi demonstrado, que vacas leiteiras pós-parto, com concentrações séricas de cálcio abaixo de 6 mg/dL tinham baixa secreção de insulina, apesar dos altos níveis de glicose plasmática (BLUM et al., 1972). Estas vacas, quando submetidas a uma infusão de cálcio endovenoso tinham rápida elevação da insulina plasmática, porém o mesmo não foi observado naquelas com níveis normais de cálcio (BLUM et al., 1972). Recentemente estudos têm elucidado as diferentes etapas de participação deste mineral na secreção de insulina pelas células β pancreáticas (HELLMAN & GYLFE, 1986; RUTTER *et al.*, 2006). Também baseado neste mecanismo, foi desenvolvido um protocolo com a utilização de uma infusão de cálcio para diagnóstico e localização de tumores pancreáticos em humanos, baseando-se na resposta a este estímulo, traduzida pelos níveis de secreção de insulina (BRUNT et al., 1986)

Através destas evidências, a hipótese deste estudo é que administração de cálcio endovenoso durante o teste de tolerância à glicose pode modificar o padrão secretório de insulina no pâncreas, bem como a metabolização de glicose dependendo do estado metabólico e condição fisiológica dos tecidos periféricos. Assim buscou-se fornecer novos achados para caracterizar diferenças entre ovelhas gestantes e não gestantes, quanto ao equilíbrio do metabolismo energético e mineral, bem como suas inter-relações.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da administração de cálcio como método auxiliar de diagnóstico de disfunções na secreção de insulina e no metabolismo de carboidratos durante o teste de tolerância à glicose em ovelhas gestantes e não gestantes.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado em setembro de 2007 junto ao Centro Experimental de Ovinos do Núcleo de Pesquisa Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC) da Universidade Federal de Pelotas. Foram utilizadas oito ovelhas entre 98 e 130 dias de gestação e oito não gestantes, com peso médio de 54,87 kg e 46,75 kg respectivamente. Estas foram divididas em quatro tratamentos: não gestantes controle (NGC, n=4); não gestantes tratamento (NGT, n=4); gestantes controle (GC, n=4); gestantes tratamento (GT, n=4). As ovelhas estavam sob mesmo regime alimentar de semi-confinamento, com fornecimento de 1,5% do peso vivo de concentrado contendo 15% de proteína bruta, 12% de matéria mineral, 1,5% de cálcio, 0,9% de fósforo, 2% de extrato etéreo e 13% de matéria fibrosa. Além do concentrado as ovelhas permaneciam 6 horas em pastagem de aveia e azevém.

Após um jejum alimentar de 12 horas, com livre acesso a água, as ovelhas foram submetidas durante 1 minuto à administração endovenosa de uma solução de glicose, na dose de 500 mg/kg de peso vivo (REGNAULT et al., 2004). O momento da administração da glicose foi considerado o momento zero (0), sendo realizadas coletas de sangue -15, 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos da infusão de glicose. As ovelhas dos grupos NGT e GT receberam duas doses de 1 mg/kg de peso vivo de uma solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) por via endovenosa (BRUNT et al., 1986) nas coletas -15 e 0. As coletas de sangue foram realizadas por punção da veia jugular, utilizando o sistema *Vacutainer* (BD Diagnostics, São Paulo, Brasil), com um tubo contendo anti-coagulante (EDTA) e fluoreto de potássio, para determinação de glicose e outro sem anti-coagulante para determinação de cálcio e insulina. As análises de cálcio total (Cálcio Liquiform, Labtest, Lagoa Santa, Brazil, limite de detecção fotométrica 0,024mg/dL) e glicose (Glicose PAP Liquiform, Labtest, Lagoa Santa, Brazil, limite de detecção fotométrica 0,41mg/dL) foram realizadas pelo método colorimétrico, conforme as recomendações do fabricante, utilizando o espectrofotômetro Femto 650 (Femto Ind. e Com. de Instrumentos Ltda., São Paulo, Brazil). A insulina foi determinada pelo método de eletroquimioluminescência, utilizando o Elecsys Systems 2010 e metodologia conforme descrita pelo fabricante do Kit Insulina (Roche).

Para o cálculo da área sob a curva (ASC) para a glicose e insulina foi utilizada a área do trapézio formado entre duas coletas subsequentes no gráfico, considerando-se as alterações com relação ao nível basal de cada indivíduo (Área =

(Valor Coleta 1 – Valor Basal + Valor Coleta 2 – Valor Basal) *Intervalo entre coletas/2) (REGNAULT et al., 2004).

Os resultados foram analisados utilizando o Software SAS (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA) e são apresentados com média \pm erro padrão da média. Foi utilizada análise de variância por medidas repetidas, sendo as repetições: intervalos de coleta e a unidade experimental cada animal; considerando efeitos randômicos: animais dentro de seus respectivos grupos; efeito fixo: tratamento e; variáveis resposta: concentração de glicose, cálcio e insulina nas comparações entre tratamentos e interações tempo e tratamento. O nível de significância quando $P < 0,05$ e as médias foram comparadas através do teste de Tukey-Kramer.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os níveis de cálcio plasmático total não diferiram entre os quatro tratamentos durante todo o período experimental (Figura 1.1), bem como entre ovelhas gestantes e não gestantes ($P > 0,05$) que tiveram médias de $8,52 \pm 0,18$ e $8,82 \pm 0,09$ mg/dL respectivamente. Estes valores para ovelhas gestantes e não gestantes estão de acordo com os valores de referência de 8,5 e 12,5 mg/dL (WATT, 2006; ELKHODERY, et al., 2008) e evidenciam que os animais estavam em homeostase quanto ao balanço deste mineral. Tal condição pode ter favorecido a rápida excreção do cálcio administrado, evidenciado na Figura 1 pela ausência de um pico dos níveis plasmáticos de cálcio após a administração de 1mg/kg de peso vivo de CaCl_2 nos animais tratados. Esta dose de cálcio é a mesma que tem sido utilizada nos diagnósticos de insulinomas em humanos (BRUNT et al., 1986; DOPPMAN, 1993), porém infundida diretamente na artéria pancreática, garantindo que não haja excreção ou mesmo utilização de parte da dose por outros tecidos até a chegada no pâncreas. Neste estudo optou-se pela administração na veia jugular devido ao número de animais utilizados e pela facilidade de manejo, assumindo o risco da metabolização ou excreção do cálcio excedente.

Com relação aos níveis de glicose sanguínea (Figura 1.2) no início do tratamento (-15min), estes também estavam de acordo com os valores de referência observados por outros autores e considerados fisiológicos para ovelhas gestante ou não gestante (ELMAHDI et al., 1997, WILLIAMS, et al., 2004; RIBEIRO et al., 2004; CALDEIRA, 2005). Não houve diferença entre os tratamentos, ($P > 0,05$) quanto ao

padrão de desaparecimento da glicose e insulina, segundo a ASC. Tais resultados discordam de estudos que demonstram uma menor capacidade de metabolização da glicose em ovelhas no terço final de gestação, devido uma maior resistência dos tecidos periféricos a insulina (SCHLUMBOHM, 1997; REGNAULT et al., 2004). Outro foco de discussão destas diferenças, além da condição fisiológica, são os fatores epigenéticos regidos pelo ambiente uterino durante a vida fetal. Estes determinam a programação celular e por sua vez, influenciam o metabolismo energético na vida adulta compondo diferenças entre indivíduos. Uma delas é quanto ao metabolismo de glicose que neste estudo demonstrou grande variação ($P < 0,01$), e pode ter favorecido a inexistência de efeitos entre tratamentos (FOWDEN & FORHEAD, 2004; SINCLAIR et al., 2007; HUSTED et al., 2008). A secreção de insulina e a responsividade dos tecidos periféricos já é determinada na vida fetal de acordo com aporte nutricional que as células β pancreáticas e os tecidos periféricos são expostos (FOWDEN & FORHEAD, 2004; SINCLAIR et al., 2007).

Em uma análise isolada de cada grupo comparou-se os níveis médios de glicose entre coletas e observou-se que o as ovelhas do grupo GC, foram as únicas, cujos níveis plasmáticos de glicose foram diferentes entre a primeira e última coleta (-15 min, 180 min) ($P < 0,05$), sugerindo menor taxa metabolização da glicose. Nas ovelhas NGT, os níveis de glicose não foram diferentes nos momentos 150 min e -15 min. ($P > 0,05$), enquanto que nos grupos GT e NGC, isto ocorreu apenas nos 180 min. Por esta análise, os resultados sugerem que a aplicação de cálcio, pode ter acelerado a metabolização de glicose nas ovelhas tratadas, já que o grupo NGT retornou mais rapidamente a níveis próximos dos basais e o grupo GT mostrou o mesmo padrão do grupo NGC. Nos animais tratados, o cálcio poderia ter exercido o efeito de favorecer a metabolização da glicose nos tecidos periféricos relacionado a diminuição da resistência a insulina conforme já proposto por outros autores (SCHLUMBOHM et al., 2003; SUN, et al., 2005; WALZ et al., 2007).

Embora os níveis de insulina (Figura 1.3) não tivessem diferido entre os grupos ($P > 0,05$), também se analisou isoladamente cada tratamento observando que o padrão de secreção de insulina entre coletas no grupo NGT retornou aos níveis basais aos 180 min. Já nos grupos NGC, GT e GC, este mesmo padrão não foi observado, pois após a aplicação de glicose houve elevação dos níveis séricos de insulina, os quais não retornaram ao nível basal aos 180 min.

Estes resultados para as ovelhas gestantes estão de acordo com o observado por Schlumbohm et al., (2003), que observaram um menor aumento na concentração de insulina em resposta a uma carga de glicose nas ovelhas no terço final de gestação em comparação com animais não gestantes. Conforme a gestação avança em ovinos, a concentração materna de insulina, assim como a resposta da insulina a uma carga de glicose é significativamente reduzida (VAN DER WALT et al., 1980; FOWDEN, 1982). Assim sendo, também não pode ser descartada a hipótese de uma inadequada resposta ao aumento do gradiente de concentração de cálcio nas células β pancreáticas, determinando que a infusão de cálcio não seja a melhor forma de estimularmos a secreção de insulina nesta categoria.

Cabe salientar que as análises isoladas por grupo não constituem a metodologia mais adequada para inferências dos resultados, entretanto algumas respostas discutidas por esta análise condizem com achados na literatura conforme discutido nos parágrafos anteriores. Um modelo experimental adequado para contornar as variações fruto da resposta individual manifestada neste trabalho seria o quadrado latino. Tanto a dose, quanto o número de infusões poderiam ser revistos para avaliar qual seria o efeito da rápida infusão de cálcio durante o teste de tolerância à glicose em ovinos.

CONCLUSÃO

As infusões com CaCl_2 na dose de 1mg/kg de peso vivo não foram capazes de alterar o padrão secretório de insulina em ovelhas gestantes e não gestantes, bem como a taxa de metabolização da glicose.

REFERÊNCIAS

- BAAZIZ N.; CURRY DL. Synthesis-secretion coupling of insulin: effect of pregnancy and lactation. **Pancreas**, v. 8 p. 316–324, 1993.
- BAUMAN DE.; CURRIE WB. Partitioning of Nutrients During Pregnancy and Lactation: A Review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. **Journal of Dairy Science**, v. 63, p.1514-1529, 1980.
- BLUM, J.W. et al. Plasma insulin concentrations in parturient cows. **J Dairy Sci.**, v. 56, p. 459-464, 1972.
- BRELJE, T.C. et al. Effect of homologous placental lactogens, prolactins, and growth hormones on islet β -cell division and insulin secretion in rat, mouse, and human islets: implication for placental lactogen regulation of islet function during pregnancy. **Endocrinology**, v. 132 n.2, p. 879-887, 1993.
- BROMMAGE, R.; DELUCA, HF. Regulation of bone mineral loss during lactation. **Am J Physiol.**, v. 248, p.182–187, 1985.
- BRUNT, L. M. et al. Stimulation of insulin secretion by a rapid intravenous calcium infusion in patients with beta-cell neoplasms of the pancreas. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 62 n.1, p. 210-6, 1986.
- CALDEIRA, R. M. Monitorização da adequação do plano alimentar e do estado nutricional em ovelhas. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 100 (555-556), p.125-139, 2005.
- DOPPMAN, J.L.; et al. Insulinomas: localization with selective intraarterial injection of calcium. **Radiology**. v.178, p.237-241. Erratum, Radiology. p.187-880, 1993.
- ELMAHDI, B. et al. Comparative aspects of glucose tolerance in camels, sheep, and ponies. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 118A, n.1, p. 147–151, 1997.
- EI-KHODERY, S.; EI-BOSHY, M.; GAAFAR, K.; ELMASHAD, A. Hypocalcemia in Ossimi Sheep Associated with Feeding on Beet Tops (*Beta vulgaris*). **Turk. J. Vet. Anim. Sci.**, v.32 n.3, p.199-205, 2008.
- FOWDEN, A. L. & FORHEAD, A. J. Endocrine mechanisms of intrauterine programming **Society for Reproduction and Fertility**. p.1741–1789 (Online version via www.reproduction-online.org), 2004.
- HAY, W. W. et al. Partition of maternal glucose production between conceptus and maternal tissues in sheep. **Am J Physiol.**, v. 245, p.E347–E350, 1983.

- HELLMAN, B.; GYLFE, E. Calcium and the control of insulin secretion. In: Cheung WY (eds) Calcium and Cell Function. **Academic Press**, Orlando, v. VI, p. 253–326, 1986.
- HENZE, P. et al. The influence of the hormones insulin, cortisol, growth hormone and total oestrogen on the pathogenesis of ketosis in sheep. **Dtsch tieraerztl Wschr**, v. 101, p.61–65, 1994.
- HOLNESS, MJ.; SUGDEN, MC. In late pregnancy insulin-dependent glucose transport/phosphorylation is selectively impaired and activation of glycogen synthase by insulin facilitated in skeletal muscles of 24-h starved rats. **Diabetologia**, v. 42, p.802–811, 1999.
- HUSTED, S.M. et al. Glucose homeostasis and metabolic adaptation in the pregnant and lactating sheep are affected by the level of nutrition previously provided during her late fetal life. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 34, Issue 4, p. 419-431, 2008.
- OHEIM, M. et al. Calcium microdomains in regulated exocytosis. **Cell Calcium**, v.40, p. 423–439, 2006.
- REGNAULT, T. R. H. et al. Glucose-stimulated insulin response in pregnant sheep following acute suppression of plasma non-esterified fatty acid concentrations. **Rep Biol End**, v. 2, p.64, 2004.
- RIBEIRO, L. A.O.; et al. Perfil metabólico de ovelhas Border Leicester x Texel durante a gestação e a lactação **Rev. Portug. de Ciên. Vet.** v. 99 (551), p.155-159, 2004.
- RUTTER, G.A. et al. Ca²⁺ microdomains and the control of insulin secretion. **Cell Calcium**, v.40, p. 539–551, 2006.
- SAS Institute Inc., SAS 9.1.3 Help and Documentation, Cary, NC: SAS Institute Inc., 2000-2004.
- SCHLUMBOHM, C., SPORLEDER, H.P; GURTLER,H.; HARMEYER, J. The influence of insulin on metabolism of glucose, free fatty acids and glycerol in normo- and hypocalcemic ewes during different reproductive states. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 104 n.9, p.359-365, 1997.
- SCHLUMBOHM, C.; HARMEYER, J. Hypocalcemia reduces endogenous glucose production in hyperketonemic sheep. **J Dairy Sci.**, v. 86, p.1953–1962, 2003.

- SINCLAIR, K.D. et al. DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. **PNAS**, December 4, v. 104, n. 49, p. 19351–19356, 2007.
- SUN, G.; VASDEV, S.; MARTIN, G. R.; GADAG, V.; ZHANG, H. Altered Calcium Homeostasis Is Correlated With Abnormalities of Fasting Serum Glucose, Insulin Resistance, and β -Cell Function in the Newfoundland Population. **Diabetes**, vol. 54, November, 2005.
- VAN DER WALT, J.G. et al. Glucose turnover, tolerance and insulin response in wethers, ewes and pregnant ewes in the fed and fasted state. **Onderstepoort Journal Veterinary Research.**, v. 47, p.173-178, 1980.
- WALZ, H. A. et al. β -cell PDE3B regulates Ca^{2+} -stimulated exocytosis of insulin. **Cellular Signalling**, v.19, Issue 7, p.1505-1513, 2007.
- WATT B.R. Hypocalcemia in lactating drought fed ewes supplemented with recommended levels of calcium. **Australian journal of Experimental Agriculture**, v.46, p.6-7, 2006.
- WILLIAMS, C.C. et al. Glucose metabolism and insulin sensitivity in Gulf Coast Native and Suffolk ewes during late gestation and early lactation. **Small Ruminant Research**, v.54, p. 167–171, 2004.
- WONG, K.M. et al. Metabolic aspects of bone resorption in calcium-deficient lactating rats. **Calcif Tissue Int.**, v. 32, p.213–9, 1980.

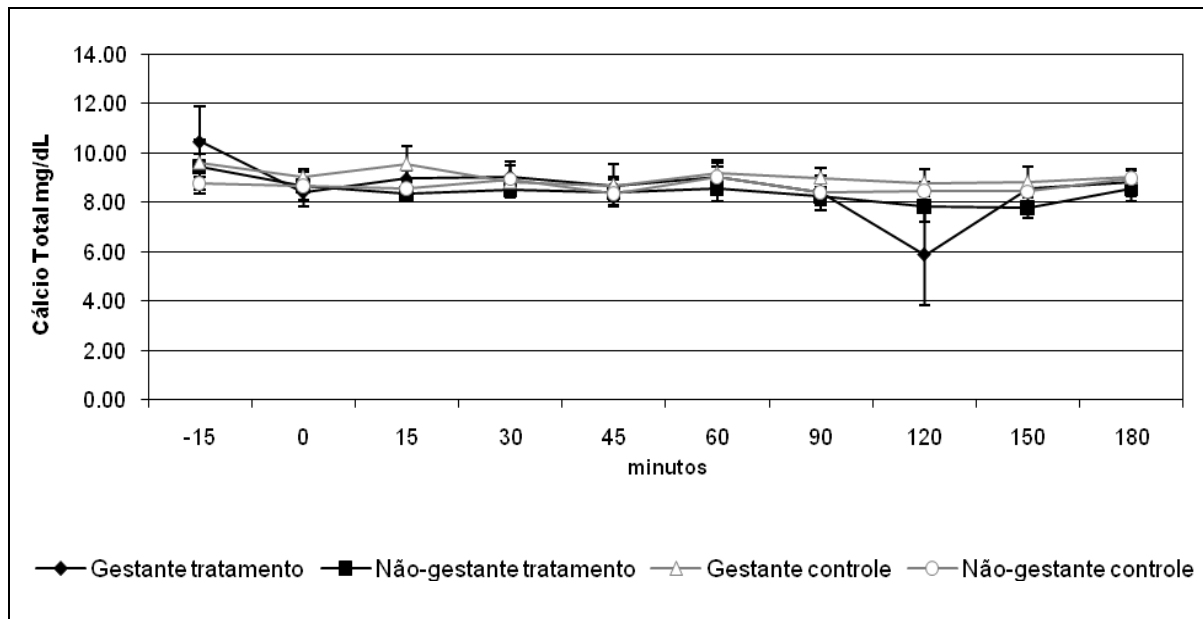


Figura 1.1. Médias das concentrações séricas de cálcio total (mg.dL⁻¹) durante o teste de tolerância de glicose em ovelhas gestantes ou não gestantes, com ou sem administração de cloreto de cálcio.

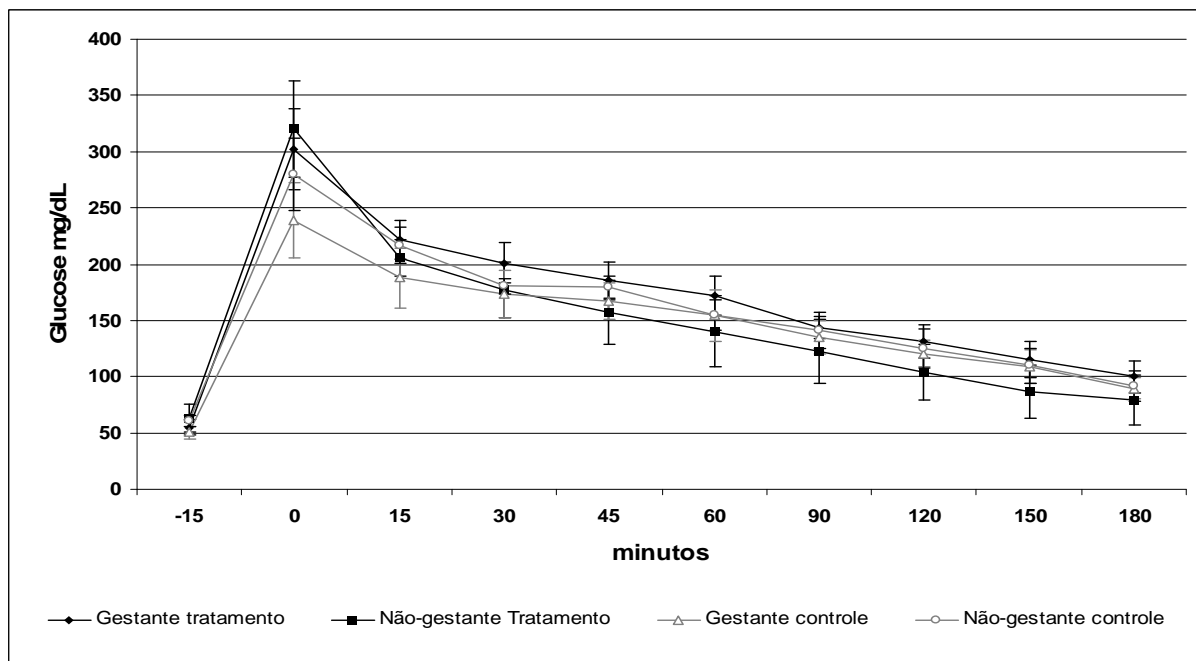


Figura 1.2 – Médias das concentrações plasmáticas de glicose (mg.dL⁻¹) durante o teste de tolerância à glicose em ovelhas gestantes ou não gestantes, com ou sem administração de cloreto de cálcio.

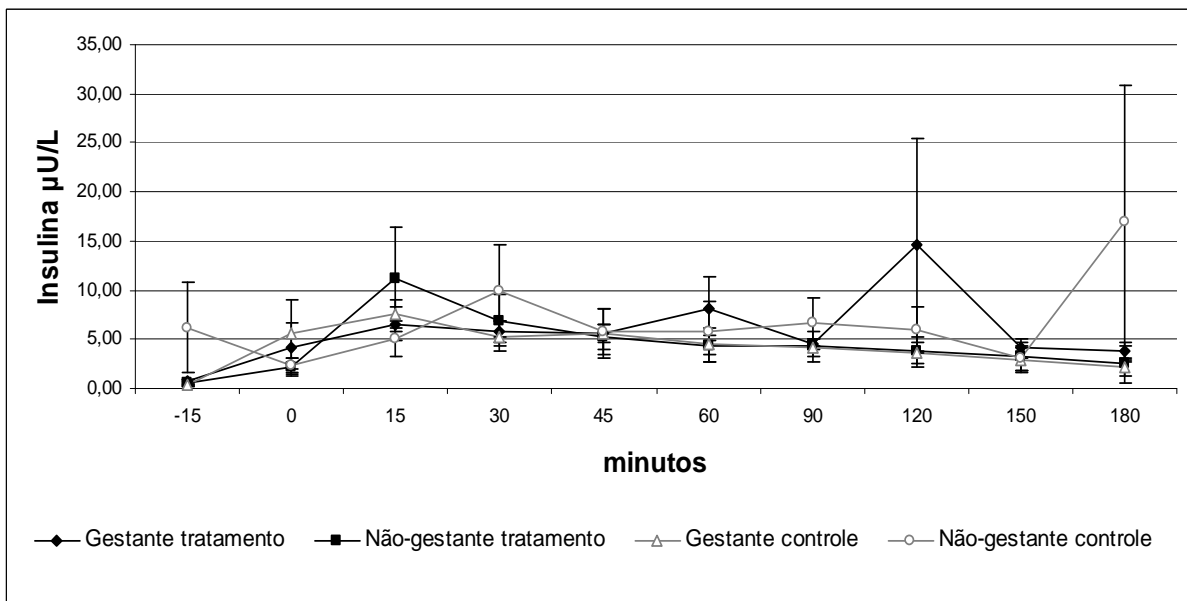


Figura 1.3 – Concentrações séricas de insulina ($\mu\text{U}\cdot\text{dL}^{-1}$) durante o teste de tolerância à glicose em ovelhas gestantes ou não gestantes, com ou sem administração de cloreto de cálcio.

4. ARTIGO II: Influência da hipocalcemia subclínica no balanço energético de vacas leiteiras

SCHMITT, E.; HOFFMANN, D. A. C¹; VENDRAMIN, L.; LIMA, M. E.; FAROFA, T. S.; GOULART, M. A.; LOPES, M. S.; SCHNEIDER, A.; MONTAGNER, P ; DEL PINO, F. A. B.; LOOR, J.J. ; CORRÊA, M. N.

RESUMO

A hipocalcemia subclínica é uma doença metabólica comum em rebanhos leiteiros, a qual tem sido associada com o balanço energético negativo no período de transição de vacas leiteiras. Neste estudo foi investigado esta relação em um sistema de produção de leite à pasto utilizando 13 vacas predominante da raça Jersey (três cruza Jersey x Holandês, uma Girolando e nove Jersey), que foram categorizadas pelos níveis plasmáticos de cálcio, como normais (≥ 8 mg/dL) e hipocalcêmicas (< 8 mg/dL) no pós-parto. Os animais foram monitorados entre os dias -22 pré-parto e o dia 22 pós-parto, através de avaliações dos níveis plasmáticos de magnésio, fósforo, cloretos, glicose, insulina, glucagon, relação glucagon/insulina, ácidos graxo não esterificados (AGNE), enzima aspartato amino transferase (AST), gama glutamil transferase (GGT) e pH urinário. Estes resultados foram analisados através da análise de variância por medidas repetidas utilizando o Software SAS (2003). Cinco, das treze vacas tiveram hipocalcemia subclínica no pós-parto. No pré e pós-parto as vacas normocalcêmicas tiveram níveis plasmáticos de magnésio maiores que as hipocalcêmicas, sendo respectivamente $1,99 \pm 0,03$ e $1,9 \pm 0,05$ mg/dL no pré-parto ($P < 0,05$) e $2,20 \pm 0,05$ e $2,02 \pm 0,05$ mg/dL pós-parto ($P < 0,01$). As vacas com hipocalcemia subclínica apresentaram maiores níveis de glucagon, AGNE, AST e maior relação glucagon/insulina em dias específicos, principalmente na primeira semana de lactação. Estes resultados indicam que a hipocalcemia pode ser um importante fator para o desenvolvimento de balanço energético negativo no periparto de vacas leiteiras.

Palavras chave: Hipocalcemia, Balanço energético, período de transição

ABSTRACT

The subclinical hypocalcemia is a common metabolic disease in the dairy herds that has been associated with negative energetic balance during transition period of dairy cows. In this study was researched the relationship between hypocalcemia and negative energetic balance during the peripartum of dairy cows in grass system. Thirteen dairy cows (breed Jersey and crossbred Jersey X Holstein) were submitted to blood collection during -22 and 22 DIM, every 2 d and were retrospectively divided into a hypocalcemic (HYP, n = 5) and normocalcemic (NOR, n ≥ 8) group (total calcium < 8 mg/dL >) prior to statistical analysis. The groups were compared magnesium, phosphorus, chlorides, glucose, insulin, glucagon, NEFA, aspartate aminotransferase (AST), and gamma-glutamyl-transferase. The HYP cows had lesser levels of magnesium during all period and higher levels (interaction P < 0.05) of AST (6 DIM), NEFA (0, 4 and 10 DIM), glucagon (6, 10, 18, 20 and 22 DIM) and glucagon:insulin (6 and 20 DIM). Other variables were not different between groups. Results indicate that the incidence of subclinical hypocalcemia in cows grazing tropical pastures might be at higher risk of development other disorders in the transition period due to the more severe negative energy balance.

Key Words: hypocalcemia, energy balance, transition period

INTRODUÇÃO

As interações de fatores endócrinos e metabólicos no período de transição de vacas leiteiras têm sido foco de muitas pesquisas, assim como a participação dos

minerais no equilíbrio energético pré e pós-parto (INGVARTSEN, 2006). Os minerais participam de diversas reações ligadas ao metabolismo energético, atuando principalmente como co-fatores enzimáticos, além de participarem diretamente de processos ativos de liberação de determinados hormônios, como é o caso do cálcio que atua nas células β pancreáticas como segundo mensageiro estimulando a secreção de insulina (EL-SAMAD et al., 2002; WALZ et al., 2007).

Doenças como a hipocalcemia são apontadas como fator predisponente ao balanço energético negativo em rebanhos leiteiros, por influenciar o consumo de matéria seca (GOFF, 2006; WILDE 2006). Esta doença que em sua forma clínica pode apresentar incidência de 5 a 10 % por lactação, em rebanhos de alta produção é considerada uma das principais enfermidades do período de transição de vacas leiteiras (HOUE, 2001). A doença se manifesta quando as quantidades diárias de cálcio demandadas pela glândula mamária, sobrepõem a capacidade do PTH e vitamina D em manter a homeostase do cálcio sanguíneo. Por este motivo, vacas velhas e de alta produção compõem o principal grupo de risco (GOFF, 2006).

Dentre os diversos motivos que comprometem o bom funcionamento do sistema regulador do cálcio, o desequilíbrio cátion-aniônico durante o período de transição é apontado como uma das principais causas da hipocalcemia. Vacas que são submetidas a dietas aniônicas para provocar uma leve acidificação do pH sanguíneo visando aumentar a afinidade de receptores de PTH são menos suscetíveis a enfermidade (GOFF,2006). O uso do sal aniônico pré-parto em combinação com adequada suplementação de cálcio e magnésio no pós-parto aumenta o consumo de matéria seca e pode reduzir o balanço energético negativo no início da lactação (WILDE, 2006). Existem entretanto, algumas dificuldades quanto ao consumo do sal aniônico devido sua baixa palatabilidade, o que converge para a necessidade de um monitoramento da sua ingestão. Uma mediada prática e barata é o monitoramento do pH urinário, que está diretamente relacionado com pH sanguíneo (JARDON, 1995; SEIFI et al., 2004).

A participação do cálcio no metabolismo dos carboidratos foi demonstrada em ovelhas hipocalcêmicas, que tiveram maior estresse metabólico e prejuízo na manutenção dos níveis de glicose no plasma sanguíneo. A condição de hipocalcemia e hipercetonemia associadas somatizam os efeitos prejudiciais na homeostase de glicose, o que torna a hipocalcemia um fator de risco para desenvolvimento da cetose (SCHLUMBOHM & HARMEYER, 2003).

No pós-parto de vacas leiteiras é comum a hipoinsulinemia causada pela baixa de glicose em virtude da baixa ingestão de matéria seca. Neste período tanto glicose como cálcio são desviados para produção de leite, o que explica parcialmente a hipoinsulinemia pós-parto. A hipoglicemia é constantemente abordada como causa primária desta hipoinsulinemia, entretanto a abordagem em relação ao cálcio não tem sido explorada em vacas leiteiras.

A hipótese deste estudo é que vacas de leite com hipocalcemia subclínica tem maior predisposição ao balanço energético negativo durante o período de transição, pela participação do cálcio no metabolismo dos carboidratos. Desta forma, o objetivo deste estudo foi investigar as alterações no perfil metabólico de vacas com hipocalcemia subclínica durante o periparto.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado em uma propriedade com produção de leite a pasto, localizada no interior do Município de Capão do Leão (31°48'48,13''S e 52°31'31',52'', ©Google Earth), entre os meses de janeiro a abril de 2008. O rebanho era constituído predominantemente por animais da raça Jersey, sendo que para o experimento foram utilizadas três vacas cruzada Jersey x Holandês, uma Girolando e nove Jersey. Durante o período do experimento as vacas foram mantidas exclusivamente a pasto e eram admitidas no experimento a partir de 28 dias pré-parto, quando era iniciada a categorização quanto à condição corporal. O manejo alimentar durante o pré-parto consistia em pastejo contínuo em *Brachiaria decumbens* em um potreiro de 8 ha, com lotação em de 2,4 UA por hectare e livre acesso ao sal aniônico (BCA pré-parto Tortuga - Níveis de garantia por Kg do produto: Enxofre 160,00 g, Calcio 66,00 g, Cloro 89,00 g, Etoxiquin 166,00 mg, Magnésio 45,00 g, Vitamina A 50.000,00 UI/kg , Vitamina E 4.000,00 UI/kg, Vitamina D3 10.000,00 UI/kg, Cobre, 400,00 mg, Cromo 16,00 mg, Nitrogenio 5,00 %). No período pós-parto as vacas eram mantidas em regime de pastejo rotativo em *Panicum maximum*. A cada 21 dias foram realizados cortes na área de *B. decumbens* com 17 repetições de uma área de 50cm², para avaliação cromatológica da porcentagem de matéria seca , fibra bruta, proteína bruta, extrato etéreo e cinzas (GARDNER, 1986).

Tabela 1.1. Porcentagem de fibra bruta, proteína bruta, extrato etéreo e cinzas por kilo de matéria seca das pastagens de *B. decumbens* e *P. maximun* duante o período experimental.

	<i>B. decumbens</i>			<i>P. maximun</i>				
	Jan	Fev	Mar	Fev	Mar	Abr		
	% por kg de matéria seca							
Proteína bruta	6,02	9,18	6,87	2,9	3,28	6,3	6,14	5,95
Fibra bruta	52,98	50,7	56,53	38,66	36,79	34,3	41,46	48,23
Extrato etéreo	1,48	1,85	1,32	0,65	1,4	0,94	0,83	1,09
Cinzas	9,25	9,77	8,44	7,3	8,39	12,13	10,75	9,95

Entre o dia -22 pré-parto e o dia 22 pós-parto foram coletadas amostras de sangue sempre no mesmo horário pela manhã com intervalo de dois dias e durante pós-parto sempre antes da ordenha. Durante este período os níveis de cálcio no sangue foram monitorados, categorizando as vacas como normacalcêmicas, aquelas que sempre mantiveram os níveis de cálcio sanguíneo total acima ou igual à 8 mg/dL (GOFF, 2008) e hipocalcêmicas, as que em alguma das coletas tiveram níveis abaixo deste valor. Além do cálcio plasmático, foram incluídas análises de magnésio, fósforo, cloretos, glicose, insulina, glucagon, ácidos graxos não esterificados (AGNE) e as enzima aspartato amino transferase (AST) e gama glutamil transferase (GGT). Juntamente com as amostras de sangue foram coletadas amostras de 50 ml de urina, pelo método de massageamento na região perineal e aferido o pH urinário utilizando pHmetro de bolso (pH de 0.0 a 14.0, com compensação automática de temperatura, PHTEK - modelo pH100, PHTEK importadora, Brasil).

As amostras de sangue foram obtidas por punção da veia coccígea, divididas em três tubos de ensaio de 5 ml. Um tubo contendo anti-coagulante (EDTA 10%) na proporção de 12 µl/ml de sangue, o segundo com EDTA 10% e anti-glicolítico (KF 12%) e o terceiro sem nenhuma solução. Imediatamente após a coleta de sangue estes foram submetidos à centrifugação para obtenção de amostras de plasma, plasma com anti-glicolítico e soro, as quais foram divididas em três tubos de 1,5 ml previamente identificados e congelados a - 18°C ou resfriado a + 4°C. Os níveis plasmáticos de cálcio, magnésio, fósforo, cloretos, glicose, AST e GGT foram analisados por colorimetria utilizando Kits enzimáticos (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil) e para leitura o espectrofotômetro de luz visível (FEMTO 435, FEMTO

Indústria e Comércio de Instrumentos, São Paulo, Brasil). As concentrações plasmáticas de Insulina e Glucagon foram feitas por radioimunoensaio (KIP254, BioSource Europe, Nivelles, Belgium) com limite mínimo de detecção de 0,23 μ UI/ml e metodologia conforme descrita por Miles et al. (1974). O coeficiente de variação foi de 5,22% e 2,44% para baixa e alta concentração de insulina respectivamente. Para o glucagon o limite mínimo de detecção foi de 5,62 pg/m e o coeficiente de variação foi de 2,85% e 3,16% para baixa e alta concentração respectivamente. Para determinação dos níveis plasmáticos de AGNE utilizou-se o Kit HR Series NEFA-HR (Wako Chemicals, USA) e a metodologia conforme a descrita pelo fabricante.

Os resultados foram analisados através da análise de variância por medidas repetidas utilizando o Software SAS 9.1.3 (2003). Foi considerado no modelo a variação individual dentro dos grupos e os dias como repetição. O modelo utilizou como variáveis independentes dia, grupo, categoria nível de produção e interação grupo e dia. A categoria nível de produção leiteira foi estabelecida arbitrariamente, com ponto de corte baseado na mediana de produção leiteira após o parto, sendo considerada produção A (PRODA) e produção B (PRODB), quando as vacas estavam acima ou abaixo da mediana respectivamente.

RESULTADOS

Pré-parto:

Os níveis séricos de glucagon foram maiores para as vacas hipocalcêmicas dois dias antes do parto. As médias dos níveis séricos de magnésio foram diferentes, quando comparadas entre vacas normo e hipocalcêmicas, assim como nas vacas com diferentes níveis de produção leiteira. Entre as vacas normo e hipocalcêmicas os níveis médios de magnésio foram $1,9 \pm 0,05$ e $1,99 \pm 0,03$ mg/dL respectivamente ($P < 0,05$) e, entre vacas de produção média diária abaixo (PRODA) e acima da mediana (PRODB), os níveis foram respectivamente $1,9 \pm 0,04$ e $2,01 \pm 0,04$ mg/dL ($P < 0,05$). O pH urinário também diferiu entre os grupos de diferentes níveis produtivos, sendo $7,94 \pm 0,05$ e $7,73 \pm 0,06$ respectivamente, para vacas PRODA e PRODB. Nas demais variáveis não foram observadas diferenças entre grupos neste período.

Pós-parto:

A mediana da produção leiteira para todos animais foi de 14 litros/dia, de forma que sete vacas tiveram média produtiva acima deste valor e seis abaixo. Das cinco vacas categorizadas como hipocalcêmicas quatro tinham uma média de produção leiteira acima de 14 litros/dia e uma abaixo, já nas vacas normocalcêmicas três tinham produção acima 14 litros/dia e cinco abaixo.

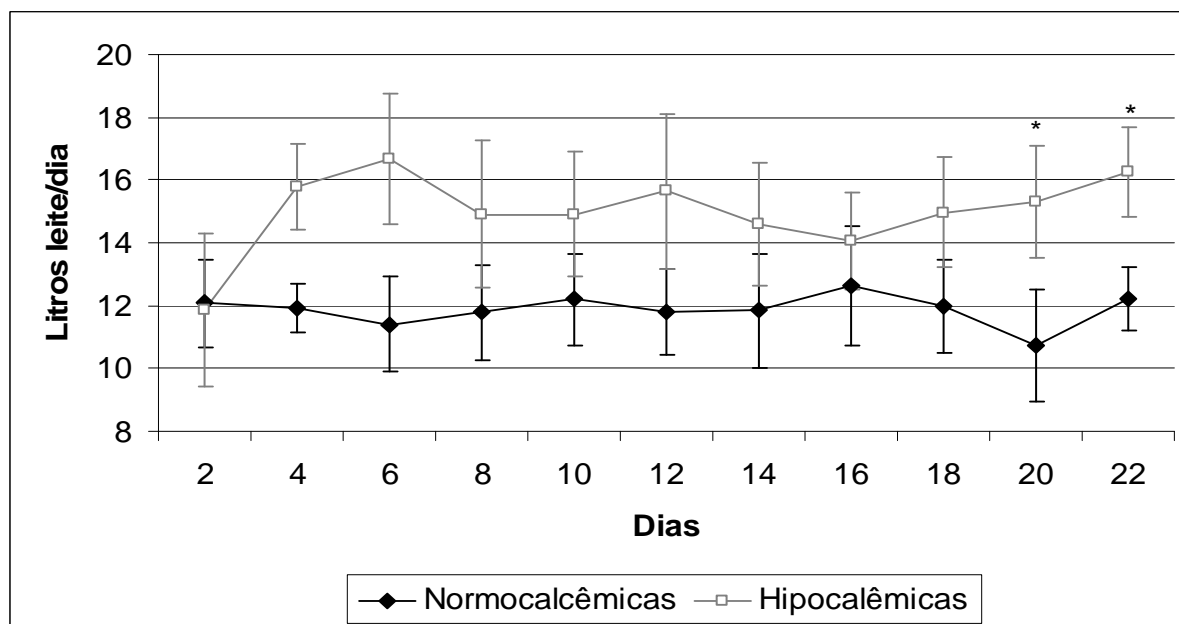


Figura 2.1 - Médias da produção leiteira das vacas normocalcêmicas e hipocalcêmicas durante as primeiras semanas de lactação. * ($P < 0,05$)

As vacas hipocalcêmicas tinham maior média de produção leiteira em dias específicos conforme demonstrado na Figura 2.1 ($P < 0,01$). Entretanto a produção média durante todo período não foi diferente ($P > 0,05$) embora numericamente superior, com $14,4 \pm 0,69$ L/dia para hipocalcêmicas e $10,72 \pm 0,54$ L/dia para vacas normocalcêmicas.

Os níveis médios de magnésio foram menores para vacas hipocalcêmicas correspondendo a $2,02 \pm 0,05$ contra $2,20 \pm 0,05$ mg/dL das vacas normocalcêmicas ($P < 0,05$). Neste período os níveis de cálcio foram diferentes em dias específicos (Figura 2.2), bem como a média final durante o período entre os grupos que tiveram média de $8,97 \pm 0,11$ mg/dL nas hipocalcêmicas e $9,20 \pm 0,08$ mg/dL nas normais ($P < 0,01$).

A queda dos níveis de cálcio para as vacas que entraram em hipocalcemia subclínica (< 8 mg/dL) ocorreu em diferentes dias pós-parto, com uma vaca no dia do

parto, duas no segundo e duas no quarto dias pós-parto. Estas retornaram a níveis superiores à 8mg/dL de cálcio, já na coleta seguinte.

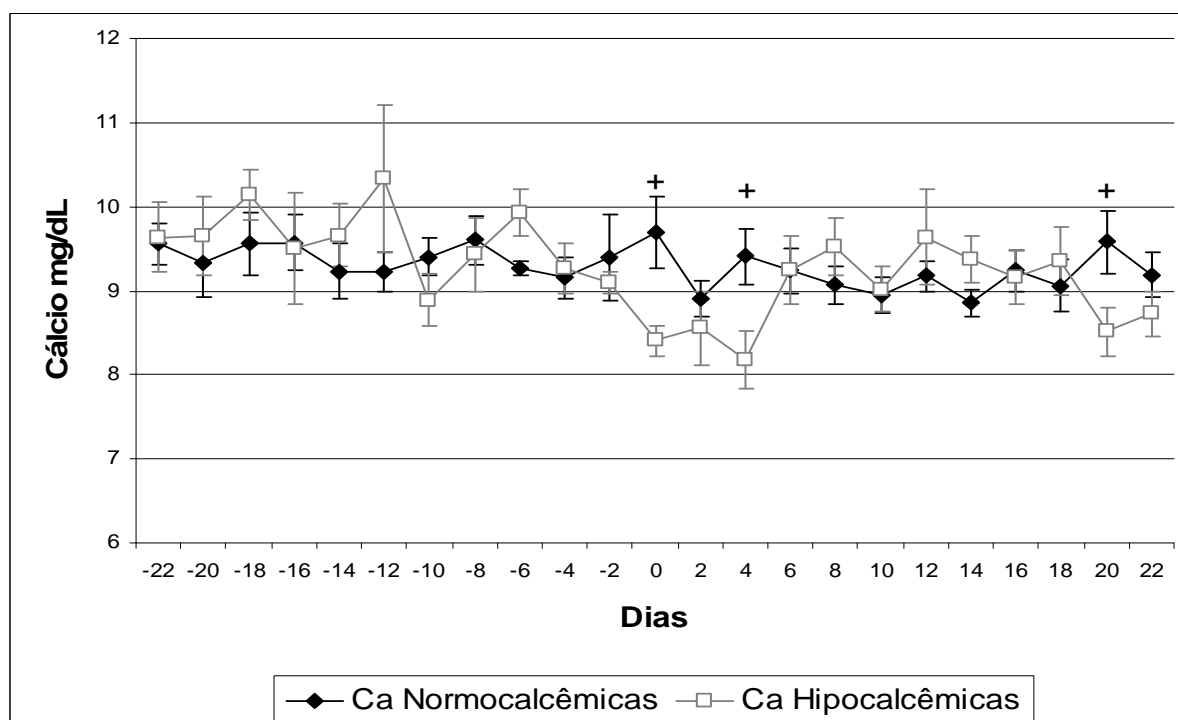


Figura 2.2 - Médias dos níveis séricos de cálcio de vacas normocalcêmicas e hipocalcêmicas durante todo parto. + Corresponde a diferença estatística ($P < 0,05$) considerando para análise somente os dados do pós-parto.

Também foi observado efeito da interação grupo e dia na variável AST que foi maior nos dias 6 e 8 pós-parto para as vacas hipocalcêmicas ($P < 0,05$). Já os efeitos isolados do grupo e nível de produção não influenciaram os níveis destas variáveis durante o pós-parto.

A relação entre glucagon/insulina foi diferente entre os grupos nos dias 6 e 20 pós-parto (Figura 2.3), sendo maior para as vacas hipocalcêmicas ($P < 0,05$).

Quando as vacas foram agrupadas considerando a categoria nível de produção, as vacas PRODA tiveram níveis médios de cálcio maiores do que as PRODB, sendo respectivamente $9,25 \pm 0,09$ e $8,93 \pm 0,09$ mg/dL ($P < 0,05$).

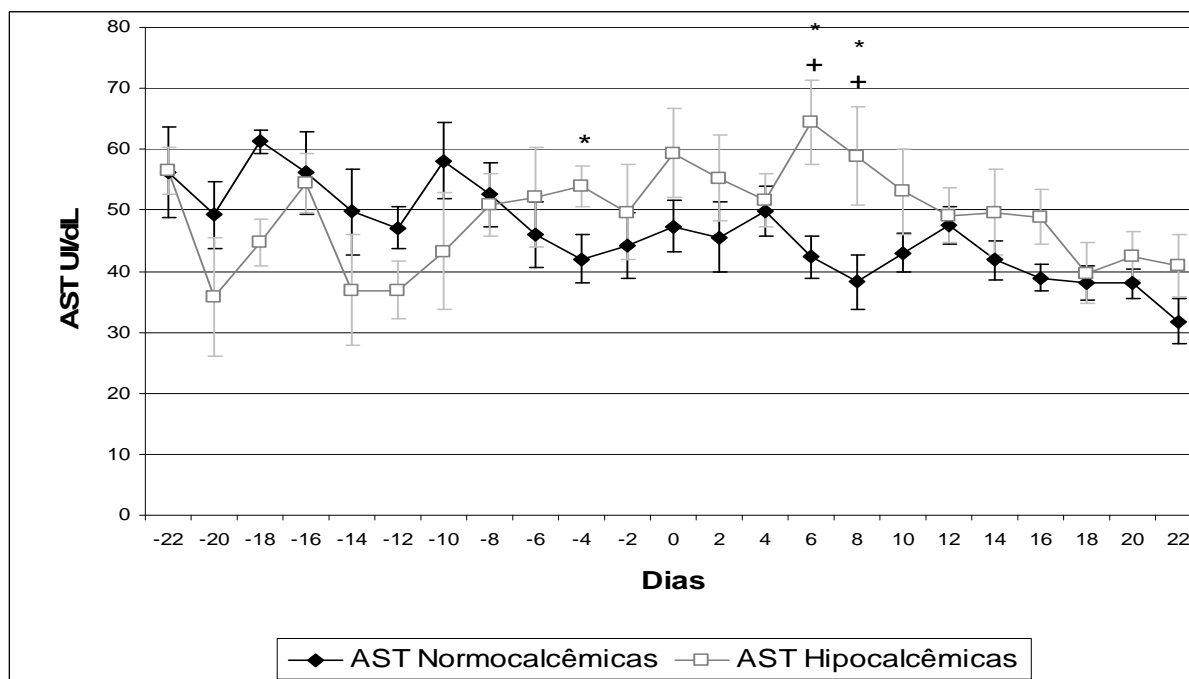


Figura 2.3 - Níveis médios de AST de vacas normo e hipocalcêmicas durante o periparto. * ($P < 0,05$) na análise de todo período e, + ($P < 0,05$) na análise somente do pós-parto.

O nível de produção também influenciou os níveis médios de insulina ($P < 0,05$), que foram de $10,16 \pm 0,36$ UI/dL e $14,00 \pm 0,67$ UI/dL para vacas com PRODA e PRODB respectivamente. Apesar disso, os níveis de insulina não foram diferentes na interação nível de produção e dia. Da mesma forma, os níveis médios de AGNE não foram diferentes ao comparar a interação nível de produção e dia, mas os níveis médios durante todo período foram diferentes, sendo iguais a $0,24 \pm 0,03$ mmol/L para vacas de PRODA e $0,49 \pm 0,05$ mmol/L para as PRODB. As demais variáveis não diferiram entre os grupos neste período.

Periparto:

A perda de condição corporal durante todo periparto não foi diferente entre as vacas normo e hipocalcêmicas (Figura 2.5).

Houve efeito ($P < 0,05$) da interação grupo e dia para os níveis de AST (Figura 3), glucagon (Figura 2.6), relação glucagon/insulina (Figura 2.4) e AGNE (Figura 2.7), sendo que entre estas variáveis a média final não foi diferente entre os grupos. Para as demais variáveis não foi observada diferença entre vacas normo e hipocalcêmicas.

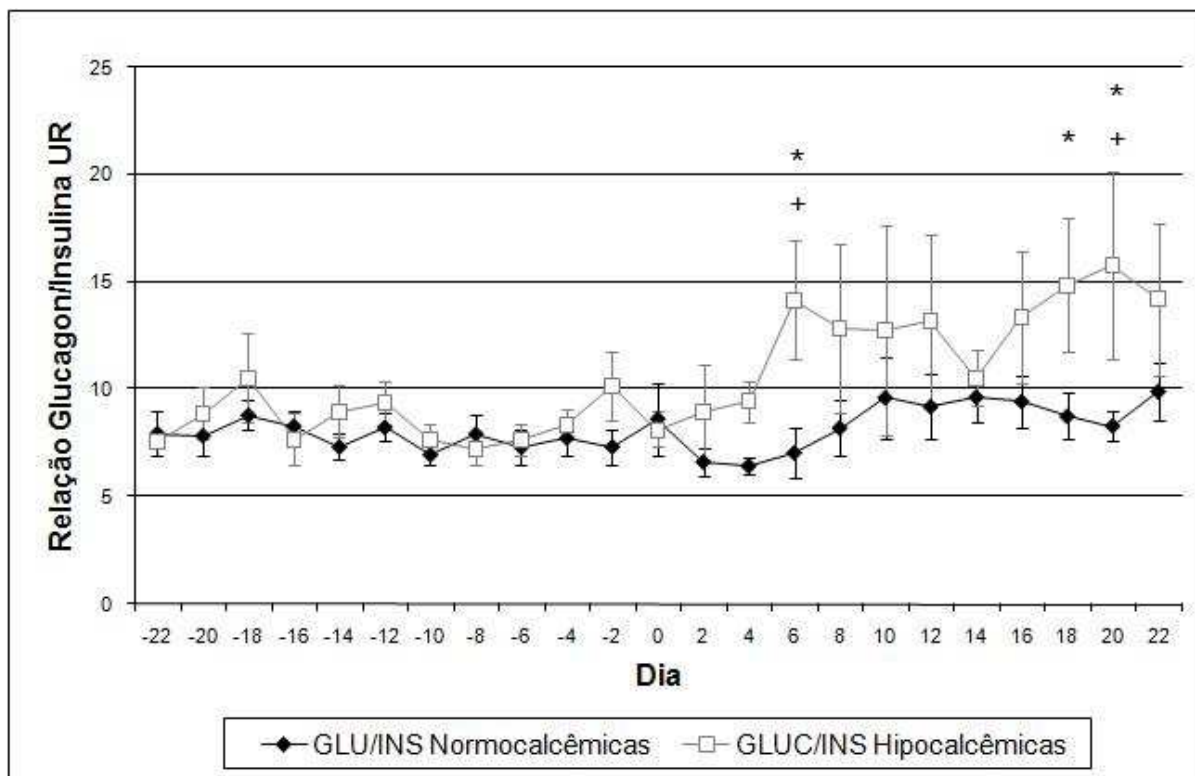


Figura 2.4 - Dinâmica da relação glucagon/insulina nas vacas normo e hipocalcêmicas durante o periparto. * $P < 0,05$ na análise de todo período e + $P < 0,05$ na análise somente do pós-parto

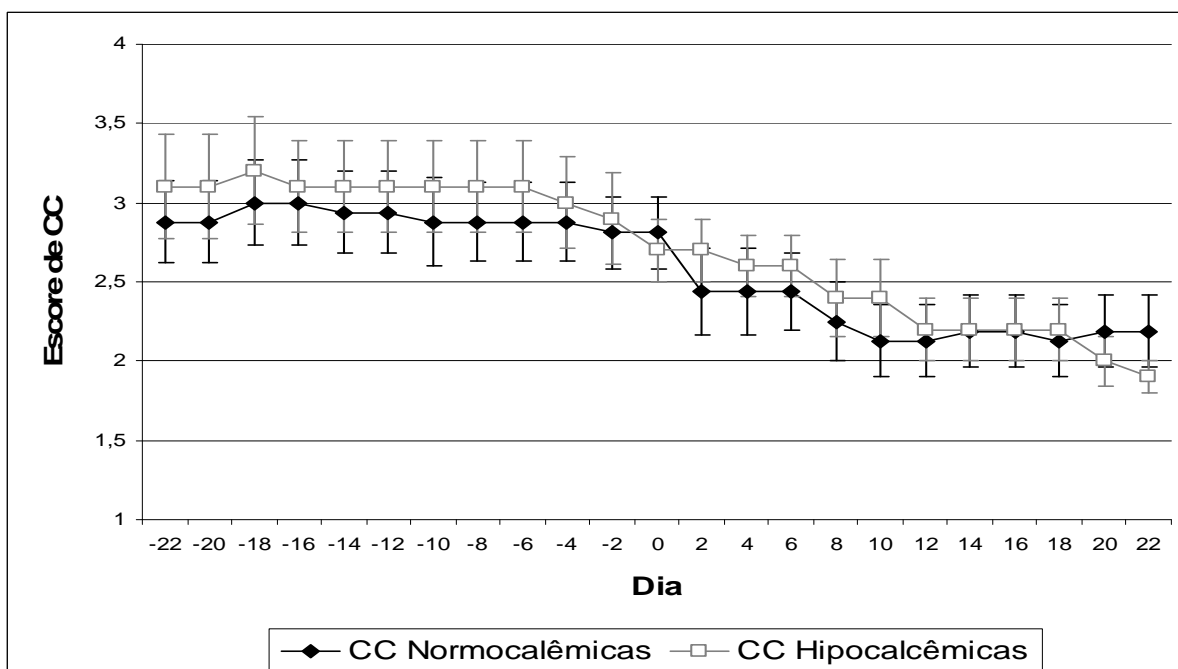


Figura 2.5 – Escore de condição corporal de vacas normo e hipocalcêmicas durante o periparto.

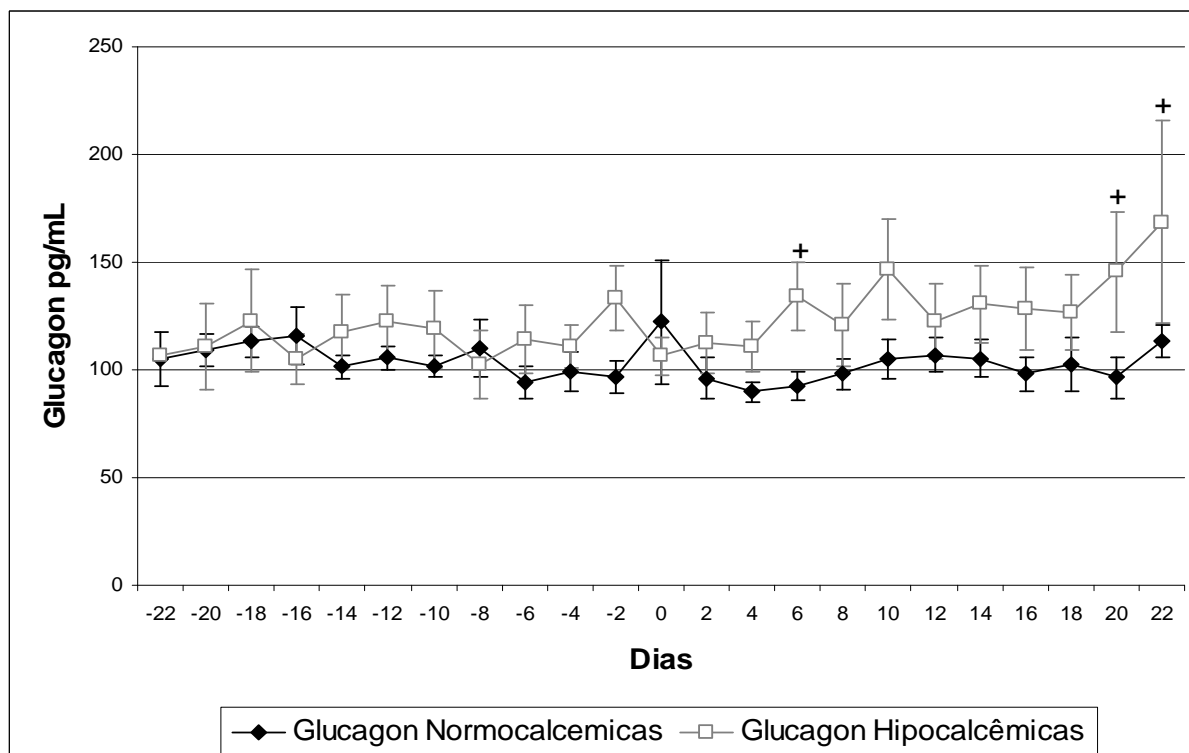


Figura 2.6 - Níveis médios de glucagon de vacas normo e hipocalcêmicas durante o periparto. *P<0,05 na análise de todo período.

A média dos níveis séricos de magnésio foram diferentes durante todo período para vacas normo e hipocalcêmicas correspondendo respectivamente a $2,06 \pm 0,03$ e $1,95 \pm 0,04$ mg/dL. Ao serem comparados os níveis de magnésio de acordo com a PRODA ou PRODB, estas foram diferentes entre si, sendo respectivamente $2,05 \pm 0,03$ e $1,96 \pm 0,04$ mg/dL. O mesmo foi observado com os níveis de Ca total correspondendo a $9,29 \pm 0,07$ para as de PRODA e $9,04 \pm 0,08$ mg/dL para as vacas de PRODB.

DISCUSSÃO

O número de vacas que tiveram níveis de cálcio sanguíneo abaixo de 8 mg/dL está de acordo com as taxas entre 34% e 50% reportadas por outros autores, mesmo não se tratando de um rebanho de alta produção, cuja mediana foi de 14 litros/dia durante o experimento (HOUE et al., 2001, GOFF et al., 2005). O padrão racial, em sua maioria Jersey e, a alimentação exclusivamente a pasto, conferiam aos animais do experimento, um alto grau de risco de desenvolvimento da doença.

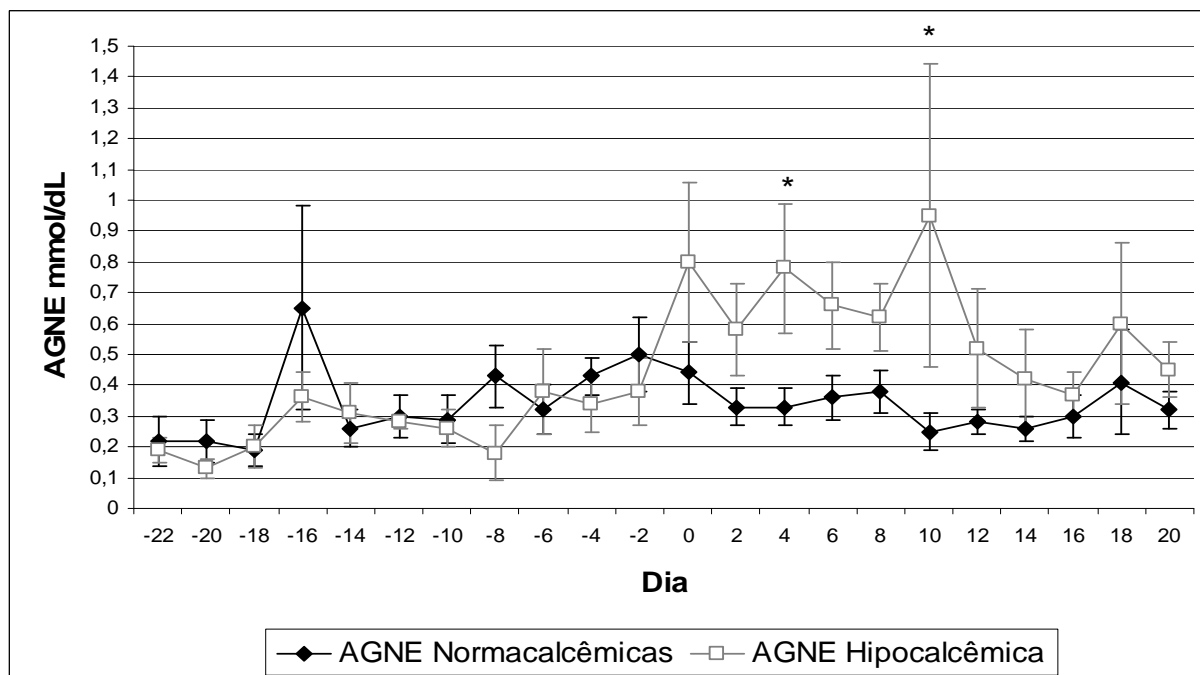


Figura 2.7 - Níveis médios de AGNE de vacas normo e hipocalcêmicas durante o periparto * $P < 0,05$ na análise de todo período.

A soma destes fatores, pode não ter provocado uma maior prevalência e manifestação de quadros clínicos, em virtude da baixa qualidade da pastagem, com menor disponibilidade de fósforo e potássio. Estes minerais encontram-se em excesso em pastagens luxuriantes, que quando compõem a base da dieta no pré-parto, são responsáveis pela etiologia da hipocalcemia, por inibirem a enzima 1α -hidroxilase presente no rim, que é responsável pela síntese de 1,25 dihidroxi vitamina D em resposta à um estímulo gerado pelo PTH em seus receptores no epitélio renal. Além disto, embora a forma de fornecimento do sal aniônico não tenha sido a mais adequada, houve um pequeno consumo, não observado de forma significativa no pH urinário, mas que pode ter auxiliado na ativação dos mecanismos homeostáticos do cálcio em grande parte dos animais. O pequeno consumo de sal aniônico somado a baixa média produtiva dos animais, pode ter contribuído também, para o rápido retorno de cálcio a níveis basais, nas vacas que desenvolveram hipocalcemia subclínica, já que estas, não mantiveram níveis de cálcio abaixo de 8 mg/dL por mais de uma coleta consecutiva. O pH urinário durante o pré-parto de 7,9 e 7,8 para vacas normo e hipocalcêmicas respectivamente, comprova o baixo consumo de sal aniônico o que também explica a ausência de variação nos níveis de cloretos para ambos os grupos.

As vacas hipocalcêmicas tiveram níveis de magnésio significativamente menores ($P < 0,05$) independentemente do período pré ou pós-parto, que junto com o nível de produção leiteira, podem ter sido os principais motivos para queda nos níveis de cálcio no pós-parto. O íon magnésio garante a atividade completa do receptor de PTH, por atuar como co-fator em um sítio de ligação presente na adenil ciclase e na fosfolipase C (CORBELLINI, 1998; GOFF, 2006; HOUE et al., 2001), de forma que vacas com níveis plasmáticos abaixo de 1,6 mg/dL apresentam maior suscetibilidade a hipocalcemia (VAN DE BRAAK et al., 1987; GOFF, 2004).

Neste trabalho a hipocalcemia subclínica, mesmo durante poucos dias, demonstrou ter uma importante participação no balanço energético, já que as vacas hipocalcêmicas demonstraram maiores níveis de glucagon, relação glucagon/insulina e AGNE. As diferenças destes metabólitos entre as vacas normais e hipocalcêmicas foram observadas principalmente nos dias 6 e 8 pós-parto. Já os níveis de glicose não foram diferentes entre vacas normo e hipocalcêmicas ficando dentro dos padrões considerados fisiológicos, embora tenham sido menores no período pós-parto principalmente na primeira semana de lactação. Estes resultados reforçam hipótese de que a hipocalcemia é um agente desencadeador de rotas catabólicas pelas baixas concentrações de cálcio extra e intracelular, prejudicando o aumento dos mediadores de glicose e a taxa de oxidação da glicose no músculo e tecido adiposo (DRAZNIN et al., 1987; YOUN et al., 1991).

A secreção da insulina também é dependente principalmente de glicose e cálcio, entretanto as vacas normo e hipocalcêmicas, não diferiram quanto aos níveis de insulina. Porém a relação glucagon:insulina foi significativamente maior para vacas hipocalcêmicas, o que representa maior importância que os níveis de cada hormônio isolado, pois é esta relação determina a atividade da enzima lipase hormônio sensível (JENNY et al., 1974; DEWHURST et al., 2000, XIA et al., 2007).

O perfil hepático determinado pelas enzimas AST e GGT demonstrou diferenças entre as vacas normo e hipocalcêmicas apenas para os níveis plasmáticos de AST nos dias -10 pré-parto, 6 e 8 pós-parto. A elevação dos níveis desta enzima nos dias 6 e 8 pós-parto nas vacas hipocalcêmicas precedem ou coincidem com os dias de elevação dos níveis de AGNE e Glucagon. Os valores de referência são controversos entre autores, segundo Kaneko et al. (1997) para bovinos os níveis fisiológicos estariam entre 78-132 U/L. Já Stojević et al. (2005) em

uma pesquisa com 120 vacas holandesas saudáveis, estabeleceu $32,90 \pm 7,0$ U/L para vacas durante o período seco e $57,79 \pm 16,49$ U/L, para vacas na primeira semana de lactação. De qualquer forma, os níveis médios para as vacas hipocalcêmicas não ultrapassaram os máximos considerados fisiológicos, mas convergem para a hipótese de maior comprometimento da função hepática nestas vacas em virtude de uma maior mobilização no tecido adiposo e acúmulo de triglicerídeos no fígado.

CONCLUSÃO

As vacas com hipocalcemia subclínica apresentaram maiores níveis de glucagon, AGNE, AST e maior relação glucagon/insulina mesmo com níveis normais de glicose. Estes resultados salientam a necessidade de novas investigações sobre a participação do cálcio no metabolismo dos carboidratos, para manutenção do balanço energético positivo em vacas leiteiras durante o parto.

REFERÊNCIAS

CORBELLINI CN. Etiopatogenia e controle da hipocalcemia e hipomagnesemia em vacas leiteiras. In: Gonzalez FHD, Ospina HP, Barcellos JOJ (Editores). Anais do seminário internacional sobre deficiências minerais em ruminantes. Editora da UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. p. 28, 1998.

DEWHURST, R. J., J. M. MOORBY, M. S. DHANOA, R. T. EVANS, AND W. J. FISHER. Effects of altering energy and protein supply to dairy cows during the dry period. Intake, body condition and milk production. J. Dairy Sci. v.. 83, p.1782-1794, 2000.

EL-SAMAD, H. and GOFF, J. P.; KHAMMASH, M. Calcium Homeostasis and Parturient Hypocalcemia: An Integral Feedback Perspective J. theor. Biol., v. 29, p. 214-217, 2002.

GARDNER, A. L. Medição de atributos de pastagem em sistema de pastejo. In: Técnicas de pesquisa em patagem e aplicabilidade de resultados em sistemas de produção. Brasília: IICA/EMBRAPA-GNPGL, 1986. p.113-123.

GOFF, J. P. Macromineral disorders of the transition cow. Vet Clin Food Anim, v. 20, p. 471- 494, 2004.

GOFF, J .P. et al. Hypocalcemia: Biological Effects and strategies for prevention. Nutrition Conference sponsored by Department of Animal Science, UT, 2005.

GOFF, J. P. Macromineral physiology and application to the feeding of the dairy cow for prevention of milk fever and other periparturient mineral disorders. Animal Feed Science and Technology, v.126, p 237-257, 2006.

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

HOUE, H. et al. Milk fever and subclinical hypocalcemia. An evaluation of parameters on risk, diagnosis, risk factors and biological effects as input for a decision support system for disease control. *Acta Vet. Scand.* v.42, p.1-29, 2001.

KANEKO, J. J., et al. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 5th ed., Academic Press. San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto: 1997. 932p.

INGVARTSEN, K.L. Feeding- and management-related diseases in the transition cow: Physiological adaptations around calving and strategies to reduce feeding-related diseases. *Animal Feed Science and Technology.* v. 126, p. 175-213. 2006.

JARDON P. Using urine pH to monitor anionic salt programs. *Compend Contin Educ Pract. Vet.* v.17, p.860, 1995.

JENNY, B. F. et al. Effects of high grain feeding and stage of lactation on serum insulin, glucose, and milk fat percentage in lactating cows. *J. Nutr.* v.104, p.379–385, 1974.

MILES, L. E. et al. Measurement of serum ferritin by a 2-site immunoradiometric assay. *Anal. Biochem.* v.61, p.209-224, 1974.

SAS Institute Inc., *SAS 9.1.3 Help and Documentation*, Cary, NC: SAS Institute Inc., 2000-2004.

SCHLUMBOHM, C. and HARMEYER, J. Hypocalcemia reduces endogenous glucose production in hyperketonemic sheep. *J. Dairy Sci.*, v. 86, p.1953–1962, 2003.

SEIFI, H. A. et al. Use of pre-partum urine pH to predict the risk of milk fever in dairy cows *The Veterinary Journal* v.167, p.281–285, 2004.

STOJEVIĆ, Z. et al. Activities of AST, ALT and GGT in clinically healthy dairy cows during lactation and in the dry period Veterinarski Arhiv, v.75, n.1, p.67-73, 2005.

WALZ, H. A. et al. β -cell PDE3B Regulates Ca^{+2} -Stimulated Exocytosis of Insulin. Cellular Signalling, v. 19, Issue 7, p. 1505-1513, 2007.

WILDE, D. Influence of macro and micro minerals in the peri-parturient period on fertility in dairy cattle. Animal Reproduction Science v.96, p 240–249, 2006.

YOUN, J. H.; et al. Calcium stimulates glucose transport in skeletal muscle by a pathway independent of contraction. American Journal of Physiology. v. 260, p 555-561, 1991.

VAN DE BRAAK A. E. et al. Influence of a deficient supply of magnesium during the dry period on the rate of calcium mobilization by dairy cows at parturition. Res Vet Sci v.42, n.1, p.101–8, 1987.

XIA, C., et al.. Effect of Hypoglycemia on Performances, Metabolites, and Hormones in Periparturient Dairy Cows Agricultural Sciences in China,v.6, p.4, p.505-512, 2007.

5. ARTIGO III: O balanço energético negativo crônico não é agravado pela hipocalcemia subclínica induzida em ovelhas lanadas lactantes

SCHMITT, E. ; HOFFMANN, D. A. C.; LIMA, M. E.; FAROFA, T. S.; MONTAGNER, P ; SILVEIRA, I. D. B.; DEL PINO, F. A. B.; LOOR, J. J.; CORRÊA, M. N.

RESUMO

Tem sido demonstrado que a hipocalcemia quando somada a hipercetonemia pode diminuir a concentração de glicose no plasma, comprometendo o balanço energético em ovelhas pós-parto. Neste estudo, foi investigado o efeito da hipocalcemia subclínica nos níveis sanguíneos de alguns metabólitos durante o pós-parto de ovelhas lanadas (Ideal x Corriedale) que estavam em balanço energético negativo crônico. Amostras de sangue foram coletadas diariamente, durante cinco dias pós-parto de nove ovelhas controle e sete que foram submetidas a doze horas de indução de hipocalcemia subclínica, pela infusão endovenosa de Na₂EDTA, seis horas pós-parto. Os níveis médios de fósforo e uréia foram maiores no grupo hipocalcemia ao final dos cinco dias ($P < 0,05$), enquanto que a média de GGT foi maior no grupo controle ($P < 0,05$). Os níveis de glicose, ácidos graxos não esterificados e beta-hidroxibutirato não diferiram entre os grupos ($P > 0,05$). Estes resultados demonstram que a hipocalcemia subclínica induzida pelo Na₂EDTA foi responsável por alterar os níveis de alguns metabólitos em ovelhas pós-parto que estavam em balanço energético crônico, porém não foi responsável por agravar o déficit energético.

Palavras chave: Hipocalcemia, balanço energético negativo, pós-parto, ovelhas

ABSTRACT

The hypocalcemia has been shown that together with hyperketonemia can decrease plasma glucose concentration, compromising the energetic status in ewes postpartum. In this study was researched the effect of subclinical hypocalcemia in blood levels of some metabolites during postpartum of ewes cross breed (Ideal x Corriedale) that were in chronic negative energy balance. Blood samples were collected daily during five day postpartum of nine ewes control and seven that passed for hypocalcemia induction using endovenosus Na_2EDTA , six hours postpartum during twelve hours. The blood levels average of five days to urea and phosphorus was high in the hypocalcemia group ($P < 0,05$), whereas the GGT levels was high to control group ($P < 0,05$). The levels of glucose, non-esterificaded fatty acids, beta-hydroxybutirate and albumin were not different between grupos ($P > 0,05$). The results this study show that subclinics hypocalcemia induction with Na_2EDTA modified some metabolites, but was not able to aggravate the negative energy balance of ewes in postpartum.

Key Words: Hypocalcemia, negative energy balance, post partum, ewes

INTRODUÇÃO

No Rio Grande do Sul e em países, como Uruguai e Argentina, o final da gestação e início da lactação de ovinos coincidem com um período crítico, de baixa disponibilidade de forragem de campo nativo (RIBEIRO et al., 2004; CARVALHO, 2006). Este fator somado a baixas temperaturas e elevada carga animal por hectare são causas comuns de morte por subnutrição, ou enfermidades secundárias ao

baixo aporte de nutrientes em um período de alta demanda. Neste período, as exigências energéticas para o crescimento final do fetal e o começo da lactação, acarretam em intensa mobilização de tecido adiposo da gestante com grande liberação de ácidos graxos não esterificados (AGNE) (VERNON, 1998). No início de lactação isto garante a produção de gordura no leite e auxilia no fornecimento de energia em diferentes tecidos, a fim de priorizar o fornecimento de glicose e aminoácidos para glândula mamária (CHILLIARD, 1999). Caso a mobilização de AGNE seja muito intensa, há um incremento na produção de corpos cetônicos no fígado, que induz a um quadro caracterizado pela cetose ou toxemia da prenhez (LOOR et al., 2007). Estas enfermidades juntamente com a hipocalcemia se destacam pelo aumento das perdas produtivas e mortalidade de ovinos durante o parto (MAVROGIANNI et al., 2008). Quando ocorrem em conjunto, o excesso de corpos cetônicos e os baixos níveis de cálcio podem causar um adicional efeito depressor na produção endógena de glicose, agravando o balanço energético negativo (SCHLUMBOHM & HARMEYER, 2003). Além da ação direta na glicose, a hipocalcemia demonstrou ser capaz de reduzir a secreção de insulina em vacas leiteiras, apesar dos altos níveis de glicose plasmática, (BLUM et al., 1972). Isto se deve ao cálcio exercer um importante papel como co-fator na exocitose de insulina nas células β pancreáticas (RUTTER et al., 2006).

Em dados não publicados, Schmitt et al., (2009), demonstraram que vacas com hipocalcemia subclínica no início da lactação demonstraram maior relação glucagon/insulina, bem como elevação dos níveis de AGNE, ao serem comparadas com vacas normocalcêmicas. Entretanto, destaca-se que todas estas questões neste período de súbito incremento na demanda energética baseiam-se além do aporte de nutrientes no tempo e capacidade de adaptação do tecido hepático, em utilizar diferentes rotas metabólicas para produção de energia (CHILLIARD et al., 2000, LOOR et al., 2006).

Com base nestas evidências a hipótese deste estudo é que ovelhas em balanço energético negativo crônico (BENC), quando submetidas à hipocalcemia subclínica pela infusão de Na_2EDTA , tem maior depressão da produção de glicose endógena além da diminuição na secreção de insulina pela falta de cálcio como segundo mensageiro no processo de exocitose. Assim sendo, o objetivo de avaliar os efeitos da hipocalcemia subclínica em alguns marcadores relacionados ao

balanço energético durante os primeiros cinco dias de lactação de ovelhas de corte em BENC.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado entre os meses de julho e setembro de 2008 junto ao centro experimental de ovinos do Núcleo de Pesquisa Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC) da Universidade Federal de Pelotas. Cinco dias antes do início de experimento dezesseis ovelhas cruza (Ideal x Corriedale) que estavam em regime de pastejo em campo nativo foram transferidas para unidade experimental, onde passaram alimentar-se de pastagem de aveia e azevém. Os animais permaneciam 6 horas ao dia na pastagem e no restante do dia eram estabulados recebendo apenas água. Durante a admissão os animais passaram por um exame clínico e foram categorizados quanto ao escore de condição corporal (CC) em uma escala de 1 a 5 onde, 1 = muito magra e 5 = muito gorda. À medida que as ovelhas pariam, eram distribuídas ao acaso para grupo normocalcêmicas ou grupo hipocalcemia, sendo neste momento também estabelecida a condição corporal. Os grupos foram compostos por nove ovelhas no grupo normocalcêmicas e sete no grupo tratamento e a condição corporal distribuída da seguinte forma: no grupo normocalcêmicas, CC 1 = 44,4% (4/9) e CC 2 = 55,6% (5/9); e no Grupo tratamento: CC 1 = 42,8% (3/7), CC 2 = 42,8% (3/7) e CC 3 = 14,4% (1/7).

As ovelhas do grupo tratamento passaram por cateterização da veia jugular cerca de trinta minutos antes do início da indução da hipocalcemia. Para isto, procedeu-se tricotomia do pescoço e assepsia local com solução de PVPI 2% e então cateterização do vaso utilizando cateter intravenoso central 16G x 12" (BD I-Cathtm, BD, 1 Becton Drive, Franklin Lakes, NJ/ USA) . Seis horas pós-parto os animais receberam uma infusão de Na₂EDTA 5%, (pH 7,36 -7,4) numa velocidade de 10 gotas por minuto conforme metodologia descrita por JOØRGENSEN et al., (1999). A velocidade foi alterada de acordo com a leitura dos níveis plasmáticos de Ca ionizado, monitorados a cada hora, afim de serem mantidos no intervalo de 2,5 a 3,5 mg/dL. O aparelho utilizado para leitura foi o medidor de pH Orion 290A+ ISE advanced pH/mVt (Thermo Fisher Scientific, United States), dotado de um eletrodo Ca íon seletivo. Foram utilizadas alíquotas de 5 ml de sangue total, que eram coletadas diretamente do cateter com seringas heparinizadas (heparina 2%) e

adicionado a um recipiente próprio para a leitura que continha 50 μL de solução KCl 4mol/L . As ovelhas foram mantidas em hipocalcemia até 18 horas pós-parto, e durante este período o cordeiro foi mantido constantemente com a mãe, para evitar um maior estresse.

Para execução do perfil metabólico foram feitas coletas diárias de amostras de sangue do primeiro ao quinto dia pós-parto , sendo a coleta do dia um realizada no mesmo momento da biópsia e as quatro coletas seguintes realizadas antes dos animais serem soltos para pastagem. Com exceção das ovelhas cateterizadas no dia um as demais coletas de sangue foram realizadas por punção da veia jugular, utilizando o sistema Vacutainer (BD Diagnostics, São Paulo, Brasil) em um tubo contendo anticoagulante (EDTA 10%) na proporção de 12 $\mu\text{L}/\text{ml}$ de sangue, outro com EDTA 10% e antiglicolítico (KF 12%) e um terceiro sem nenhuma solução. Imediatamente após a coleta de sangue estes foram submetidos à centrifugação para obtenção de amostras de plasma, plasma com antiglicolítico e soro, as quais foram divididas em três tubos de 1,5 ml previamente identificados e congelados a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou resfriados a $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os níveis plasmáticos de cálcio, magnésio, fósforo, cloretos, glicose, uréia, albumina e gama glutamil transferase (GGT) foram analisados por colorimetria utilizando Kits enzimáticos (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil) e para leitura o espectrofotômetro de luz visível (FEMTO 435, FEMTO Indústria e Comércio de Instrumentos, São Paulo, Brasil). Para determinação dos níveis plasmáticos de ácidos graxos não esterificados utilizou-se o Kit HR Series NEFA-HR (Wako Chemicals, USA) e a metodologia conforme a descrita pelo fabricante utilizando o mesmo espectrofotômetro.

A determinação dos teores séricos de β -hidroxibutirato foi quantificada pelo método enzimático cinético através do kit comercial Ranbut (Randox), em leitor de placa da marca Molecular Devices, modelo SpectraMax M5 e software SoftMax Pro5, conforme técnica adaptada por Ballou et al. (2009).

Os resultados foram analisados utilizando sistema ANOVA com modelo misto (Mixed Models) considerando efeitos fixos o fatorial das variáveis coleta e grupo e como efeito randômico a distribuição dos animais nos grupos. As variáveis dependentes incluídas foram níveis plasmáticos de todos os metabólitos já citados anteriormente. Esta análise foi realizada com o Software SAS (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA) e são apresentados com média \pm erro padrão da média

comparadas através do teste de Tukey-Kramer utilizando como nível de significância $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A média dos níveis de cálcio ionizado para grupo normocalcêmicas e tratamento durante o experimento foi de $4,39 \pm 0,15$ e $3,88 \pm 0,15$ mg/dL respectivamente ($P < 0,05$), sendo que no dia um foi observado apenas tendência ($P < 0,06$) de diferença entre tratamentos com média de $2,50 \pm 0,25$ mg/dL para ovelhas hipocalcêmicas e $3,86 \pm 0,27$ mg/dL para o grupo normocalcêmicas. O mesmo padrão de diferença entre médias ao final de cinco dias ($P < 0,05$) foi observado nos níveis de cálcio total, sendo $9,17 \pm 0,24$ e $8,06 \pm 0,30$ mg/dL para grupo normo e hipocalcêmicas, respectivamente. Apesar de não observado efeito da interação entre grupo e dia pós-parto, para cálcio total e ionizado, as diferenças entre os níveis médios ao final de cinco dias demonstram, que mesmo com rápida excreção pelos rins do complexo Ca e Na_2EDTA (ARONSON & AHRENS, 1971), durante os três primeiros dias pós-parto as ovelhas induzidas à hipocalcemia mantiveram o cálcio total menor que 8,4 mg/dL considerado como valor mínimo de referência nesta espécie (WATT, 2006, EI-KHODERY et al., 2008), como mostra a Figura 1. Em alguns casos de indução a hipocalcemia com Na_2EDTA , a variabilidade na depressão da motilidade do trato gastrointestinal pode determinar a capacidade de recuperação dos animais, já que o cálcio absorvido no intestino é fundamental para manutenção da calcemia (JOØRGENSEN et al., 1999). Isto poderia explicar a inexistência de uma rápida elevação dos níveis de cálcio em resposta a indução da hipocalcemia subclínica.

Ainda com relação a excreção renal do complexo Na_2EDTA , este pode ter favorecido o aumento da excreção da uréia a qual foi diferente entre os grupos ao final do experimento, sendo maior para o grupo normocalcêmicas ($68,12 \pm 5,5$ vs. $58,43 \pm 4,9$ mg/dL). A necessidade de eliminar o Na_2EDTA pode ter aumentado o fluxo de filtração glomerular e, conseqüentemente, a eliminação de uréia nas ovelhas hipocalcêmicas, ilustrada pela maior amplitude numérica dos níveis de uréia no dia um (Tabela 1). Segundo alguns autores (NOLAN & LENG, 1970; NDIBUALONJI et al., 1998; RAMIN et al., 2005) ovelhas no final da gestação e

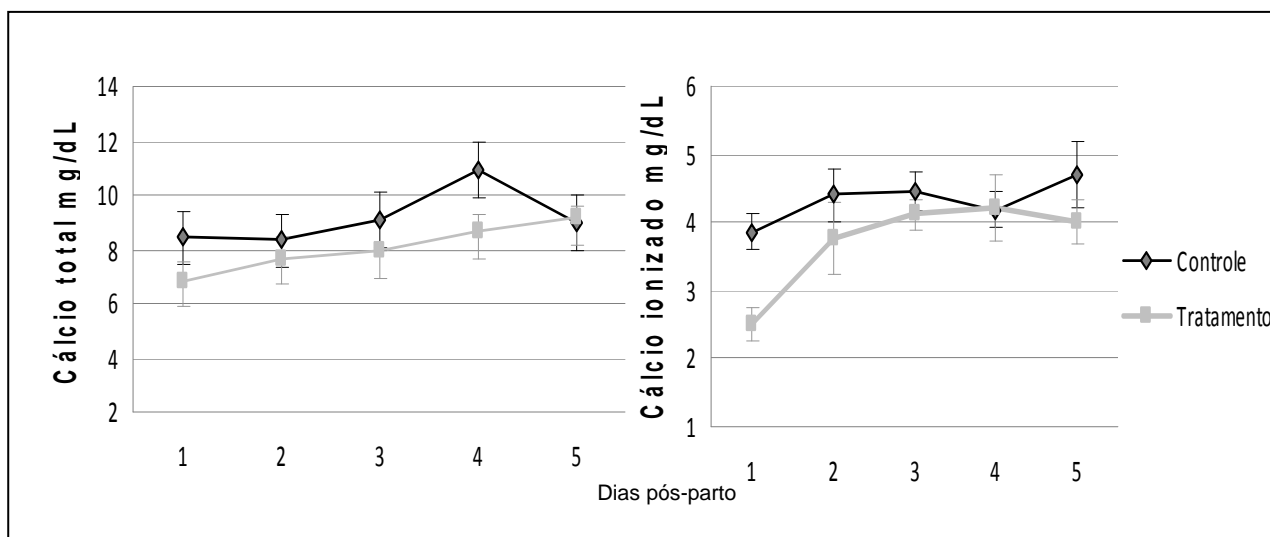


Figura 3.1. Níveis de cálcio total e ionizado (no soro e plasma, respectivamente), dos grupos normo e hipocalcêmicas durante os cinco dias pós-parto.

início da lactação retém uréia através de reduções do fluxo plasmático renal e na taxa de filtração, entretanto os níveis aqui apresentados (Figura 2) indicam que o BENC levou a uma alta taxa de proteólise refletida nos níveis de uréia. Mesmo assim, os níveis séricos de albumina ficaram dentro dos valores de referência para esta espécie e condição fisiológica (BALIKCI et al., 2005), permitindo afirmar que apesar da alta mobilização de reservas proteicas as ovelhas não apresentavam hipoproteinemia.

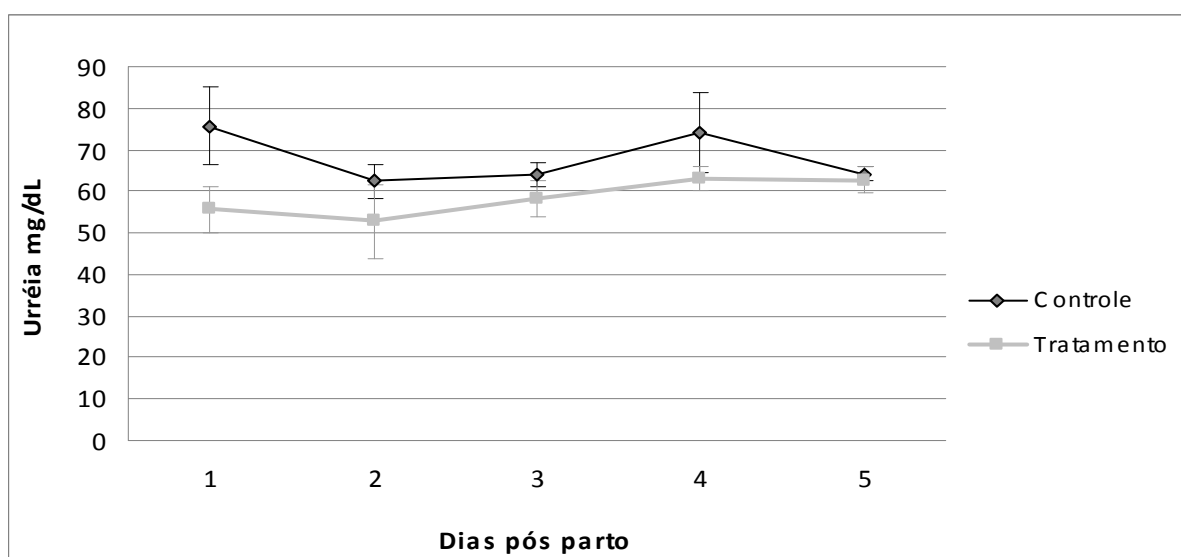


Figura 3.2. Níveis séricos de uréia (mg/dL) para grupos normo e hipocalcêmicas ao longo dos cinco dias pós-parto

A indução da hipocalcemia subclínica aparentemente influenciou nos níveis de fósforo ($P>0,05$), com maiores níveis séricos para ovelhas hipocalcêmicas ao final dos cinco dias ($5,38 \pm 0,36$ e $4,32 \pm 0,25$ mg/dL). Esta diferença seguiu os mesmos padrões dos níveis de uréia, com maior amplitude numérica no dia um, e possivelmente tenha sido provocada liberação de P do tecido ósseo, mediada pela ação do PTH visando elevar os níveis de cálcio. Apesar deste hormônio também controlar a elevação dos níveis de P pela excreção renal no túbulo contorcido proximal, a presença de cálcio no lúmen do túbulo, também é um mecanismo de estímulo da absorção de fósforo que pode ter sido determinante durante a indução da hipocalcemia (BISELLO & FRIEDMAN, 2008). Já os níveis de magnésio e cloretos não foram influenciados pela hipocalcemia subclínica.

Importante ressaltar que o perfil metabólico não foi influenciado pela média de dias da admissão a data do parto não diferiu entre grupos sendo de $24,55 \pm 19,34$ e $27,71 \pm 8,28$ dias ($P>0,05$) para as normo e hipocalcêmicas respectivamente. Entretanto, estes intervalos mostram o curto período adaptativo à nova condição alimentar, que não foi capaz de modificar o status de catabolismo, observado pela manutenção da baixa condição corporal. Estados crônicos de subnutrição como este, exigem em torno de 30 dias, para normalização do fluxo de oxigênio do trato gastrointestinal (FREETLY, 1995), que por sua vez está relacionado ao fluxo de nutrientes, ao tempo de adaptação da flora ruminal e alterações da capacidade absorptiva das papilas ruminais. Estes fatores são determinantes para a taxa de produção e absorção de ácidos graxos voláteis (AGV) no rúmen e, conseqüentemente, afetam diretamente a produção de glicose endógena por reduzir a gliconeogênese no fígado (CHILLIARD et al., 1998). Neste contexto destacamos a importância do início da lactação para manutenção desta condição de catabolismo, momento em que ocorre priorização da produção de leite, aumentando a demanda de glicose e cálcio (DURAK & ALTINER, 2006). Esta soma de fatores justificam os altos níveis de ácidos graxos não esterificados (AGNE) no $0,98 \pm 0,17$ mmol/L e hipocalcêmicas ($1,00 \pm 0,15$ mmol/L) evidenciando o balanço energético negativo (BEN) sem diferença estatística entre os grupos.

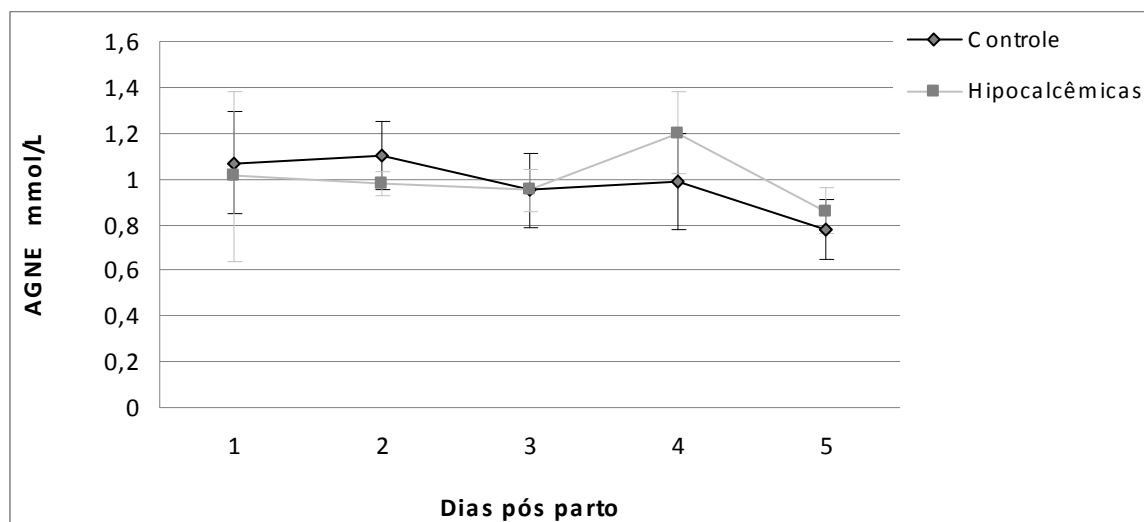


Figura 3.3. Níveis de ácidos graxos não esterificados (mmol/L) nos cinco dias pós-parto para grupo normo e hipocalcêmicas.

Tanto em ovelhas, como em vacas leiteira a hipocalcemia tem sido apontada como um fator responsável pela diminuição da ingestão de matéria seca, pela baixa motilidade do trato gastrointestinal, além de ser um fator que somado aos altos níveis de corpos cetônicos é depressor na produção endógena de glicose (GOFF, 2006; SCHLUMBOHM & HARMEYER 2003). Apesar de algumas ovelhas apresentarem em alguns momentos altos níveis de corpos cetônicos estas elevações não coincidiram com o momento da hipocalcemia e talvez por isso não alteraram os padrões de glicose que podem ser considerados normais, para a condição de início de lactação (CALDEIRA, 2005; ROUBIES et al., 2006,). Cabe salientar que no estudo em que SCHLUMBOHM & HARMEYER (2003), demonstraram o efeito da hipocalcemia no *turnover* de glicose, os animais não estavam em BENC antes do início do experimento. Provavelmente, naqueles animais em boa condição corporal, ainda não adaptados a condição de déficit energético e altos níveis de corpos cetônicos a hipocalcemia subclínica possa ter maior efeito depressor no metabolismo de carboidratos. No presente estudo os níveis médios de glicose foram de $53,83 \pm 3,97$ mg/dL e $52,51 \pm 3,59$ mg/dL para grupo normo e hipocalcêmicas respectivamente, sendo observada diferença apenas entre coletas sem efeito do grupo e com maiores concentrações de glicose no dia um. Tal diferença, pode ser explicada pela ação do cortisol, que aumenta gradativamente 5 dias antes do parto e determina maior disponibilidade de glicose circulante interferindo na ação do carreador de glicose GLUT4 nos tecidos

periféricos e estimulando a gliconeogênese no tecido hepático (BASSETT, 1963; FOWDEN, 1997; INGVARTSEN, 2000).

Apesar de estabelecido o BEN crônico, com exceção de alguns picos em algumas ovelhas, os níveis médios de corpos cetônicos mantiveram-se entre os limites considerados basais para o período 0,72-0,85 mmol/l (DURAK, 2006; HARMEYER & SCHLUMBOHM, 2006). Tais resultados sugerem a otimização do uso de corpos cetônicos pelos tecidos periféricos para suprimento energético por uma adaptação a baixa disponibilidade de AGV e glicose (CALDEIRA, 2005). Entretanto, destaca-se que os níveis de GGT estavam acima dos valores de referência (KANEKO ET AL.,1997) configurando uma sobrecarga hepática, possivelmente pelo acúmulo de ácidos graxos não esterificados, que levaram à lipidose hepática. Curiosamente as ovelhas do grupo normocalcêmicas tiveram níveis de GGT (Figura 4) superiores as hipocalcêmicas ao final do experimento ($P<0,01$), mesmo tendo iniciado no dia um, com níveis muito próximos as ovelhas hipocalcêmicas que aumentaram gradualmente ao longo dos cinco dias, sugerindo maior estresse metabólico nestes animais.

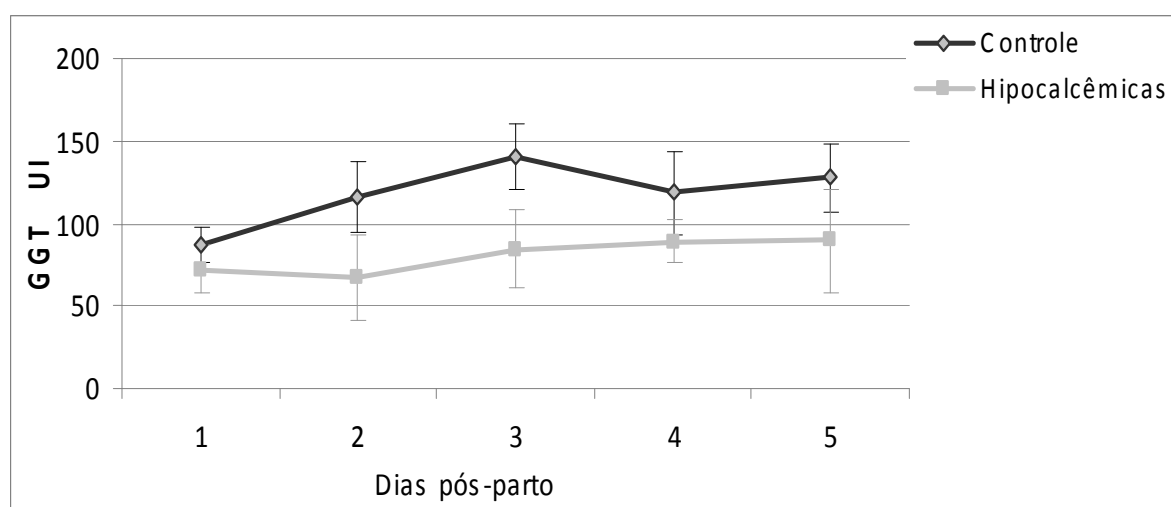


Figura 3.4. Níveis séricos de gama glutamil transferase (UI) dos grupos normo e hipocalcêmicas ao longo dos cinco dias pós-parto.

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que a hipocalcemia subclínica pode não influenciar no BENC em ovelhas no início de lactação alimentadas em sistema de pastejo. Entretanto a variabilidade de resposta entre indivíduos em

relação ao nível de cálcio plasmático e motilidade gastrointestinal, pode determinar uma diminuição da ingestão de matéria seca e agravamento do balanço energético negativo em alguns animais.

Tabela 2. 1. Perfil metabólico dos grupos normocalcêmicas e hipocalcêmicas durante os cinco dias pós-parto (média \pm erro padrão da média).

Variável	Média \pm erro padrão da média									
	Normocalcêmicas					Hipocalcêmicas				
	Dias pós-parto									
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Ca (mg/dL)*	8,43 \pm 0,39	8,33 \pm 0,46	9,09 \pm 0,58	10,9 \pm 0,38	8,98 \pm 0,48	6,86 \pm 0,68	7,69 \pm 0,78	7,94 \pm 0,71	8,65 \pm 0,60	9,19 \pm 0,36
Ca ionizado (mg/dL)*	3,86 \pm 0,27	4,4 \pm 0,39	4,46 \pm 0,3	4,18 \pm 0,26	4,7 \pm 0,47	2,49 \pm 0,25	3,27 \pm 0,52	4,11 \pm 0,22	4,36 \pm 0,47	4,21 \pm 0,34
Glicose (mg/dL)	81,81 \pm 12,20	43,60 \pm 3,28	51,46 \pm 7,35	46,89 \pm 5,77	43,08 \pm 5,33	62,12 \pm 7,96	48,23 \pm 8,53	45,37 \pm 4,34	43,67 \pm 4,76	65,88 \pm 10,70
BHB (mmol/L)	1,11 \pm 0,32	0,55 \pm 0,10	0,69 \pm 0,16	1,12 \pm 0,45	0,72 \pm 0,16	0,6 \pm 0,16	0,84 \pm 0,17	0,72 \pm 0,21	0,68 \pm 0,12	0,74 \pm 0,18
AGNE (mmol/L)	1,07 \pm 0,22	1,1 \pm 0,15	0,95 \pm 0,16	0,99 \pm 0,21	0,78 \pm 0,13	1,01 \pm 0,37	0,98 \pm 0,05	0,95 \pm 0,09	1,2 \pm 0,18	0,86 \pm 0,10
Uréia (mg/dL)*	75,76 \pm 9,27	62,47 \pm 4,09	64,13 \pm 3,0	74,04 \pm 9,61	64,23 \pm 1,60	55,59 \pm 5,68	52,77 \pm 8,79	58,27 \pm 4,13	62,87 \pm 2,86	62,68 \pm 3,22
Fósforo (mg/dL)*	4,33 \pm 0,43	4,31 \pm 0,81	4,88 \pm 0,57	4,11 \pm 0,70	3,93 \pm 0,22	6,26 \pm 1,09	4,64 \pm 0,82	4,62 \pm 0,58	5,51 \pm 0,61	5,78 \pm 0,85
Magnésio (mg/dL)	2,29 \pm 0,26	2,17 \pm 0,29	2,26 \pm 0,19	1,66 \pm 0,17	1,64 \pm 0,36	2,37 \pm 0,32	2,5 \pm 0,86	2,53 \pm 0,55	1,86 \pm 0,19	5,23 \pm 2,54
Cloretos (mg/dL)	106,81 \pm 2,84	110,3 \pm 5,74	104,65 \pm 4,18	102,76 \pm 2,51	103,73 \pm 2,49	111,05 \pm 4,85	110,27 \pm 3,69	115,51 \pm 4,53	108,57 \pm 4,30	107,36 \pm 4,77
Albumina (g/L)	28,75 \pm 0,76	29,1 \pm 1,29	28,57 \pm 1,06	27,19 \pm 1,06	27,77 \pm 1,09	30,16 \pm 3,17	28,72 \pm 1,72	30,13 \pm 1,90	28,88 \pm 1,29	28,68 \pm 1,23
GGT UI/L*	87,38 \pm 10,58	115,86 \pm 21,2	140,67 \pm 20,07	118,67 \pm 25,06	127,57 \pm 20,12	71,85 \pm 14,46	66,91 \pm 25,77	84,69 \pm 24,33	89,17 \pm 13,41	89,88 \pm 31,30

* Variáveis cujas médias de todo período experimental diferiram entre grupos (P<0,05)

REFERÊNCIAS

ANDREWS, R. C. and WALKER B. R. Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. *Clinical Science*, v. 96, p.513-523, 1999.

ARONSON, A. L. and AHRENS, F. A. The mechanism of renal transport and excretion of ethylenediaminetetraacetate with interspecies comparisons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* v. 18, p.1–9, 1971.

BALIKCI, E. et al. Blood metabolite concentrations during pregnancy and postpartum in Akkaraman ewes *Small Ruminant Research*, v.67, p. 247–251, 2007.

BALLOU M. A. et al. 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. 657–669, 2009

.

BASSETT, J. M. The influence of cortisol on food intake and glucose metabolism in sheep. *Journal of Endocrinolog.* v. 26, p.539-553, 1963. DOI: 10.1677/joe.0.0260539

BISELLO, A. and FRIEDMAN, P. A. PTH and PTHrP actions on kidney and bone. *Principles of Bone Biology (Third Edition)*, p.665-712, 2008. doi:10.1016/B978-0-12-373884-4.00050-1.

BLUM, J.W. et al. Plasma insulin concentrations in parturient cows. *J Dairy Sci*, v. 56, p. 459-464, 1972.

CALDEIRA, R. M. Monitorização da adequação do plano alimentar e do estado nutricional em ovelhas. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v. 100 (555-556), p.125-139, 2005.

CARVALHO, P. C. de F. Access to land, livestock production and ecosystem conservation in the Brazilian Campos Biome: the natural grasslands dilemma. *International Conference on Agrarian Reform and Rural Development (ICAR RD)*:

New challenges and options for revitalizing rural communities Porto Alegre, Brazil, 7-10 March, 2006.

CHILLIARD Y. Metabolic adaptations and nutrient partitioning in the lactating animal. In *Biology of Lactation*, p. 503–552 [J Martinet, LM Houdebine and HH Head, editors]. Paris: INRA Ed., 1999.

CHILLIARD, Y. et al. Digestive and metabolic adaptations of ruminants to undernutrition, and consequences on reproduction. *Repro Nutr. Dev.*, v. 38, p. 131-152, 1998.

CHILLIARD, Y. et al. Adipose tissue metabolism and its role in adaptations to undernutrition in ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 59, p. 127–134, 2000.

DURAK, M. H. and ALTINER, A. Effect of energy deficiency during late pregnancy in Chios Ewes on free fatty acids, β -hydroxybutyrate and Urea Metabolites. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* v.30, p. 497-502, 2006.

EI-KHODERY, S. et al. Hypocalcemia in Ossimi Sheep Associated with Feeding on Beet Tops (*Beta vulgaris*). *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, v.32, n.3, p.199-205, 2008.

FREETLY H. C. et al. Visceral oxygen consumption during chronic feed restriction and realimentation in sheep, *J. Anim. Sci.* v.73, p. 843-852, 1995.

FOWDEN, A. L. Comparative aspects of fetal carbohydrate metabolism. *Equine Vet. J. Suppl.* v.24, p. 19–25, 1997.

GOFF, J. P. Macromineral physiology and application to the feeding of the dairy cow for prevention of milk fever and other periparturient mineral disorders. *Animal Feed Science and Technology*, v. 126, p. 237–257, 2006.

HARMEYER, J. and SCHLUMBOHM, C. Pregnancy impairs ketone body disposal in late gestating ewes: implications for onset of pregnancy toxemia. *Res. Vet. Sci.*, v. 81, p. 254-264, 2006.

INGVARTSEN, K. L. and ANDERSEN, J. B. Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals. symposium: dry matter intake of lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci* v. 83, p. 1573–1597, 2000.

IOZZO P. et al. Non-esterified fatty acids impair insulin-mediated glucose uptake and disposition in the liver. *Diabetologia*, v. 47, p. 1149–56, 2004.

JOØRGENSEN, R. J. et al. Induced Hypocalcemia by Na₂EDTA Infusion. A Review. *J. Vet. Med.*, v. 46, p. 389–407, 1999.

LOOR, J. J. et al. Plane of nutrition prepartum alters hepatic gene expression and function in dairy cows as assessed by longitudinal transcript and metabolic profiling. *Physiol Genomics*, v. 27, p. 29–41, 2006.

LOOR, J.J. et al. Nutrition-induced ketosis alters metabolic and signaling gene networks in liver of periparturient dairy cows. *Physiol Genomics*, v. 32, p. 105–116, 2007.

MAVROGIANNI, V.S. and BROZOS, C. Reflections on the causes and the diagnosis of peri-parturient losses of ewes. *Small Ruminant Research*, v.76, Issues 1-2, p.77-82, 2008.

NDIBUALONJI, B. B. et al. Effects of late pregnancy and early lactation on renal urea handling in Corriedale ewes. *Journal of Agricultural*, v. 130 n.2, p. 213-216 , 1998.

NOLAN, J. V. and LENG, R. A. Metabolism of urea in late pregnancy and the possible contribution of amino acid carbon to glucose synthesis in sheep. *Br. J. Nutr.*, v. 24, p. 905-915, 1970.

RAMIN, A.G. and MAJDANI, S. A, R. Correlations among serum glucose, beta-hydroxybutyrate and urea concentrations in non-pregnant ewes. *Small Ruminant Research*, v .57, p. 265–269, 2005.

RIBEIRO, L. A.O.; et al. Perfil metabólico de ovelhas Border Leicester x Texel durante a gestação e a lactação. *Rev. Portug. de Ciên. Vet.* v. 99 n. 551, p.155-159, 2004.

RIOND, J. L.; et al. Effects of EDTA-induced hypocalcemia on plasma TNF-a, IL-1-ra, G-CSF, GM-CSF and S-100 in dairy cows. In: *Production Diseases in Farm Animals. 10th International Conference, Utrecht, 24–28 August 1998*, p. 88. Wageningen Pers, Wageningen, The Netherlands, 1999.

ROUBIES, N. et al. Effects of Age and Reproductive Stage on Certain Serum Biochemical Parameters of Chios Sheep Under Greek Rearing Conditions *J. Vet. Med.* v. 53, p. 277–281, 2006.

RUTTER, G.A. et al. Ca^{2+} microdomains and the control of insulin secretion. *Cell Calcium*, v.40, p. 539–551, 2006.

VERNON, R.G. Homeorhesis. In *Yearbook*, [E Taylor, editor]. Ayr, Scotland: Hannah Research Institute, p. 64–73, 1998.

SAS Institute Inc., *SAS 9.1.3 Help and Documentation*, Cary, NC: SAS Institute Inc., 2000-2004.

SCHLUMBOHM, C. and HARMEYER, J. Hypocalcemia reduces endogenous glucose production in hyperketonemic sheep. *J Dairy Sci.*, v. 86, p.1953–1962, 2003.

SCHMITT, Edurado. Influência da hipocalcemia subclínica no balanço energético de vacas leiteiras. 2009. 75f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

WATT B.R. Hypocalcaemia in lactating drought fed ewes supplemented with recommended levels of calcium. Australian journal of Experimental Agriculture, v.46, p.6-7, 2006.

8. CONCLUSÕES GERAIS

Os padrões secretórios de insulina não foram alterados pelas infusões de CaCl_2 durante o teste de tolerância de glicose em ovelhas gestantes. Apesar da necessidade de maiores estudos quanto a dose e a via de administração de Ca_2Cl , nossos resultados sugerem que as adaptações metabólicas durante o periparto de ruminantes, as quais determinam alterações nos padrões secretórios de insulina não são capazes de modificar a responsividade das células beta pancreáticas ao estímulo de uma rápida elevação sanguínea.

Apesar disso os resultados observados nas vacas leiteiras durante o periparto com hipocalcemia pós-parto, são indicativos de que níveis insuficientes de cálcio podem ser precursores do balanço energético negativo. Porém, nos casos em que os animais já se encontram em balanço energético crônico, os baixos níveis de cálcio parecem não influenciar no balanço energético negativo em ruminantes conforme demonstrado no último experimento.

10. REFERÊNCIAS

ANDREWS, R. C. and WALKER B. R. Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. *Clinical Science*, v. 96, p.513-523, 1999.

ARONSON, A. L. and AHRENS, F. A. The mechanism of renal transport and excretion of ethylenediaminetetraacetate with interspecies comparisons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* v. 18, p.1–9, 1971.

BAAZIZ N.; CURRY DL. Synthesis-secretion coupling of insulin: effect of pregnancy and lactation. *Pancreas*, v. 8 p. 316–324, 1993.

BALIKCI, E. et al. Blood metabolite concentrations during pregnancy and postpartum in Akkaraman ewes *Small Ruminant Research*, v.67, p. 247–251, 2007.

BALLOU M. A. et al. 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. 657–669, 2009.

BASSETT, J. M. The influence of cortisol on food intake and glucose metabolism in sheep. *Journal of Endocrinol.* v. 26, p.539-553, 1963. DOI: 10.1677/joe.0.0260539

BAUMAN D. E. and CURRIE W. B. Partitioning of Nutrients During Pregnancy and Lactation: A Review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *Journal of Dairy Science*, v. 63, p.1514-1529, 1980.

BISELLO, A. and FRIEDMAN, P. A. PTH and PTHrP actions on kidney and bone. *Principles of Bone Biology (Third Edition)*, p.665-712, 2008. doi:10.1016/B978-0-12-373884-4.00050-1.

BLUM, J.W. et al. Plasma insulin concentrations in parturient cows. *J Dairy Sci*, v. 56, p. 459-464, 1972.

BRELJE, T.C. et al. Effect of homologous placental lactogens, prolactins, and growth hormones on islet β -cell division and insulin secretion in rat, mouse, and human islets: implication for placental lactogen regulation of islet function during pregnancy. *Endocrinology*, v. 132-2, p. 879-887, 1993.

BROMMAGE, R. and DELUCA, HF. Regulation of bone mineral loss during lactation. *Am J Physiol*, v. 248, p. E182-7, 1985.

BRUNT, L. M. et al. Stimulation of insulin secretion by a rapid intravenous calcium infusion in patients with beta-cell neoplasms of the pancreas. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 62(1), p. 210-6, 1986.

CALDEIRA, R. M. Monitorização da adequação do plano alimentar e do estado nutricional em ovelhas. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v. 100 (555-556), p.125-139, 2005.

CARVALHO, P. C. de F. Access to land, livestock production and ecosystem conservation in the Brazilian Campos Biome: the natural grasslands dilemma. *International Conference on Agrarian Reform and Rural Development (ICAR RD): New challenges and options for revitalizing rural communities Porto Alegre, Brazil, 7-10 March, 2006.*

CHILLIARD Y. Metabolic adaptations and nutrient partitioning in the lactating animal. In *Biology of Lactation*, p. 503-552 [J Martinet, LM Houdebine and HH Head, editors]. Paris: INRA Ed., 1999.

CHILLIARD, Y. et al. Digestive and metabolic adaptations of ruminants to undernutrition, and consequences on reproduction. *Repro Nutr. Dev.*, v. 38, p. 131-152, 1998.

CHILLIARD, Y. et al. Adipose tissue metabolism and its role in adaptations to undernutrition in ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society*, v.59, p.127–134, 2000.

CORBELLINI, C. N. Etiopatogenia e controle da hipocalcemia e hipomagnesemia em vacas leiteiras. In: Gonzalez FHD, Ospina HP, Barcellos JOJ (Editores). *Anais do seminário internacional sobre deficiências minerais em ruminantes*. Editora da UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. P. 28, 1998.

DEWHURST, R. J. et al. Effects of altering energy and protein supply to dairy cows during the dry period. Intake, body condition and milk production. *J. Dairy Sci.* v.. 83, p.1782–1794, 2000.

DOPPMAN, J.L. et al. Insulinomas: localization with selective intraarterial injection of calcium. *Radiology*. v.178, p.237-241. Erratum, *Radiology*. p.187-880, 1993.

DRAZNIN, B. Mechanism of insulin resistance induced by sustained levels of cytosolic free calcium in rat adipocytes. *Endocrinology*, v. 125, p. 2341-2349, 1989.

DUFFIELD, T. F. et al. Use of test day milk fat and milk protein to detect subclinical ketosis in dairy cattle in Ontario, *Can. Vet. J.* v. 38, p. 713–718, 1997.

DURAK, M. H. and ALTINER, A. Effect of energy deficiency during late pregnancy in Chios Ewes on free fatty acids, β -hydroxybutyrate and Urea Metabolites. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* v.30, p. 497-502, 2006.

EI-KHODERY, S. et al. Hypocalcaemia in Ossimi Sheep Associated with Feeding on Beet Tops (*Beta vulgaris*). *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, v.32, n.3, p.199-205, 2008.

ELMAHDI, B. et al. Comparative aspects of glucose tolerance in camels, sheep, and ponies. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 118A, n.1, p. 147–151, 1997.

EL-SAMAD, H. et al. Calcium Homeostasis and Parturient Hypocalcemia: An Integral Feedback Perspective *J. theor. Biol.*, v. 29, p. 214 – 217, 2002.

FOWDEN, A. L. Comparative aspects of fetal carbohydrate metabolism. *Equine Vet. J. Suppl.* 24:19–25, 1997.

FOWDEN, A. L. and FORHEAD, A. J. Endocrine mechanisms of intrauterine programming Society for Reproduction and Fertility. p.1741–1789 (Online version via www.reproduction-online.org), 2004.

FREETLY H. C. et al. Visceral oxygen consumption during chronic feed restriction and realimentation in sheep, *J. Anim. Sci.* 73 (1995) 843-852.

GARRETT, O.R. Ketosis and Hepatic Lipidosis in Dairy Herds. Preconvention Seminar 7: Dairy Herd Problem Investigation Strategies.36th Annual Conference, September . Columbus, OH. p15-17, 2003.

GARDNER, A. L. Medição de atributos de pastagem em sistema de pastejo. In: Técnicas de pesquisa em patagem e aplicabilidade de resultados em sistemas de produção. Brasília: IICA/EMBRAPA-GNPGL, 1986. p.113-123.

GOFF, J .P. et al. Hypocalcemia: Biological Effects And Strategies for Prevention. Nutrition Conference sponsored by Department of Animal Science, UT, 2005.

GOFF, J. P. Macromineral disorders of the transition cow. *Vet Clin Food Anim*, v.20, p.471–494, 2004.

GOFF, J. P. Macromineral physiology and application to the feeding of the dairy cow for prevention of milk fever and other periparturient mineral disorders. *Animal Feed Science and Technology*, v.126, p 237–257, 2006.

GOFF, J. P. and HORST, R. L. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J. Dairy Sci.*, v. 80, 1260–1268, 1997.

HARMEYER, J. and SCHLUMBOHM, C. Pregnancy impairs ketone body disposal in late gestating ewes: implications for onset of pregnancy toxemia. *Res. Vet. Sci.*, v.81, p. 254-264, 2006.

HAY, W. W. et al. Partition of maternal glucose production between conceptus and maternal tissues in sheep. *Am J Physiol.*, v. 245, p.E347–E350, 1983.

HELLMAN, B. and GYLFE, E. Calcium and the control of insulin secretion. In: Cheung WY (eds) *Calcium and Cell Function*. Academic Press, Orlando, v. VI, p. 253–326, 1986.

HENZE, P. et al. The influence of the hormones insulin, cortisol, growth hormone and total oestrogen on the pathogenesis of ketosis in sheep. *Dtsch tieraerztl Wschr*, v. 101, p.61–65, 1994.

HOLNESS, M. J. and SUGDEN, M. C. In late pregnancy insulin-dependent glucose transport/phosphorylation is selectively impaired and activation of glycogen synthase by insulin facilitated in skeletal muscles of 24-h starved rats. *Diabetologia*, v. 42, p.802–811, 1999.

HOLST, J. J. and GROMADA, J. *Am J Physiol Endocrinol Metab* v. 287, p.199-206, 2004. doi:10.1152/ajpendo.00545.2003

HOUE, H. et al. Milk fever and subclinical hypocalcaemia. An evaluation of parameters on risk, diagnosis, risk factors and biological effects as input for a decision support system for disease control. *Acta Vet. Scand.* v.42, p.1 –29, 2001.

HUSTED, S. M. et al. Glucose homeostasis and metabolic adaptation in the pregnant and lactating sheep are affected by the level of nutrition previously provided during her late fetal life. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 34, Issue 4, p. 419-431, 2008.

INGVARTSEN, K. L. and ANDERSEN, J. B. Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals. symposium: dry matter intake of lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci* v.83, p.1573–1597, 2000 .

INGVARTSEN, K.L. Feeding- and management-related diseases in the transition cow: Physiological adaptations around calving and strategies to reduce feeding-related diseases. *Animal Feed Science and Technology*. v. 126, p. 175-213. 2006.

IOZZO P. et al., Non-esterified fatty acids impair insulin-mediated glucose uptake and disposition in the liver. *Diabetologia*,; v.47, p.1149–56, 2004.

JARDON P. Using urine pH to monitor anionic salt programs. in: *Compend Contin Educ Pract*. v.17, p. 860-862, 1995.

JENNY, B. F. et al. Effects of high grain feeding and stage of lactation on serum insulin, glucose, and milk fat percentage in lactating cows. *J. Nutr.* V.104, p.379–385, 1974.

JOØRGENSEN, R. J. et al. Induced Hypocalcaemia by Na₂EDTA Infusion. A Review. *J. Vet. Med.*, v. 46, p. 389–407, 1999.

KARATZIAS, H. Effects of Age and Reproductive Stage on Certain Serum Biochemical Parameters of Chios Sheep Under Greek Rearing Conditions *J. Vet. Med.* v.53, p.277–281, 2006.

KOVACS, C. S. and KRONENBERG, H. M. Maternal-fetal calcium and bone metabolism during pregnancy, puerperium, and lactation. *End Rev*, v. 18, n.6, p.832–872, 1997.

KURBEL, S. et al. A calcium homeostasis model: orchestration of fast acting PTH and calcitonin with slow calcitriol. *Med Hyp*, v. 61, n. 3, p. 346–350, 2003.

LAND, C.; SCHOENAU, E. Fetal and postnatal bone development: reviewing the role of mechanical stimuli and nutrition *Best Pract. & R. Clinc. End. & Met.* v. 22, (1), p. 107-118, February, 2008.

LOOR, J. J. et al. Plane of nutrition prepartum alters hepatic gene expression and function in dairy cows as assessed by longitudinal transcript and metabolic profiling. *Physiol Genomics*, v.27, p.29–41, 2006.

LOOR, J. J. et al. Nutrition-induced ketosis alters metabolic and signaling gene networks in liver of periparturient dairy cows. *Physiol Genomics*, v.32, p.105–116, 2007.

LUCY, M. C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *J. Dairy Sci.* v. 84, 1277–1293, 2001.

MAVROGIANNI, V. S. and BROZOS, C. Reflections on the causes and the diagnosis of peri-parturient losses of ewes. *Small Ruminant Research*, v.76, Issues 1-2, p.77-82, 2008.

MILLS, S.E. et al. Evidence for impaired metabolism in liver during induced lactation ketosis of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v. 69, p. 362–370, 1986.

MILES, L.E. et al. Measurement of serum ferritin by a 2-site immunoradiometric assay. *Anal. Biochem.* v.61, p.209-224, 1974.

NDIBUALONJI, B. B. et al. Effects of late pregnancy and early lactation on renal urea handling in Corriedale ewes. *Journal of Agricultural*, v. 130, n.2, p. 213-216, 1998.

NOLAN, J. V. and LENG, R. A. Metabolism of urea in late pregnancy and the possible contribution of amino acid carbon to glucose synthesis in sheep. *Br. J. Nutr.*, v. 24, p.905-915, 1970.

OBERST, W. F. and PLASS, E. D. The variations in serum calcium, protein, and inorganic phosphorus in early and late pregnancy, during parturition and the puerperium, and in non-pregnant women. *J Clin Invest*, v. 11, p.123–127, 1932.

OHEIM, M. et al. Calcium microdomains in regulated exocytosis. *Cell Calcium*, v.40, p. 423–439, 2006.

RAMIN, A. G. and MAJDANI, S. A, R. Correlations among serum glucose, beta-hydroxybutyrate and urea concentrations in non-pregnant ewes. *Small Ruminant Research*, v .57, p. 265–269, 2005.

REGNAULT, T. R. H. et al. Glucose-stimulated insulin response in pregnant sheep following acute suppression of plasma non-esterified fatty acid concentrations. *Rep Biol End*, v. 2, p.64, 2004.

RIBEIRO, L. A.O. et al. Perfil metabólico de ovelhas Border Leicester x Texel durante a gestação e a lactação *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v. 99, n. 551, p.155-159, 2004.

RIOND, J. L. et al. Ca^{2+} microdomains and the control of insulin secretion. *Cell Calcium*, v.40, p. 539–551, 2006.

SAS Institute Inc., SAS 9.1.3 Help and Documentation, Cary, NC: SAS Institute Inc., 2000-2004.

SCHLUMBOHM, C., SPORLEDER, H.P; GURTLER,H.; HARMEYER, J. The influence of insulin on metabolism of glucose, free fatty acids and glycerol in normo- and hypocalcemic ewes during different reproductive states. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, v. 104, n.9, p.359-365, 1997.

SCHLUMBOHM, C. and HARMEYER, J. Hypocalcemia reduces endogenous glucose production in hyperketonemic sheep. *J Dairy Sci.*, v. 86, p.1953–1962, 2003.

SCHLUMBOHM, C.; HARMEYER, J. Hypocalcemia reduces insulin turnover but not insulin-mediated glucose metabolism in piglets. *Acta Diabetol* v.39, p.191–202, 2002.

SEIFI, H.A., MOHRI, M., KALAMATI ZADEH, J. Use of pre-partum urine pH to predict the risk of milk fever in dairy cows *The Veterinary Journal* v.167, p.281–285, 2004.

SCHEIA, I.; VOLDEN, H.; BÆVRE, L. Effects of energy balance and metabolizable protein level on tissue mobilization and milk performance of dairy cows in early lactation *Livestock Production Science*, v. 95, p. 35–47, 2005.

SINCLAIR, K.D. et al. DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. *PNAS*, v. 104, n. 49, p. 19351–19356, 2007.

STOJEVIĆ, Z., et al. Activities of AST, ALT and GGT in clinically healthy dairy cows during lactation and in the dry period *Veterinarski Arhiv*, v.75, n.1, p.67-73, 2005.

SUN, G. et al. Altered Calcium Homeostasis Is Correlated With Abnormalities of Fasting Serum Glucose, Insulin Resistance, and β -Cell Function in the Newfoundland Population. *Diabetes*, vol. 54, n.11, p. 3336 - 3339, 2005.

VAN DE BRAAK A. E. et al. Influence of a deficient supply of magnesium during the dry period on the rate of calcium mobilization by dairy cows at parturition. *Res Vet Sci*. v.42, n.1, p.101–108, 1987.

VAN DER WALT, J.G. et al. Glucose turnover, tolerance and insulin response in wethers, ewes and pregnant ewes in the fed and fasted state. *Onderstepoort Journal Veterinary Research.*, v. 47, p.173-178, 1980.

VERNON, R.G. Homeorhesis. In *Yearbook*, [E Taylor, editor]. Ayr, Scotland: Hannah Research Institute, p. 64–73, 1998.

WALZ, H. A. et al. β -cell PDE3B regulates Ca^{2+} -stimulated exocytosis of insulin. *Cellular Signalling*, v.19, Issue 7, p.1505-1513, 2007.

WATT B.R. Hypocalcaemia in lactating drought fed ewes supplemented with recommended levels of calcium. *Australian journal of Experimental Agriculture*, v.46, p.6-7, 2006.

WATHES, D.C. et al. Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. *Theriogenology*, In Press, Corrected Proof, Available online 2 May 2007.

WILDE, D. Influence of macro and micro minerals in the peri-parturient period on fertility in dairy cattle. *Animal Reproduction Science* v.96, p 240–249, 2006.

WILLIAMS, C.C. et al. Glucose metabolism and insulin sensitivity in Gulf Coast Native and Suffolk ewes during late gestation and early lactation. *Small Ruminant Research*, v.54, p. 167–171, 2004.

WONG, K.M. et al. Metabolic aspects of bone resorption in calcium-deficient lactating rats. *Calcif Tissue Int.*, v. 32, p.213–9, 1980.

XIA, C. et al. Effect of Hypoglycemia on Performances, Metabolites, and Hormones in Periparturient Dairy Cows *Agricultural Sciences in China*,v.6(4), p.505-512, 2007.

YOUN, J. H. et al. Calcium stimulates glucose transport in skeletal muscle by a pathway independent of contraction. *American Journal of Physiology*. v. 260, p 555-561, 1991.

ZEMEL, M. B. et al. Regulation of adiposity by dietary calcium. *FASEB J.*, v.14 n.9, p. 1132–1138, 2000a.

ZEMEL, M.B.; et al. Regulation of adiposity by dietary calcium. *FASEB J.*, v.4, p.1132–1138, 2000b.

ZEMEL, M.B. Calcium modulation of hypertension and obesity: mechanisms and implications. *J Am Coll Nutr.*, v.20 Suppl. 5, p.428S–35S, 2001.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)