

AVALIAÇÃO DE MARCADORES ENERGÉTICOS EM OVINOS INDUZIDOS A HIPOCALCEMIA SUBCLÍNICA PÓS-PARTO

MONTAGNER, Paula¹; SILVEIRA, Isabella Dias Barbosa²; SCHMITT, Eduardo³; CORRÊA, Marcio Nunes⁴

¹ Residente em Medicina Veterinária – UFPel;

² Dr. Professor Adjunto – Departamento de Zootecnia;

³ PNPd - Veterinária UFPel;

⁴ Dr. Professor Adjunto – Departamento de Clínicas Veterinária – UFPel

DEL PINO, Francisco Augusto Burkert⁵

⁵ Dr. Professor Adjunto –, Departamento de Bioquímica - UFPel

Universidade Federal de Pelotas

Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC)

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

E-mail: nupeec@ufpel.edu.br - Tel: (53) 3275 7295

1 INTRODUÇÃO

O final da gestação e início da lactação em ruminantes é caracterizado por alta demanda energética, promovendo intensa mobilização de tecido adiposo da gestante, causando o aumento dos níveis de ácidos graxos não esterificados (AGNE) (VERNON, 1998). Os AGNEs no início da lactação garante a produção de energia do leite e auxilia no fornecimento de energia em diferentes tecidos, a fim de priorizar a utilização de glicose e aminoácidos para glândula mamária (CHILLIARD, 1999). Entretanto quando a mobilização de AGNEs seja muito intensa, há um incremento na produção de corpos cetônicos no fígado, desencadeando o quadro conhecido como cetose (LOOR et al., 2007)

Este período é caracterizado como balanço energético negativo, e juntamente com a hipocalcemia representam o aumento das perdas produtivas e mortalidade de ovinos durante o parto (MAVROGIANNI et al., 2008). Tanto em ovelhas, como em vacas leiteiras a hipocalcemia tem sido apontada como um fator responsável pela diminuição da ingestão de matéria seca e pela baixa motilidade do trato gastrointestinal (GOFF, 2006). 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 & HARMMEYER, 2003).

A indução de hipocalcemia através da infusão de EDTA é amplamente descrita na literatura, com seus primeiros ensaios na década de 60 (Smith & Brown 1963), vários teste *in vitro* e *in vivo* foram realizados. Observou-se que além da ação direta na glicose, a hipocalcemia demonstrou-se 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).

Com base nas informações fornecidas, a hipótese deste estudo é que a hipocalcemia subclínica provoca redução da produção de glicose endógena e diminuição da secreção de insulina, agravando o balanço energético negativo. Assim sendo, o objetivo foi avaliar os efeitos da hipocalcemia subclínica, ocasionada pela infusão de Na₂EDTA, em marcadores relacionados ao balanço energético em ovelhas durante cinco dias pós-parto.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

O experimento foi realizado no pavilhão de ovinos localizados nas dependências do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFPel. Foram utilizados durante o experimento 15 animais da espécie ovina (Ideal X Corriedale \pm 39), sendo estas fêmeas multíparas, todas híidas e encontrando-se no final da gestação. Durante o período de adaptação e do experimento os animais foram mantidos em semi-confinamento, recebendo diariamente feno, concentrado comercial (300g) e pastagem de *Pennisetum glaucum* (milheto), *ad libitum*, durante seis horas diárias.

Os animais foram sorteados ao acaso, sendo dividido em dois grupos, Grupo Normocalcêmicas (GN) com sete animais e Grupo Hipocalcêmicas (GH) com oito animais. A indução foi realizada entre 6 a 12 horas após o parto com solução de EDTA a 5%, com pH ajustado com cloreto de sódio. A solução foi injetada através de cateter intravenoso, na veia jugular externa, na concentração de 0,25mmol/kg/min. O GN não recebeu solução fisiológica, pois o volume a ser administrado seria muito pequeno.

Foi realizada coleta de sangue de todos os animais do GH, durante as horas de indução, para avaliação dos níveis de cálcio ionizado afim de serem mantidos no intervalo de 2,5 a 3,5 mg/dL, correspondente a níveis de hipocalcemia subclínica.

Foram realizadas coletas de sangue em todos os animais nos dias 1, 2, 3, 4 e 5, após o parto, através da venopunção da veia jugular, distribuindo o sangue em dois tubos. Um tubo contendo anticoagulante (EDTA) e inibidor da via glicolítica (Fluoreto de Potássio 12%) e o segundo tubo sem solução. Após a coleta o sangue foi submetido à centrifugação durante 15 minutos a 3000rpm para separação da série vermelha, obtendo assim o plasma (tubo com EDTA) e soro (tubo sem solução), sendo armazenado em eppendorffs identificados e mantidos resfriados a 4°C durante a realização das análises sanguíneas.

Os níveis de cálcio ionizado foram medidos com avaliador de pH Orion 290A+ ISE advanced pH/mVt (Thermo Fisher Scientific, United States), dotado de um eletrodo para Cálcio. Os níveis Cálcio Total e Glicose foram analisados por calorimetria utilizando Kits enzimáticos (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil) e para leitura o espectrofotômetro de luz visível (FEMTO® 700 Plus). Para determinação dos níveis plasmáticos de ácidos graxos não esterificados utilizou-se o Kit HR Series NEFA-HR (Wako Chemicals, USA).

A determinação dos níveis de insulina e BHBA foram realizadas nos dias 1, 2 e 3. A insulina foi determinada pelo método de eletroquimioluminescência, utilizando o Elecsys Systems 2010 e metodologia conforme descrita pelo fabricante do Kit Insulina (Roche). A determinação dos teores séricos de β -hidroxibutirato foi quantificada pelo método enzimático cinético através do kit comercial Ranbut (Randox), em leitor de placas.

As análises estatísticas foram realizadas através do programa SAS (1998). A análise dos dados foi realizada por análise de variância para medidas repetidas através do MIXED procedure, para avaliar efeito de grupo, período e suas interações.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A média dos níveis de cálcio ionizado para GN e GH durante o experimento foi de $4,39 \pm 0,15$ e $3,88 \pm 0,15$ mg/dL respectivamente ($P < 0,05$), sendo que apenas no dia um foi observada tendência ($P < 0,06$) de diferença entre tratamentos com média de $2,50 \pm 0,25$ mg/dL para GH e $3,86 \pm 0,27$ mg/dL para o GN. 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 GN e GH respectivamente. Apesar da rápida excreção pelos rins do complexo Ca e Na₂EDTA (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).

Os níveis médios de glicose foram de $53,83 \pm 3,97$ mg/dL e $52,51 \pm 3,59$ mg/dL para GN e GH respectivamente, sendo observada diferença apenas entre dias ($P < 0,04$), com maiores concentrações de glicose no dia 1. 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 aos tecidos periféricos e estimulando a gliconeogênese no tecido hepático (INGVARTSEN, 2000).

Os níveis de insulina não apresentaram diferença entre os grupos, isto demonstra que a indução de hipocalcemia com EDTA não foi suficiente para alterar o gradiente de concentração de cálcio nas células β pancreática.

Os níveis de β -hidorxibutirato mantiveram-se entre os limites considerados basais para o período 0,72-0,85 mmol/L (DURAK, 2006) não diferenciando entre os grupos e dias. 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). 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).

Os níveis AGNE não apresentaram diferença entre grupos, somente foi observado diferença para o dia 1 ($P < 0,03$). Em ambos os grupos foram observados altos níveis (GN $0,98 \pm 0,17$ mmol/L e GH $1,00 \pm 0,15$ mmol/L) evidenciando o balanço energético negativo (BEN) por quais estes acometidos.

4 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo demonstram que a hipocalcemia subclínica foi capaz de reduzir os níveis de cálcio total e ionizado, entretanto não modificou os marcadores energéticos e com isto influencia o balanço energético negativo no início da lactação de ovelhas.

5 REFERÊNCIAS

- 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.
- 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
- 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.
- 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.
- SCHLUMBOHM, C. and HARMEYER, J. Hypocalcemia reduces endogenous glucose production in hyperketonemic sheep. *J Dairy Sci.*, v. 86, p.1953–1962, 2003.
- VERNON, R.G. Homeorhesis. In *Yearbook*, [E Taylor, editor]. Ayr, Scotland: Hannah Research Institute, p. 64–73, 1998.