



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – CEO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITO METAFILÁTICO DO
CÁLCIO E DA DIETA
ANIÔNICA NA PREVENÇÃO
DA HIPOCALCEMIA
SUBCLÍNICA EM VACAS
LEITEIRAS**

KASSIO DUAN ALBANI

CHAPECÓ, 2018

KASSIO DUAN ALBANI

**EFEITO METAFILÁTICO DO CÁLCIO E DA DIETA ANIÔNICA
NA PREVENÇÃO DA HIPOCALCEMIA SUBCLÍNICA EM VACAS
LEITEIRAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração Ciência e Produção Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre em Zootecnia**

Orientador: Leandro Samia Lopes
Co-orientador: Aleksandro Schafer da Silva

Chapecó, SC, Brasil

2018

**Universidade do Estado de Santa Catarina
UDESC Oeste
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITO METAFILETICO DO CÁLCIO E DA DIETA ANIÔNICA
NA PREVENÇÃO DA HIPOCALCEMIA SUBCLINICA EM VACAS
LEITEIRAS**

Elaborada por
Kassio Duan Albani

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia

Comissão Examinadora:



Dr. Aleksandro Schafer da Silva (Presidente/Co-orientador) (UDESC)


Dr. Wagner Miranda Portes (EPAGRI)
Dra. Elizabeth Schwegler (IFC-Araquari)

Chapecó, 29 de junho de 2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida e pelas graças alcançadas ao longo da caminhada.

Agradeço meus pais, Isabel Lúcia Erthal Albani e Jair Albani, pelo apoio e por todo esforço que tiveram durante este período importantíssimo para minha carreira profissional. Ao meu irmão Vinícius Matheus Albani pelo companheirismo e amizade

De maneira especial quero agradecer minha adorada namorada Taiana Agnes Ramos, por acreditar e me apoiar na realização deste trabalho e por estar sempre ao meu lado, principalmente nos momentos mais difíceis.

Aos meus orientadores e exemplos de pesquisadores Dr. Aleksandro Schafer da Silva e Dr. Leandro Samia Lopes, pela orientação, amizade e incentivo na elaboração deste trabalho e pela abertura do Laboratório de Pesquisa e Parasitologia Animal e o Laboratório de Anatomia e Fisiologia Animal do Departamento de Zootecnia, Campus UDESC Oeste da Universidade do Estado de Santa Catarina.

Aos colegas de curso, graduandos e mestrandos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos proprietários da fazenda Allegro do Lago, Sr. Danilo Vanzin e fazenda Brancher, Sr. Gilberto Brancher e família por autorizar e seder o local para a realização dos projetos que resultaram em uma tese de mestrado e agradecer o conhecimento de prática adquirido.

A UDESC – Universidade do Estado de Santa Catarina e ao Campus UDESC Oeste pela oportunidade de estudar em uma universidade pública e de qualidade.

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

Muito Obrigado!!!

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade do Estado de Santa Catarina

EFEITO METAFILÁTICO DO CÁLCIO E DA DIETA ANIÔNICA NA PREVENÇÃO DA HIPOCALCEMIA SUBCLÍNICA EM VACAS LEITEIRAS

AUTOR: Kassio Duan Albani

ORIENTADOR: Dr. Leandro Samia Lopes
Chapecó, 29 de junho de 2018.

Várias são as enfermidades metabólicas que acometem vacas leiteiras, e entre elas a hipocalcemia, também conhecida como, febre do leite, paresia puerperal ou síndrome da vaca caída. A hipocalcemia pode acometer animais em até 72 horas após o parto, com maiores ocorrências em animais de alta produção de leite e principalmente com mais de duas lactações. Foram realizados dois experimentos no período de transição em vacas leiteiras em distintos locais, com o objetivo de avaliar possíveis formas de prevenir distúrbios metabólicos no pós-parto. No primeiro experimento, foram utilizadas 8 vacas leiteiras de segunda e terceira lactação da raça Holandesa no período de pré e pós-parto, onde receberam diferentes dietas antes do parto. O grupo controle (4 animais) recebeu uma dieta com diferença catio aniônica (DCAD) de 2,57 mEq/Kg enquanto que o grupo DCAD (4 animais) recebeu uma dieta com DCAD de -112,2 mEq/Kg. Foram avaliados os níveis séricos de cálcio, proteína total, albumina, colesterol, triglicerídeo, ureia, espécie reativa ao oxigênio (ROS), TBARS e das enzimas AST, ALT, GGT, nos dias 20, 10 e 5 pré-parto e 3, 7, 12 e 20 pós-parto. Dos tratamentos avaliados, o grupo DCAD negativo apresentou vantagens em relação ao cálcio, em que os animais tiveram maior capacidade de regulação da homeostase, onde ocorreu maior queda de cálcio antes do parto, mas após o parto a concentração de cálcio se manteve superior ao do grupo controle. Houve diferença significativa ($P<0,05$) entre os tratamentos para TBARS no 5º dia pré-parto, para colesterol e uréia no 3º dia pós parto e para ROS no 3º e 7º dia pós parto. No segundo experimento, foi avaliado a administração de cálcio subcutâneo no período pós-parto em vacas leiteiras em lactação. Foram utilizadas 20 vacas da raça Holandesa com uma, duas e três lactações, distribuídas homogeneousmente para cada grupo. 10 animais receberam uma dose de 150 mL de cálcio via subcutânea logo após o parto (2 horas) e 10 animais receberam apenas solução salina para efeito placebo de forma subcutânea (controle). As coletas de sangue foram realizadas nos dias 1 (parto) 2, 3, 7 e 10 após o parto. Foram avaliadas a incidência de hipocalcemia subclínica e clínica, proteínas totais, albumina, globulinas, glicose, colesterol e triglicerídeos. Também foram analisadas a composição (proteína, gordura, lactose e sólidos totais) do leite nos dias 5, 10 e 20 pós-parto. Quanto a composição do leite, houve aumento significativo ($P<0,05$) no dia 10 para lactose e dia 20 para gordura nos animais que receberam a suplementação com cálcio. Nos dias 3 e 10 pós-parto houve diferença significativa ($P<0,05$) de cálcio sérico no sangue dos animais que receberam cálcio. Concluiu-se que a utilização de dietas cátion aniônica negativa bem como a suplementação com cálcio injetável melhorou os parâmetros metabólicos de vacas leiteiras em lactação no período pós-parto.

Palavras-chave: Bovinocultura de leite, Metabolismo, Pré-parto

ABSTRACT

Master's Dissertation

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade do Estado de Santa Catarina

METAFILATIC EFFECT OF CALCIUM AND ANIOMIC DIET IN THE PREVENTION OF SUBCLINIC HYPOCALCEMIA IN DAIRY COWS

AUTHOR: Kassio Duan Albani

ADVISER: Leandro Samia Lopes

Chapecó, June, 29th, 2018

Several are the metabolic diseases that affect dairy cows, and among them there is hypocalcemia, also known as, milk fever, puerperal paresis or cow syndrome. Hypocalcaemia can affect animals within 72 hours after delivery, with higher occurrences in animals with high milk production and mainly with more than two lactations. Two experiments were carried out in the transition period in dairy cows in different locations, with the objective of evaluating possible ways to prevent metastatic disorders in the postpartum period. In the first experiment, eight dairy cows of the second and third lactation of the Holstein breed were used in the pre and postpartum period, where they received different diets before calving. The control group (4 animals) received a diet with anionic cation difference (DCAD) of 2.57 mEq / kg while the DCAD group (4 animals) received a diet with DCAD of -112.2 mEq / kg. The serum levels of calcium, total protein, albumin, cholesterol, triglyceride, urea, oxygen reactive species (ROS), TBARS and AST, ALT and GGT were evaluated on days 20, 10 and 5, 7,12 and 20 postpartum. Of the treatments evaluated, the DCAD negative group showed advantages in relation to calcium, in which the animals had a greater ability to regulate homeostasis, where there was a greater fall in calcium before delivery, but after childbirth the calcium concentration remained above the group control. There was a significant difference ($P <0.05$) between the treatments for TBARS in the 5th day prepartum, for cholesterol and urea on the 3rd day postpartum and for ROS on the 3rd and 7th day postpartum. In the second experiment, the administration of subcutaneous calcium in the postpartum period was evaluated in lactating dairy cows. Twenty Holstein cows with one, two and three lactations were used, equally distributed to each group. 10 animals received a 150mg dose of calcium via the subcutaneous tissue immediately after delivery (2 hours) and 10 animals received subcutaneous (control) saline for placebo. Blood samples were collected on days 1 (delivery) 2, 3, 7 and 10 after delivery. The incidence of subclinical and clinical hypocalcemia, total proteins, albumin, globulins, glucose, cholesterol and triglycerides were evaluated. The composition (protein, fat, lactose and total solids) of the milk was also analyzed on days 5, 10 and 20 postpartum. Regarding milk composition, there was a significant increase ($P <0.05$) at day 10 for lactose and day 20 for fat in the animals that received calcium supplementation. On days 3 and 10 postpartum there was a significant difference ($P <0.05$) of serum calcium in the animals receiving calcium. It was concluded that the use of negative anionic cation diets as well as injectable calcium supplementation improved the metabolic parameters of lactating dairy cows in the postpartum period.

Keywords: Dairy Cattle, Metabolism, Pre-calving

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	8
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	8
 1.1 DIETA COM RESTRIÇÃO DE CÁLCIO OU ANIÔNICA EM VACAS LEITEIRAS NO PRÉ-PARTO	8
1.1.1 Introdução	8
1.1.2 Metabolismo do cálcio.....	9
1.1.3 Hipocalcemia	10
1.1.3.1 Prevenção da hipocalcemia	11
Dietas deficientes em cálcio	11
Dietas com diferença cátio-aniônica (DCAD).....	12
1.1.3.2 Tratamento da hipocalcemia.....	17
 1.2 ESTRESSE OXIDATIVO E DISTÚRBIOS METABÓLICOS	18
1.3. OBJETIVOS	22
1.3.1. <i>Objetivo geral</i>	22
1.3.2. <i>Objetivo específico</i>	22
CAPÍTULO II.....	23
2. ARTIGO I E MANUSCRITO I.....	23
2.1 Artigo I	24
2.2. Manuscrito I.....	43
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXO I	71
ANEXO II.....	72
ANEXO III.....	73
ANEXO IV.....	74

CAPÍTULO I

1. REVISÃO DE LITERATURA

A seção revisão bibliográfica foi dividida em duas partes, sendo que a primeira apresenta um artigo de revisão publicado na revista Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR no ano de 2017 (Anexo I); assim como descrição de uma seção bibliográfica sobre estresse oxidativo e distúrbios metabólicos.

1.1 DIETA COM RESTRIÇÃO DE CÁLCIO OU ANIÔNICA EM VACAS LEITEIRAS NO PRÉ-PARTO

1.1.1 Introdução

O ciclo anual da vaca leiteira considera que o período de transição é o momento mais difícil para o animal, pois esta fase determina a próxima lactação, em se tratando de saúde, produção e reprodução (KEADY et al., 2001). O manejo e a nutrição de vacas leiteiras durante o período de transição (três semanas pré-parto e três semanas pós-parto) deve receber atenção, pois neste período a vaca tem alta sensibilidade, devido várias mudanças endócrinas e metabólicas, e passa a ter grande influência na produção, reprodução e sanidade dos animais, especialmente nas primeiras semanas pós-parto, que pode refletir em perdas econômicas durante a lactação (SANTOS, 2011).

A produção de colostro e o início da lactação impõe a vaca a uma grande demanda por cálcio (Ca), podendo ocasionar, caso o animal não se adapte, a algum distúrbio metabólico como a hipocalcemia, que é ocasionada justamente pelo alto desequilíbrio na regulação da concentração de Ca no sangue após o parto. A concentração sanguínea de Ca é dependente do consumo e absorção intestinal, e também pela reabsorção de cálcio do tecido ósseo, sendo que todos estes processos são regulados pelo paratormônio (PTH), calcitonina e vitamina D (SOARES et al., 2001).

Para evitar os baixos níveis de cálcio no sangue, têm sido utilizados dois métodos nutricionais: dietas deficientes em Ca e dieta aniônica, que dispõe de diferença cátio-aniônica (DCAD) negativa nos últimos dias de gestação (três semanas antes do parto), ou seja, as altas concentrações de aníons na dieta, tornam-a deficiente em cálcio, e assim ativam os mecanismos de regulação da homeostase (SANTOS, 2011).

O objetivo desta revisão é destacar e discutir os efeitos da dieta aniônica no período final de gestação das vacas leiteiras e sua relação com o distúrbio metabólico-nutricional que leva a ocorrência da hipocalcemia.

1.1.2 Metabolismo do cálcio

O mineral mais abundante no corpo é o Ca, pois está distribuído nos tecidos extracelulares, mas sua maior concentração (aproximadamente 98%) está na composição dos dentes e ossos (integridade estrutural do esqueleto). Várias são as funções do Ca, entre elas: coagulação sanguínea, permeabilidade celular, contração muscular, transmissão dos impulsos nervosos, regulação cardíaca, secreção de certos hormônios e ativação enzimática (SANTOS, 2011). Além destas funções, o Ca tem um papel importante nos ossos, em manter reservas para promover a homeostase, ou seja, regular a concentração de Ca sanguínea (PEACOCK, 2010).

Em um primeiro momento, a regulação da homeostase do cálcio sanguíneo, quando houver uma leve variação, é regulada pelo cálcio absorvido no intestino e pelo cálcio permutável, sem a ação do paratormônio (PTH) e calcitonina (CT). Este Ca permutável se encontra nos ossos como sais, principalmente como fosfato bicálcico (CaHPO_4) (SANTOS, 2011). Quando ocorrer uma variação maior na concentração de cálcio sanguínea, como ocorre após o parto, devido à produção de colostro e assim aumento nas exigências de Ca (PEACOCK, 2010), somente a absorção de Ca do intestino não é capaz de suprir toda exigência, desta forma a glândula da paratireoide secreta PTH que atua nas células renais para estimular a síntese de $1,25\text{-}(\text{OH})_2\text{colecalciferol}$ (vitamina D₃ ativa) e assim aumentar a reabsorção intestinal e a reabsorção renal de Ca. Além disso, o PTH comunica-se com os osteoclastos no tecido ósseo, para que haja liberação de minerais como o Ca (GOFF, 2014).

No momento em que a homeostase do cálcio sanguíneo for atingida, ou ocorrer a estabilização da concentração de cálcio no sangue, a síntese de PTH é inibida. Após isso, a calcitonina é sintetizada e assim ocorre aumento na excreção renal de Ca, o que reduz a reabsorção de cálcio renal e assim aumenta as perdas de cálcio na urina, e evita-se a hipercalcemia. Portanto, o PTH e a CT trabalham em conjunto, mas de maneira opostas, para manter as concentrações de cálcio dentro dos limites fisiológicos (SANTOS, 2011).

1.1.3 Hipocalcemia

A hipocalcemia, também conhecida como febre do leite, paresia puerperal ou síndrome da vaca caída ocorre devido a uma falha no metabolismo de Ca, associados a uma drástica queda nos níveis sanguíneos desse mineral durante o peri-parto, geralmente no início da lactação. A maior casuística ocorre em animais de alta produção de leite, sendo as vacas leiteiras a partir da segunda lactação, as mais susceptíveis e entre 12 e 24 horas após o parto, mas pode ocorrer também até 72 horas após o parto (SANTOS, 2011). Com o início da lactação, ocorre um elevado fluxo de Ca para a glândula mamária, elevando drasticamente sua exigência de Ca. A concentração de Ca no colostro (53 – 60 mg/dL) é quase duas vezes superior que no leite, portanto, uma vaca que produz 10kg de colostro na sua primeira ordenha, teria a sua exigência de Ca aumentada de 20 g/dia para cerca de 43g/dia (SANTOS & SANTOS, 1998), ponto esse, que deve ser considerado quando definido o manejo no período de transição.

A hipocalcemia se apresenta de duas formas, isto é, forma clínica (quando níveis de cálcio sanguíneo é menor que 5 mg/dL) e subclínica (níveis de cálcio sanguíneo entre 5,1 – 7,9 mg/dL). Apesar dos sinais clínicos serem um grande problema em vacas de leite, a doença subclínica é a que causa maiores danos e prejuízos, pois estes animais ingerem menor quantidade de matéria seca (MS) e ficam mais propensas a desenvolver síndrome da vaca caída, retenção de placenta, prolapo de útero, deslocamento de abomaso, mau desempenho reprodutivo e mastite (MARTINEZ et al., 2012). Além destes distúrbios, a hipocalcemia reduz a capacidade das células do sistema imunológico em responder a algum estímulo (KIMURA et al., 2002; GALVÃO et al., 2010), e assim, aumenta as chances de ocorrer alguma infecção como mastite. Os sinais clínicos da hipocalcemia podem também ser separados em três estágios citados a seguir, sendo que a cada estágio a doença terá uma severidade.

De acordo com Aiello & Mays (2001) e Jacques (2011), no primeiro estágio ocorre uma hipersensibilidade dos nervos condutores e dos músculos, que causa tremores musculares, excitação, anorexia e debilidade em geral. Em consequência disso, o animal tem ataxia e quedas facilmente, assim evita andar e se alimentar, também pode haver movimentos ligeiros da cabeça, protrusão da língua e ranger de dentes, assim como a temperatura corporal se mantém normal ou levemente acima do normal (38,3 a 38,6°C). Cabe ressaltar, que animais afetados podem ficar neste estágio por horas. No segundo estágio, a doença se caracteriza por prostração, apatia e decúbito esternal, geralmente com a cabeça voltada para o flanco. Nesta fase o animal é incapaz de

levantar-se, perde-se a sensibilidade, além disso, a pele e as extremidades se encontram frias e a narina seca, a temperatura corporal pode oscilar entre 36,0 a 38,0°C e os batimentos cardíacos aumentarem (de 50-60 para 80 bpm) (AIELLO & MAYS, 2001; JACQUES, 2011). Além dessas alterações clínicas, pode ocorrer relaxamento do esfíncter e perda do reflexo anal e paralisão dos movimentos ruminais, o que pode consequentemente levar o animal ao timpanismo. Já o terceiro estágio é o mais severo, pois existe um avançado distúrbio da hipocalcemia, onde a vaca está em estado de coma e com flacidez completa dos membros. Além disso, a frequência cardíaca do animal é acelerada e irregular (pode chegar a 120 bpm), a pulsação é de baixa percepção, a temperatura corporal fica em torno de 38,5°C, assim como a frequência respiratória reduz (AIELLO & MAYS, 2001; JACQUES, 2011). Se não for tratado, o animal pode vir ao óbito devido a choque em um estado de colapso total ou por pneumonia por aspiração.

1.1.3.1 Prevenção da hipocalcemia

A prevenção da hipocalcemia está baseada em um bom manejo nutricional no pré-parto, tendo em vista que o manejo, o ambiente, a sanidade e a redução do estresse dos animais, também fazem parte da prevenção de possíveis problemas após o parto. Devido a importância de manejos nutricionais antes do parto, destacaremos aqui duas metodologias mais utilizadas.

Dietas deficientes em cálcio

Dietas deficientes em cálcio, que resultam em balanço negativo, têm o objetivo de reduzir a concentração de Ca no sangue para estimular a secreção de PTH. Essas dietas devem ser fornecidas para as vacas no pré-parto, em uma dose inferior a 20 g/dia de Ca absorvível. De acordo com DE-PAULA (2009), uma queda em média de 10% nos níveis circulantes de Ca, aumenta em 200% a 300% a secreção de PTH.

O PTH tem um papel muito importante na regulação da homeostase, onde estimula a reabsorção óssea por ativação dos osteoclastos. Além disso, a absorção intestinal de Ca é ativada em razão da síntese de Vitamina D, estimulada também pelo PTH. Desta forma, a vaca após iniciar a lactação e consumir uma dieta com alta concentração em Ca, não só o mecanismo de reabsorção óssea, mas também a

capacidade dos enterócitos em absorver Ca devem estar ativos, para evitar ou minimizar a hipocalcemia (KICHURA, 1982; SANTOS, 2011).

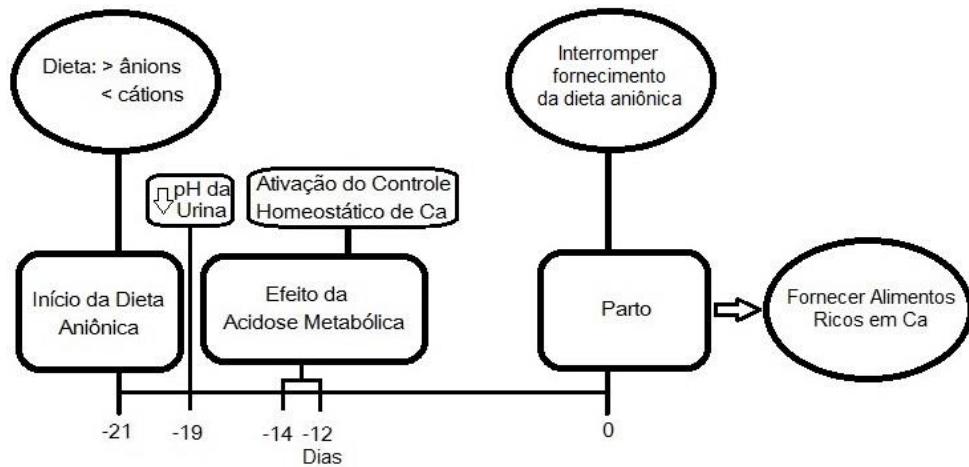
Para reduzir a concentração de cálcio na dieta, podemos fornecer primeiramente alimentos com menor concentração de Ca, como por exemplo, reduzir o consumo de pastagens, pois esse alimento apresenta níveis relativamente altos deste mineral (SANTOS, 2011). Recentemente tem se estudado uma forma de sequestrar Ca da dieta e restringir sua absorção, já que isso é possível através da adição de substâncias como zeolita (partícula de alumínio silicato), e dessa forma não ocorre a absorção de Ca e esse é eliminado nas fezes. No entanto, seria necessário utilizar grandes quantidades de zeolita (0,5 kg/dia), e consequentemente isso pode causar efeitos negativos sobre a absorção de outros minerais (OETZEL et al., 2012).

Dietas com diferença cátio-aniônica (DCAD)

Existem várias formas para prevenir a hipocalcemia em vacas no pós-parto, mas a maneira que mais tem mostrado resultados positivos na prática são as dietas aniônicas no pré-parto, tendo em vista que um ambiente ideal para as vacas reduzem o estresse, minimizando as chances de ocorrer algum distúrbio metabólico após o parto. Essas dietas baseiam-se no aumento das concentrações de cloro e enxofre, e redução do sódio e potássio nas últimas três semanas de gestação, assim prevenindo a ocorrência de hipocacemias em vacas após o parto que ocorra hipocalcemia após o parto de acordo com Soares et al. (2001).

A DCAD é utilizada na nutrição de vacas leiteiras durante as últimas semanas de gestação ou período seco (Figura 1). Em função de alterar o metabolismo de Ca, pois ocasiona uma pequena deficiência em Ca, aumenta a capacidade de respostas dos tecidos aos estímulos de PTH, na qual eleva a excreção urinária e mobilização óssea, e portanto, dietas com DCAD negativo, deve ser suplementadas com cálcio (OBA et al., 2011).

FIGURA 1. Esquematização do período de pré-parto, quando é fornecido uma dieta aniônica para vacas, assim como eventos fisiológicos que podem ocorrer nesse período com o animal (Adaptado de Santos (2011)).



Os eletrólitos da dieta são classificados como ânions (carga negativa), e cátion, (carga positiva). Os cátions mais importantes da dieta são: Ca, magnésio (Mg), sódio (Na) e potássio (K). Já os ânions mais importantes são: fósforo (P), cloro (Cl) e enxofre (S). Qualquer mineral com carga positiva ou negativa pode afetar no balanço cátio-aniônico, mas os minerais com maior concentração de cargas em mEq, tem maior influência (Tabela 1). Cabe ressaltar que a grande atenção dada ao balanço de íons na dieta de vacas pré e pós-parto é devido a sua influência nos níveis séricos de Ca e desempenho animal (GOFF, 2014).

TABELA 1. Conversão da porcentagem do elemento na matéria seca da dieta para mEq/kg de MS da dieta.

Elemento	Peso Atômico (g)	Valênci (carga)	Peso Equivalente (g)	Fator de Conversão % para mEq/kg
Na ⁺	23,0	1(+)	13,0	435
K ⁺	39,1	1(+)	39,1	256
Cl ⁻	35,5	1(-)	35,5	282
S ⁻²	32,1	2(-)	16,05	623

Na⁺= Sódio, K⁺= Potássio, Cl⁻= Cloro, S⁻²= Enxofre

Fonte: Adaptado de Santos & Santos (1998)

Devido ao potássio ser um cátion de grande absorção pelo animal e assim ter grande influência na diferença cátio-aniônica da dieta, Goff et al., (2004) avaliaram os efeitos da adição de potássio em diferentes níveis de Ca para vacas no pré-parto e verificaram que com a adição de cátions na dieta, houve aumento no pH sanguíneo e pH da urina, e aumento no número de vacas com hipocalcemia após o parto. Os autores observaram também que a reabsorção de Ca dos ossos foi inibida e mencionaram que o Ca não é o principal fator para a prevenção de possíveis problemas pós-parto.

A DCAD é calculado em miliequivalentes por quilograma (mEq/Kg) de matéria seca, e pode ser calculado de várias maneiras, mas a mais comum é calculada de acordo com a fórmula: $DCAD(mEq/kg) = \{(Sódio + Potássio) - (Cloro + Enxofre)\}$, ou seja, $DCAD(mEq/kg) = \{(Na^+ + K^+) - (Cl^- + S^{2-})\}$. Esta fórmula demonstra que a absorção de Na, K, Cl e S é igual, porém isto não acontece. Entretanto quando utilizada para o cálculo do DCAD tem demonstrado resultados satisfatórios em relação a prevenção da hipocalcemia clínica ou subclínica. Uma outra forma que poderia ser utilizada para calcular o DCAD é: $DCAD(mEq/kg) = \{(Na^+ + K^+) - (Cl^- + 0,6S^{2-})\}$. Nesta forma de calcular deve-se incluir um fator de 0,6 ao S, devido a sua menor digestibilidade em relação a outros “íons fortes”. Teoricamente, está equação é mais precisa, mas como é relativamente nova, tem sido pouco utilizada. Para a resolução das fórmulas, determinase a quantidade de cada elemento da dieta em percentagem (%) e assim transforma-se para mEq/kg. Para isso pode-se utilizar o fator de conversão demonstrado na Tabela 1, ou determinar a contribuição de cada elemento em mEq por kg da MS da dieta (SANTOS, 2011).

Segundo Santos & Santos (1998), a diferença na absorção de mEq de cátions e ânions vai determinar o pH dos fluidos corporais, pois as células tendem a manter a eletroneutralidade, onde uma maior absorção de mEq positivos ou mEq de cátions aumenta a retenção de HCO_3^- , e consequentemente aumenta o pH sanguíneo. Quando há uma maior absorção de mEq negativo ou mEq de ânions ocorre um aumento de retenção de H^+ , e reduz assim o pH sanguíneo e consequentemente pode ocasionar uma leve acidose metabólica. Esta acidose faz com que reduza a refratividade do tecido ósseo e dos rins ao PTH, resultando num aumento na taxa de reabsorção osteoclástica de Ca do tecido ósseo e aumento nos níveis séricos de 1,25 dihydroxyvitamina D₃[1,25(OH)₂Vitamina D₃] (GOFF, 2014).

A dieta aniônica fornecida no pré-parto tem uma ótima eficiência quando o DCAD esta entre -150 a -100 mEq/kg de MS, utilizando a equação com coeficiente igual

para todos os minerais, já quando se utiliza a equação com coeficiente 0,6 para S, o DCAD de maior eficiência é -50 a 0 mEq/kg de MS (SANTOS, 2011). Para atingir estes valores, pode-se utilizar sais iônicos como cloreto de cálcio, cloreto de amônia, sulfato de amônia, sulfato de cálcio e sulfato de magnésio (BEEDE, 1992). Estes sais geralmente têm baixa palatabilidade, por tanto, a adição destes deve ser mínima possível para evitar altas quedas na ingestão de MS, isso porque a vaca no final de gestação já tem uma redução natural do CMS.

Importante ressaltar que antes de balancear uma dieta aniônica, deve-se escolher os alimentos, e estes devem ser de baixa concentração em mEq, principalmente dos cátions já citados, pois assim fica mais fácil de corrigir a dieta. Por outro lado, uma alta carga em mEq na dieta faz necessária o uso de alta quantidade de ânions para balancear, mas muitas vezes isto não é possível, por limitar a absorção de outros minerais. A utilização de S em excesso, ou seja, acima de 0,46% na dieta total, reduz o consumo, e pode diminuir assim o potencial produtivo do animal (NRC, 2001) e essa redução do CMS não é um efeito desejável nessa fase de transição.

Os efeitos da dieta aniônica ocorrem em 48 horas após o início de seu fornecimento. No entanto, acredita-se que seja necessário de cinco a sete dias para manifestação da acidose metabólica sobre o mecanismo de controle homeostático de Ca (SANTOS, 2011). Devido os sais alterarem o pH urinário, pode-se controlar a quantidade de ânions fornecida aos animais avaliando esse parâmetro. Vários estudos e meta-análises demonstram correlação negativa entre DCAD e pH da urina e sangue (CHARBONNEAU et al., 2006; LEAN et al., 2006; HU 2007). O ideal para vacas é pH entre 5,8 a 6,2 para a raça Jersey (MELENDEZ & RISCO, 2005) e 6,0 a 6,5 para a raça holandesa (MELENDEZ & RISCO, 2005; OETZEL 2003), portanto se estiver acima de 7,0, indica que a quantidade de aníons não atingiu o efeito desejado, assim como se o pH ficar a baixo de 5,0 pode ocorrer uma acidose metabólica mais acentuada (SANTOS, 2011).

Charbonneau et al, (2006), encontrou resultados que contradizem, na qual indica que redução do pH da urina para 7, já é suficiente para prevenir a incidência de hipocalcemia, e o fornecimento de dieta com redução acentuada de DCAD (-150 mEq/kg) e assim gerar possíveis riscos ao nível de ingestão de MS.

Em estudo realizado por Leite et al. (2003), utilizando 21 vacas separadas em três tratamentos de diferentes DCAD: 1 (+122,1 mEq/kg de MS), 2 (-8,8 mEq/kg de MS) e 3 (-110,4 mEq/kg de MS) com dietas de: 1 (Cl 0,33% e S 0,25%), 2 (Cl 0,52% e

S 0,37%) e 3 (Cl 0,83% e S 0,39%), a concentração de Ca na MS da dieta foi de 0,67, 0,68 e 0,69, respectivamente. Os outros minerais tiveram as mesmas concentrações para os três tratamentos. Cabe ressaltar, que segundo os autores as dietas foram fornecidas por quatro semanas antes do parto, e foi observado redução no pH urinário, mas sem diferença significativa em relação a concentração de Ca iônico e total, assim como a utilização do sal aniônico não impediu a ocorrência de hipocalcemia subclínica, resultado este inesperado.

Vacas leiteiras submetidas a três diferentes dietas de pastejo de aveia (1), azevém (2), aveia e azevém (mistos) e silagem de milho (3) no período de 30 dias antes do parto foram avaliadas e houve diagnóstico de hipocalcemia clínica nos animais alimentados com aveia e/ou azevém, no entanto as vacas que ingeriram aveia, azevém e silagem de milho não tiveram calcemia, fosfatemia ou a magnesemia, assim concluindo que a utilização de única ou principal fonte de volumoso parece fator desencadeante da hipocalcemia, podendo estar relacionado com o excesso de cátions ingeridos (CONEGLIAN et al., 2014). Outro estudo realizado por Moore et al. (2000) em fazendas comerciais nos EUA, demonstraram que 70% das vacas avaliadas a partir da segunda lactação sofreram hipocalcemia no momento do parto, mas em apenas 8% apresentaram sinais clínicos visíveis. Para reduzir retenção de placenta nas vacas após o parto, Jordan e Stokes (2000), utilizaram dieta pré-parto com DCAD – 3,3 mEq/kg de MS, e -20,2 mEq/kg de MS, a diferença destas duas dietas é maior concentração de cloro (1,07%) e enxofre (0,56%). O fornecimento da dieta com DCAD -20,2 mEq/kg de MS para as vacas no pré-parto reduziu-se os casos de retenção de placenta, de 16 para 4%.

Em outro estudo, Setti et al. (1998) utilizaram dois tratamentos com diferentes DCAD: (1) DCAD de -272 mEq/kg de MS e (2) DCAD de +12 mEq/kg de MS. Além do concentrado, os animais receberam volumoso de capim elefante (*Pennisetum purpureum*) e silagem de milho (*Zea mays*), totalizando DCAD de (tratamento 1) +90 mEq/kg de MS; e (tratamento 2) +180 mEq/kg de MS. Cabe ressaltar que no estudo de Setti et al. (1998) as vacas usadas foram da raça holandesas que estavam na segunda ou terceira lactação, com produção acima de 6000 kg de leite por lactação. Por dia, cada animal do tratamento 1 consumia em média 85 g de Ca e o tratamento 2 consumia em média 72g de Ca. Os autores citaram que o simples fornecimento de concentrado aniônico não garantiu balanço cátio-anônico, pois depende do volumoso utilizado. Os autores também mencionaram que não houve diferenças nas concentrações de Ca, P e

Mg no plasma sanguíneo e não teve diferença significativa para retorno ao cio e produção de leite entre os tratamentos, assim como não foi detectado incidência de hipocalcemia nos animais para ambos tratamentos. Ortolani (1995), ao trabalhar com um único rebanho, obtiveram resultado de 4,25% de animais afetados por distúrbios pós-parto, junto a isso observou que vacas com menos de três lactações tiveram menor chance de ocorrer hipocalcemia.

Greghi et al. (2014) avaliaram o fornecimento de dieta aniônica em vacas holandesa no pré-parto, em que um grupo de animais (controle) recebeu DCAD positivo (46,38mEq/kg de MS), sem adição de suplemento mineral aniônico e o segundo grupo que recebeu DCAD negativo (-249,28mEq/kg de MS), com adição de suplemento mineral aniônico. Esses animais receberam diariamente 4 kg de concentrado e 20 kg de cana-de-açúcar, mas mesmo assim o pH sanguíneo e urinário não reduziu, o que não ocasionou uma leve acidose metabólica que seria desejável. A ocorrência de hipocalcemia subclínica em ambos os grupos mostrou que a adição de sal aniônico não impedi sua ocorrência, mas reduziu o número de animais com retenção de placenta, na qual tiveram 6 casos no grupo controle e apenas 2 no grupo que recebeu DCAD com adição de suplementos. Além disso, a concentração de selênio no sangue desses animais foi maior, mineral com diversas propriedade benéficas a saúde e, portanto, pode estar relacionado a menor número de casos de retenção de placenta.

Além de prevenir distúrbios pós-parto, o fornecimento de dieta aniônica pode aumentar o consumo pós-parto, minimizando o balanço energético negativo, e assim aumenta a produção de leite, sem afetar negativamente o desempenho animal (BLOCK, 1984; DE GROOT et al., 2010).

1.1.3.2 Tratamento da hipocalcemia

O tratamento para hipocalcemia é efetivo, sendo a administração endovenosa de Ca a terapia mais usada. Este deve ser fornecido vagarosamente, para não ocasionar hipercalcemia no animal e consequentemente parada cardíaca e morte súbita (GOFF, 2008). A aplicação da solução leva a uma rápida recuperação do animal, restabelecendo as concentrações de Ca por 3 a 4 horas, o que é na maioria dos casos suficiente para a sobrevivência da vaca. Caso contrário, uma nova administração de Ca deve ser feita, entre 6 a 8 horas após a primeira aplicação (SANTOS, 2011).

Quando observado hipocalcemia no animal, este deve ser tratado o mais rápido possível. Quando o animal está em decúbito, seu peso pode estar pressionando os

órgãos do lado oposto, podendo ocasionar síndrome do esmagamento, e consequentemente síndrome da vaca caída se não tratado, devido isquemia dos músculos e nervos e assim necrose dos tecidos (GOFF, 2008), portanto recomenda-se movimentar a vaca.

Outra forma para administrar sais de cálcio é por via subcutânea, a absorção é lenta, reduzindo assim as chances de ocorrer hipercalcemia, mas não prolonga o período de restabelecimento das concentrações sanguíneas de cálcio. Para prolongar o restabelecimento de cálcio no sangue, pode ser feito administração oral de cálcio, como cloreto de cálcio ou propionato de cálcio, juntamente com a administração endovenosa, devendo tomar cuidados com excesso de fornecimento de cálcio oral, acima de 250 g na forma de propionato de Ca, pois pode causar intoxicação, e também pode vir a ocorrer hipercalcemia no animal (SANTOS, 2011). O tratamento endovenoso com borogluconato de cálcio deve ser realizado lentamente a uma dose de 100 a 200g, com concentração de 20% de cálcio (RADOTITS, 2002). Já o cloreto de cálcio tem sua vantagem quando administrado via oral, pois ocasiona acidose metabólica o que é benéfica para a atividade do PTH, portanto, sua quantidade deve ser limitada para evitar acidose metabólica não compensável.

1.2 ESTRESSE OXIDATIVO E DISTÚRBIOS METABÓLICOS

Nutrição no período de transição é foco de muitos estudos. Sabendo que o período periparto é especialmente crítico para a saúde e subsequente desempenho das vacas leiteiras (BURHANS et al., 2003), sendo que neste período os animais são mais susceptíveis a doenças infecciosas comparado com o pico de lactação (SORDILLO et al., 2007). Devido a fatores fisiológicos e ambientais durante o período de transição, os mecanismos de defesa do animal podem ser comprometidos, como é o exemplo dos estresses fisiológicos associados à rápida diferenciação do parênquima secretório, crescimento intenso da glândula mamária e o início da síntese e secreção de leite, acompanhados por alta demanda de energia e aumento na necessidade de oxigênio (GITTO et al., 2002). Com o aumento de oxigênio, aumenta-se também a produção de reagentes derivados do oxigênio, ou seja, espécies reativas de oxigênio (ERO's).

A produção excessiva de radicais livres e danos nos níveis celulares e teciduais são controladas por antioxidantes celulares, que são qualquer substância que atrasa, impede ou elimina o dano oxidativo a uma molécula alvo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Quando EROs são produzidos mais rapidamente do que

podem ser neutralizadas por mecanismos antioxidantes, resulta em estresse oxidativo (LEMOS, 2015). Desta forma, um desequilíbrio de produção e defesa de EROS próximo ao parto, aumenta o estresse oxidativo e pode contribuir para distúrbios metabólicos após o parto em vacas leiteiras (WALLER, 2000; GITTO et al., 2002), o que contribui para aumentar a suscetibilidade à doenças (Sordillo, 2005), uma vez que as demandas metabólicas associadas com o final da prenhez, parto e início da lactação seria esperado para aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio, resultando em estresse oxidativo (LEMOS, 2015). Além da diminuição do consumo de ração e do nível plasmático de importantes antioxidantes, aumento da demanda de minerais e vitaminas durante a prenhez, principalmente mais avançada onde ocorre maior drenagem para o colostro. O estresse devido ao parto tem tido papel importante nesse desequilíbrio (LEMOS, 2015).

Glicose em níveis baixos, proveniente do trato alimentar em ruminantes, entra na corrente sanguínea, e o fígado por meio de moléculas precursoras da via gliconeolítica é responsável pela sua síntese (GONZÁLEZ, 2000). As baixas concentrações dos níveis de glicose na corrente sanguínea após o parto favorecem ao estresse oxidativo (ABUELO et al., 2014). De todo o corpo, 85% da glicose é dirigida para a glândula mamária para a síntese e secreção do leite (SORDILLO e AITKEN, 2009), ocasionando então resistência tecidual nos animais (DE KOSTER e OPSOMER, 2013). Durante o período de transição e início da lactação, o fluxo de glicose, de zero vai a ligeiramente negativo, havendo aumento de 267 % na produção total de glicose a partir de 9 dias antes do parto até 21 dias após o parto (REYNOLDS et al., 2003). A liberação de glicose para a corrente sanguínea é estimulada pelo cortisol, que é o principal hormônio glicocorticoide do metabolismo, relacionado ao estresse. Em estudo de Paiva et al. (2006) e Hydbring et al. (1999) houve aumento de cortisol no momento do parto em vacas holandesas, e após 24 horas do parto os níveis retornaram aos valores registrados antes do parto. Este aumento de cortisol no momento do parto é considerado normal, visto que o parto é um evento natural, que envolve estresse e dor para as mães (HYDBRING et al., 1999).

Durante o início da lactação, a vaca passa por várias adaptações metabólicas, e alguns desses eventos fisiológicos podem afetar negativamente a saúde das mesmas (SORDILLO e AITKEN., 2009). Uma das consequências importantes do estresse oxidativo seria a peroxidação lipídica (KUMARAGURUPARAN et al., 2002), onde os lipídios são os mais suscetíveis a danos peroxidativos devido a energia necessária para

este processo (BALASINSKA, 2004). Para identificar esta peroxidação lipídica em bovinos, valores de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) podem e são muito utilizados em trabalhos relacionados. Estes perfis metabólicos associados ao status oxidativo são uma ferramenta útil para monitorar a saúde e o status reprodutivo em vacas durante o período de transição (TURK et al., 2008).

Logo após o parto, as vacas entram em um período de balanço energético negativo, proporcional a sua produção de leite (CASTILHO et al., 2005) A adaptação, a este período, envolve a mobilização de reservas corpóreas, alterando parâmetros de avaliação corporal e parâmetros lipídicos séricos, como a elevação do colesterol e redução de triglicerídeos e escore de condição corporal após o parto (BERNABUCCI et al., 2005; TURK et al., 2013). Triglycerídeos no soro tem maior concentração no pré-parto e níveis mais baixos no início da lactação (TURK et al., 2013). Estas alterações são atribuídas ao acúmulo de triglycerídeos no fígado (BREMNER et al., 2000) e o uso do mesmo na glândula mamária para a síntese e secreção de gordura no leite (BERNARD et al., 2008). O escore de condição corporal é caracterizado pela mobilização lipídica para suprir a demanda energética requerida no final da gestação e inicio da lactação, assim sendo o estado de balanço energético negativo (BEN), geralmente ocorrido após o parto (TURK et al., 2008).

A cetose subclínica ($BHB < 1,2$ a $1,4$ mmol/L) nas primeiras semanas pós-parto é associada em 3 a 8 vezes ao aumento da possibilidade de ocorrer deslocamento de abomaso, 3 vezes mais metrite, 4 a 6 vezes mais cetose clínica, aumento da ocorrência de endometrite, prolongamento do anestro, aumento na gravidade das mastites e menor produção de leite no início da lactação (LEBLANC, 2010). Leblanc (2010) também destaca a redução da função imune entre os 15 dias pré-parto e a terceira semana pós-parto, favorecendo a ocorrência de infecção bacteriana uterina e outras doenças. Estes aliados a mudanças dramáticas nas concentrações de progesterona, estrógenos e cortisol circulantes, contribuem na redução da função imune, especialmente de neutrófilos, na qual são as principais formas de defesa do útero, sendo que menor migração destas, associadas à atividade fagocitária e oxidativa, aumenta as possíveis chances de ocorrência de retenção de placenta, metrite e endometrite. Também destacamos a incidência de mastite (Svendsen, 2007), retenção de placenta (SORDILLO e AITKEN, 2009) e até mesmo problemas de casco (ZHAO et al., 2015) pelo fato de estarem ligados ao estresse oxidativo.

Portanto, a fase de transição de gestante para lactante envolve uma serie de eventos metabólicos, naturais, mas que exigem boa nutrição. Comumente em fazendas de vacas de alta produção, a aplicação de cálcio subcutâneo tem sido uma medida usada para reduzir hipocalcemia. Desta forma, nossa pesquisa está diretamente relacionada aos efeitos metáfilaticos no cálcio.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo geral

Avaliar diferentes formas de se prevenir a hipocalcemia e suas consequências no metabolismo após o parto em vacas de leite.

1.3.2. Objetivo específico

Avaliar efeitos de duas dietas com diferentes DCAD sobre a prevenção da hipocacemias;

Avaliar se a aplicação subcutânea de cálcio 2 horas após o parto tem efeitos benéficos a saúde das vacas, e consequentemente sobre composição do leite;

Avaliar o efeito dos dois métodos de prevenção de hipocalcemia afetam o metabolismo proteico e lipídico, bem como sobre os níveis de cálcio sanguíneo no pós-parto.

CAPÍTULO II

2. ARTIGO I E MANUSCRITO I

Os resultados desta dissertação são apresentados na forma de um artigo científico e um manuscrito, com sua formatação de acordo com as orientações das revistas:

2.1 Artigo I

Benefits of a Prepartum Anionic Diet on the Health of Dairy Cows in the Transition Period: Prevented Subclinical Hypocalcemia and Minimizing Oxidative Stress

Autores: Kassio Duan Albani, Aleksandro Schafer Da Silva, Gustavo Machado, Nathieli Bottari Bottari, Mariana Sauzen Alves, Gabriela Campigotto, Alexandre Fritzen, Maria Rosa Chitolina Schetinger, Vera Maria Morsch, Roberto Zaboot & Leandro Samia Lopes

De acordo com normas da revista Acta Scientiae Veterinarie

Publicado em 2017 (Anexo II)

Benefits of a Prepartum Anionic Diet on the Health of Dairy Cows in the Transition Period: Prevented Subclinical Hypocalcemia and Minimizing Oxidative Stress

Kassio Duan Albani¹, Aleksandro Schafer Da Silva^{1,2*}, Gustavo Machado³, Nathieli Bottari Bottari², Mariana Sauzen Alves², Gabriela Campigotto¹, Alexandre Fritzen¹, Maria Rosa Chitolina Schetinger², Vera Maria Morsch², Roberto Zaboot⁴ & Leandro Samia Lopes^{1*}

¹ Department and Graduate Program of Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó, Santa Catarina, SC, Brazil. ² Department of Biochemical and Molecular Biology, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil. ³ College of Veterinary Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. ⁴ Technical consultant, Agroceres Multimix, Rio Claro, SP, Brazil. CORRESPONDENCE: A.S. Da Silva [dasilva.aleksandro@mail.com - Tel +55 (49) 2049-9560]. Departamento de Zootecnia, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC). Rua Beloni Trombeta Zanini n. 680E. Bairro Santo Antônio. CEP 89815-630 Chapecó, SC, Brazil.

ABSTRACT

Background: There are many metabolic diseases that affect dairy cows during the transition period, among them, the postparturient hypocalcemia, also known as milk fever, puerperal paresis syndrome, or fallen cow. This disease may affect animals 72 hours after calving due to a nutritional imbalance in the calcium metabolism, which occurs after a sudden demand of this mineral at the beginning of lactation. This problem is more common in animals with high milk production, and usually after the second lactation. Therefore, this study evaluated whether the anionic diet on the prepartum phase would be beneficial for dairy cows in the transition period.

Materials, Methods & Results: Eight Holstein cows on their second and third pregnancy with body condition score between 3.5 and 4 were used. During the experiment, the animals remained in paddock with grazing Tifton 85 (*Cynodon* spp.) and water *ad libitum*. Two groups of four animals each were used: the group A (control) received a dietary cation-anion difference (DCAD) diet of 2.57 mEq Kg⁻¹, and the

second group, called the group B (treatment), received a DCAD diet of -112.2 mEq Kg⁻¹. To evaluate animal health, we performed gynecological examinations, in addition to blood samplings on days 20, 10 and 5 prepartum and 3, 7, 12 and 20 postpartum to assess seric levels of calcium (Ca), total protein, albumin, globulin, cholesterol, triglyceride, urea, and hepatic function (AST, ALT and GGT). It was also measured the production of free radicals (ROS) and lipid peroxidation (TBARS) in the transition period of the cows. No statistical differences were observed between groups regarding body condition score, uterine tone, dominant follicle diameter, size and presence of the corpus luteum and the presence of genital discharge up to 30 days postpartum. However, the anionic diet prevented a dramatic reduction in calcium levels, unlike what occurred in the control cows (the group A) where a subclinical hypocalcemia was observed. Oxidative reactions (ROS and TBARS) occurred in both groups in the prepartum period, but in the postpartum there was an increase in the production of free radicas and lipid peroxidation (the group A). Overall, there was no difference between groups for total protein, albumin, urea, globulin, cholesterol, and triglyceride levels, and AST, ALT and GGT activities; however, these variables fluctuated during the transition period.

Discussion: The anionic diet provided to dairy cows before calving caused beneficial effects on the health of these animals. In general, this diet prevented subclinical hypocalcemia, as well as, it reduced the production of free radicals and lipid peroxidation in the postpartum period. This may have occurred because anionic diets consistently increase chlorine and sulfur concentrations, and it reduces the levels of sodium and potassium in the last three weeks of pregnancy, which can significantly reduce hypocalcemia in cows. Low concentrations of Ca can cause serious problems on animal's health, mainly clinical hypocalcemia and retained placenta, conditions that were not observed in cows of this experiment. Despite the use of an anionic diet, calcium levels decreased in the serum of cows, but this reduction did not lead to hypocalcemia. Based on these results, we can conclude that the anionic diet was beneficial to the health of dairy cows in the postpartum period, i.e., minimizing postpartum negative effects such as subclinical hypocalcemia and oxidative stress.

Keywords: anionic diet, dairy cows, hypocalcemia, oxidative stress.

INTRODUCTION

The transition period for a dairy cow corresponds to 21 days prepartum until 21 days postpartum, and it is considered a limiting factor for milk production [15]. There are several endocrine and metabolic changes at this period considering calving, the initiation of lactation, followed by milk production. Consequently, these changes can cause stress to the animals, and huge nutritional imbalance due to high demands of energy, amino acids, and calcium [6].

Some calving management techniques can be used to reduce postpartum risks, and we can highlight the methodology called dietary cation-anion difference (DCAD), determined by the incorporation of anionic minerals negatively charged in the diet [6]. This method prevents calcium (Ca) deficiency in the postpartum period since it stimulates a hormonal response, leaving the animal ready to a high demand of Ca at this time [15]. The most appropriate period for the use of anionic diets is 21 days before the predicted calving date, inducing a permanent mobilization of the regulatory mechanisms of Ca, and thus, preventing hypocalcemia [15]. During calving, oxidative wear takes place in the cells due to high muscle effort and Ca demand, leaving the animal more susceptible to metabolic disorders such as hypocalcemia, retained placenta, displaced abomasum, and metritis at the postpartum period [13]. Therefore, we evaluate in this study whether an anionic diet provided at the prepartum period of dairy cows could influence their gynecological health, seric levels of calcium, oxidative profile, hepatic function, lipid and protein metabolism.

MATERIALS AND METHODS

Animals

The study was conducted in a dairy farm located in Faxinal dos Guedes, a small town located in the West part of Santa Catarina State, Southern Brazil. Eight Holstein cows on their second and third pregnancy with body condition score between 3.5 and 4 were used. During the experiment, the animals remained in paddock with grazing Tifton 85 (*Cynodon* spp.) and water *ad libitum*. Dietary supplementation (4 kg day⁻¹) was provided in an individual feeder twice a day (08:00 AM and 05:00 PM) in order to ensure food consumption.

Experimental groups

The animals were randomly assigned into two groups with four animals each. Control animals (the group A) received DCAD supplementation with 2.57 mEq Kg⁻¹ of dry matter (DM) and a concentration of 0.44% of calcium (Ca). In the other group (the group B), cows received the anion supplementation of DCAD diet (-112.2 mEq Kg⁻¹ of DM with a concentration of 1.12% of Ca). To determine the DCAD diet, the Santos [15] formula was used: DCAD (meq) = (Na+K) - (Cl+S). Twenty-one days before the predicted calving date, all animals were separated and supplemented according to the experimental design, and also received corn silage, hay Tifton, Tifton grass, ground corn, soybean meal, wheat bran, and minerals (Table 1). Soon after calving, the postpartum supplementation was provided in order to meet nutritional requirements for lactation. Postpartum supplementation consisted of corn silage, Tifton hay, mineral premix, commercial concentrate and sodium bicarbonate (Table 2).

Sampling

Blood samples were collected on days 20, 10 and 5 before calving and on days 3, 7, 12 and 20 after calving. Blood samples were obtained from the tail vein using vacuum tubes, and stored in tubes without anticoagulant to obtain serum after a centrifugation (3500 rpm for 10 min). Serum was collected in eppendorf tubes and stored at -20 °C until analysis.

Seric biochemistry

Seric levels of total protein, albumin, cholesterol, triglycerides, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), gamma glutamyl transferase (GGT) and urea were measured. Analyses were performed using commercial kits (Analisa®)¹ specific to these variables, and suitable for a semi-automatic equipment (Bioplus 2000®)².

TBARS and ROS seric levels

Lipid peroxidation was determined by the levels of thiobarbituric reactive substances (TBARS) in serum according to the methodology described by Jentzsch et al. [10]. The results were obtained by spectrophotometry at 535 nm, and expressed as nmol of malondialdehyde/mL.

For the determination of ROS (reactive oxygen species) serum samples were prepared as described by Ali et al. [1] and Bass et al. [3]. ROS formation was quantified using a standard curve of dichlorofluorescein (DCF) in methanol.

Calcium levels

Seric levels of Ca were measured following the methodology described by Da Silva et al. [7]. For the study, 250 µL of serum were used and results were expressed as mg dL⁻¹.

Gynecological examination

At this time, each cow was subjected to a body evaluation receiving a score as previously described by Wildman et al. [18]. Animal history was recorded, especially regarding its transition period. Gynecological examinations were performed on all animals 30 days after calving in order to check for reproductive changes. For that, animals were restrained inside an examination room and properly examined by a veterinarian. The perineal region was examined to check for adhered vulvar secretions in addition to the status of the ligaments. Rectal examination was performed right after removal of fecal content. Uterus was palpated and also examined by ultrasound (Mindray DP-vet 10) using a 5 MHz transducer to verify the presence of uterine content and possible changes. Ovarian examination was performed to evaluate the presence of dominant follicles, size and corpus luteum, along with any other possible pathological changes [8, 9].

Later, vaginal examination was performed. For this, the perineal area of each cow was previously washed with mild soap and properly dried. A new pair of gloves and sterilized speculum were used. With a source of light, the vagina and the cervix were evaluated for the presence of abnormal discharges as described by Sheldon et al. [16], and rated as proposed by Williams et al. [17].

Statistical analysis

Data were initially analyzed using descriptive statistics. As a measure of central tendency, the median was calculated and minimum and maximum values were calculated on dispersed data. In addition, all variables were subjected to the test to evaluate normality, the Shapiro-Wilk test. However, we decided to use a non-parametric test due to a lack of normality. To assess the influence of time on the parameters, the

Friedman test was used for all of the following parameters: total protein; albumin; cholesterol; triglycerides; urea; ALT; AST; ROS; GGT; TBARS, and calcium, considering the influence of groups such as block, when needed (P value < 0.05). Bonferroni's test was used for multiple comparison among days of collection and groups.

In addition, changes in the parameters over the study period were analyzed, considering the groups (A and B). It was observed difference between two independent groups by Mann-Whitney test for every sampling (days 20, 10, and 5 prepartum; and 3, 7, 12 and 20 postpartum) with P value of 0.05. All analyzes were performed using the R v.3.2.4 software (R Development Core Team, 2012).

RESULTS

Gynecological examination

Data from the gynecological examinations showed no significant statistical differences among both groups regarding body condition score, uterine tone, dominant follicle diameter, corpus luteum presence and size, and vaginal discharge up to 30 days postpartum.

Calcium levels

Comparing both groups, calcium levels decreased significantly in the control group at days 3, 7, 12 and 20 pospartum (Figure 1-A). Regarding the influence of sampling time, it was possible to identify a significant impact on calcium levels (Friedman = 19.92; P = 0.002), and significant reduced levels of Ca from days 10 to 5 prepartum for the group B, as well as from day 5 prepartum to day 3 postpartum of the group A, with significant increase in Ca levels at the very last day of the experiment (Figure 1-B).

Biochemical variables

Cholesterol levels were significantly higher on day 3 postpartum with P = 0.02 (Table 3), and the same was identified for urea levels on days 3 and 5 postpartum (P = 0.04) in cows of the group B (Table 3). ROS levels were different between groups on days 3 and 7 postpartum (P = 0.002; Table 4), and TBARS was observed at days 3 and 20 postpartum (P = 0.02; Table 4), i.e. ROS and TBARS levels were lower in animals of group B compared to group A.

There was a significant decrease on triglyceride levels between groups A and B from day 5 prepartum to day 3 postpartum (Friedman = 29.07; $P < 0.001$) (Figure 2-A). In addition, cholesterol levels significantly decreased on days 20 to 10 prepartum for groups A and B, and from days 10 prepartum to 3 postpartum for the group A (Friedman = 32.56; $P < 0.001$) (Figure 2-B). Additionally, there was increase on urea levels from days 3 to 12 postpartum only in animals from the group A (Friedman = 19.33; $P = 0.003$) (Figure 2-C). AST activity showed the largest difference along the study period, and we found elevated AST activity in both groups between days 10 prepartum and 7 postpartum (Friedman = 28.64; $P < 0.001$) (Figure 2-D). GGT levels were increased from days 3 to 7 postpartum in animals of the group B (Friedman = 19.5; $P = 0.003$) (Figure 2-E).

ROS and TBARS levels are shown in Figure 3. ROS levels for animals in the group A significantly increased from day 20 prepartum until day 3 postpartum, and significantly decreased on day 7 postpartum. For both groups, ROS levels decreased on day 20 postpartum (Figure 3-A). Finally, TBARS increased in animals from the group A on day 5 prepartum to day 3 postpartum, but after that it decreased on days 7 and 12 postpartum, and it increased on day 20 postpartum. For the group B, the levels of TBARS significantly decreased from day 12 to day 20 postpartum (Figure 3-B).

DISCUSSION

The anionic diet provided to dairy cows before calving caused beneficial effects on the health of these animals. In general, this diet prevented subclinical hypocalcemia, as well as it reduced the production of free radicals and lipid peroxidation in the postpartum period. This may have occurred because anionic diets consistently increase chlorine and sulfur concentrations, and it reduces the levels of sodium and potassium in the last three weeks of pregnancy, which can significantly reduce hypocalcemia in cows as reported by Correa [6].

Low concentrations of Ca can cause serious problems on animal's health, mainly clinical hypocalcemia and retained placenta [11], conditions that were not observed in cows of this experiment. However, seric concentration of Ca differed between groups, especially near calving, where DCAD diet caused a slower reduction of Ca levels, in addition to a quicker mobilization of Ca, resulting on a faster homeostasis of this mineral [14]. It should be noted that Ca is the most abundant mineral in the animal body, and it is needed for muscle contraction, skeleton integrity, blood clotting, cell

permeability, nerve impulse, heart regulation, enzyme activation, and hormonal secretion [15]. Therefore, increased oxidative reactions may occur, generating oxidative stress already described in cows during the transition period [13].

Increased free radical production and lipid peroxidation were observed in both studied groups, mainly on cows close to the predicted date for calving, as similarly reported in other studies [4,5]. However, there was an exacerbation in the levels of oxidants at the postpartum period for cows in the control group, i.e., negatively charged diets were able to reduce oxidative reactions at the postpartum period, leading to less cell and tissue injuries caused by free radicals [2]. We believe that this positive result of anionic diets on minimizing the effects of oxidative stress is an indirect consequence, since we observed metabolic balance at the postpartum period, which led to a faster recovery of these animals.

Serum variables related to liver function, protein metabolism and lipid metabolism did not differ between groups, i.e. anionic diet did not significantly influence the total levels of protein, albumin, globulin, cholesterol, triglyceride, urea, AST, ALT and GGT. However, most of these variables showed changes during the transition period, as shown in Figure 3. These alterations were expected since this time is considered critical due to a very high nutritional demand by dairy cows to produce colostrum, and subsequently, milk. Among many studies, we found out that many of them are in agreement with our results: reduction in cholesterol levels at calving and postpartum [12], and increased AST concentration at calving and seven days later [12]. Both alterations are easy to explain since increased levels of AST are due to morphological changes and muscle lesions during calving, and low levels of serum cholesterol are due to its use for colostrum synthesis during the first days after calving.

CONCLUSION

The transition period requires high effort by the animal, mainly due to strong muscle contractions at calving as previously mentioned, and fluctuations on serum levels of AST, and GGT, urea, triglycerides and cholesterol may occur. Cows that did not receive the anionic diet prepartum showed signs of hypocalcemia associated with an increase of free radicals and lipid peroxidation exacerbation. Despite the use of an anionic diet, calcium levels decreased in the serum of cows, but this reduction did not lead to hypocalcemia. Briefly, we conclude that the anionic diet has beneficial effects on the health of dairy cows in the postpartum period, but regardless of diet, the animals

do not present clinical disease with lactation, which shows that other factors should be considered in the transition period.

MANUFACTURERS

¹ Gold Analisa Diagnóstica. São Paulo, SP, Brazil.

² Bioplus Produtos para Laboratórios Ltda. Barueri, SP, Brasil.

Ethical approval. The experiment was approved by the Ethics Committee on Animal Research of the Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), under protocol number 1.30.15.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 Ali S.F., Lebel C.P. & Bondy S.C. 1992.** Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology*. 113(4): 637-648.
- 2 Bain P.J. 2003.** Liver. *Veterinary Laboratory Medicine Clinical Pathology*. 4(1): 193-214.
- 3 Bass C., Wade C., Hand D. & Jackson G. 1983.** Patients with angina with normal and near normal coronary arteries: clinical and psychosocial state 12 months after angiography. *British Medical Journal*. 8(1): 287-1505.
- 4 Bernabucci U., Ronchi B., Lacetera N. & Nardone A. 2002.** Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season. *Journal of Dairy Science*. 85(6): 2173-2179.
- 5 Bernabucci U., Ronchi B., Lacetera N. & Nardone A. 2005.** Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 88(6): 2017-2026.
- 6 Correa F.R., Schild A.L., Mendez M.D.C. & Lemos R.A.A. 2001.** *Hipocalcemia: Doenças de ruminantes e equinos*. Varela, São Paulo, 999p
- 7 Da Silva A.S., Costa M.M. & Moreira C.M. 2011.** Experimental Infection by *Trypanosoma evansi* in rabbits: levels of sodium, potassium, calcium and phosphorus in serum. *Acta Scientiae Veterinariae*. 39: 959.

- 8 Edmondson A.J., Fissore R.A., Pashen R.L. & Bondurant R.H. 1986.** The use of ultrasonography for the study of the bovine reproductive tract I. Normal and pathological ovarian structures. *Animal Reproduction Science*. 12(1): 157-165.
- 9 Fissore R.A., Edmondson A.J. & Pashen R.L. 1986.** The use of ultrasonography for the study of the bovine reproductive tract. II. Non-pregnant, pregnant and pathological conditions of the uterus. *Animal Reproduction Science*. 12(1): 167-177.
- 10 Jentzsch A.M., Bachmann H., Furst P. & Biesalski H. 1996.** Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radical Biology Medicine*. 20(2): 251–256.
- 11 Jordan E.R. & Stokes S.R. 2000.** Pampering dry cows pays dividends. *Hoard's Dairyman* 10(3): 510.
- 12 Lima A.S., Weigel R.A., Morgado A.A., Nunes G.R., Souza F.N., Moreno A.M., Della Libera A.M.M.P. & Sucupira M.C.A. 2012.** Parental administration of vitamins A, D and E on the oxidative metabolism and function of polymorphonuclear leukocytes in swine. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 32(3): 727-734.
- 13 Meyer D.J. & Harvey J.W. 2004.** Veterinary Laboratory Medicine: Interpretation and Diagnosis. *Veterinary Clinical Pathology*. 33(1): 182-189.
- 14 Peacock M. 2010.** Calcium metabolism in health and disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 5(1): 23-30.
- 15 Santos J.E.P.D. 2011.** *Doenças metabólicas*. In: Berchielli T.T., Pires A.V. & Oliveira S.G. (Eds) Distúrbios metabólicos: Nutrição de Ruminantes, FUNEP, Jaboticabal, pp.568-616.
- 16 Sheldon I.M., Noakes D.E., Rycroft A.N. & Dobson H. 2002.** Effect of postpartum manual examination of the vagina on uterine bacterial contamination in cows. *Veterinary Record*. 151(3): 531–534.
- 17 Williams E.J., Fischer D.P., Pfeiffer D.U., England G.C., Noakes D.E., Dobson H. & Sheldon I.M. 2005.** Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology*. 63(1): 102–117.
- 18 Wildman E.E., Jones G.M. & Wagner P.E. 1982.** A dairy body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *Journal of Dairy Science*. 65(2): 495-501.

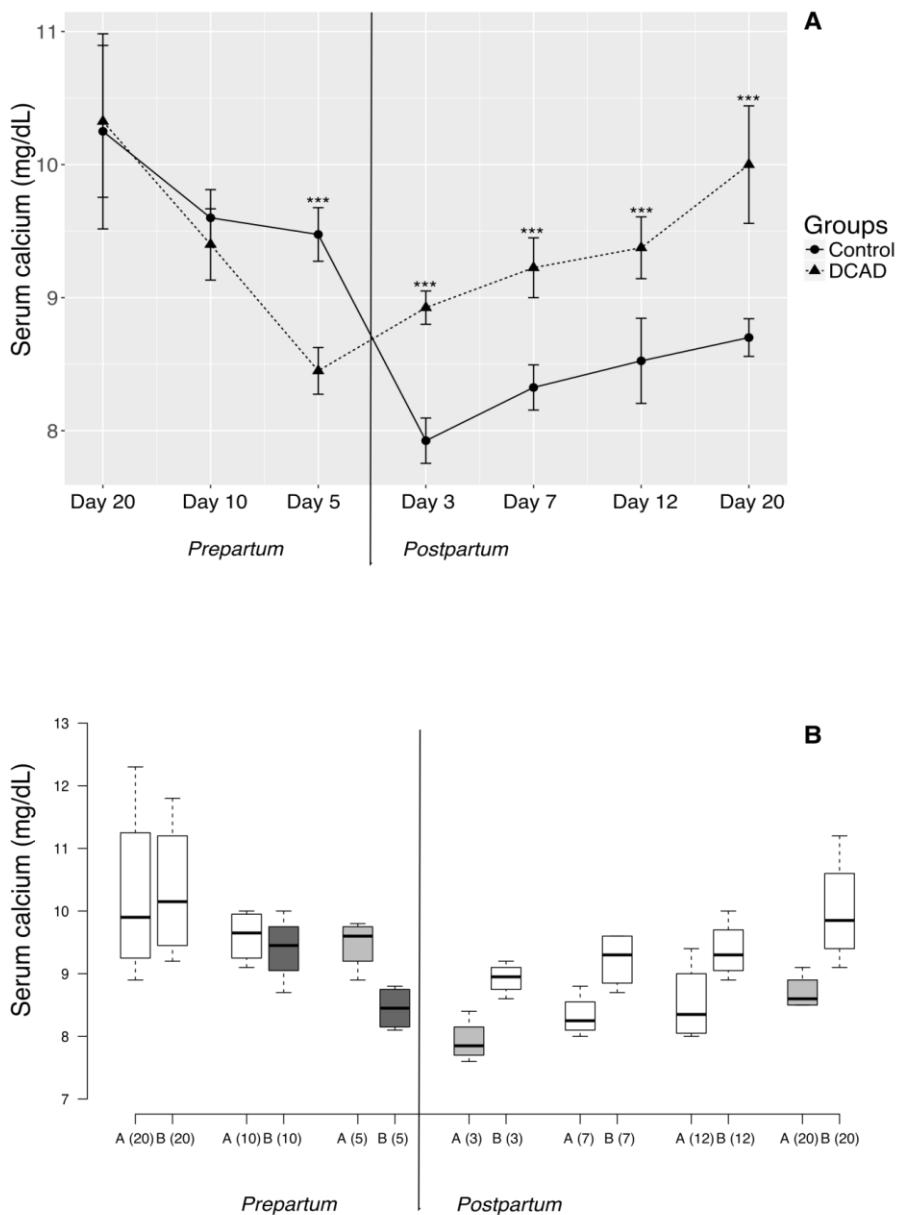


Figure 1. Serum levels of calcium in both studied groups. Asterisk (***) identifies differences between groups. Serum levels of calcium over time (pre and postpartum), considering that groups (image B) with different colors have different levels of calcium. Note: the group A (control diet) and the group B (DCAD diet).

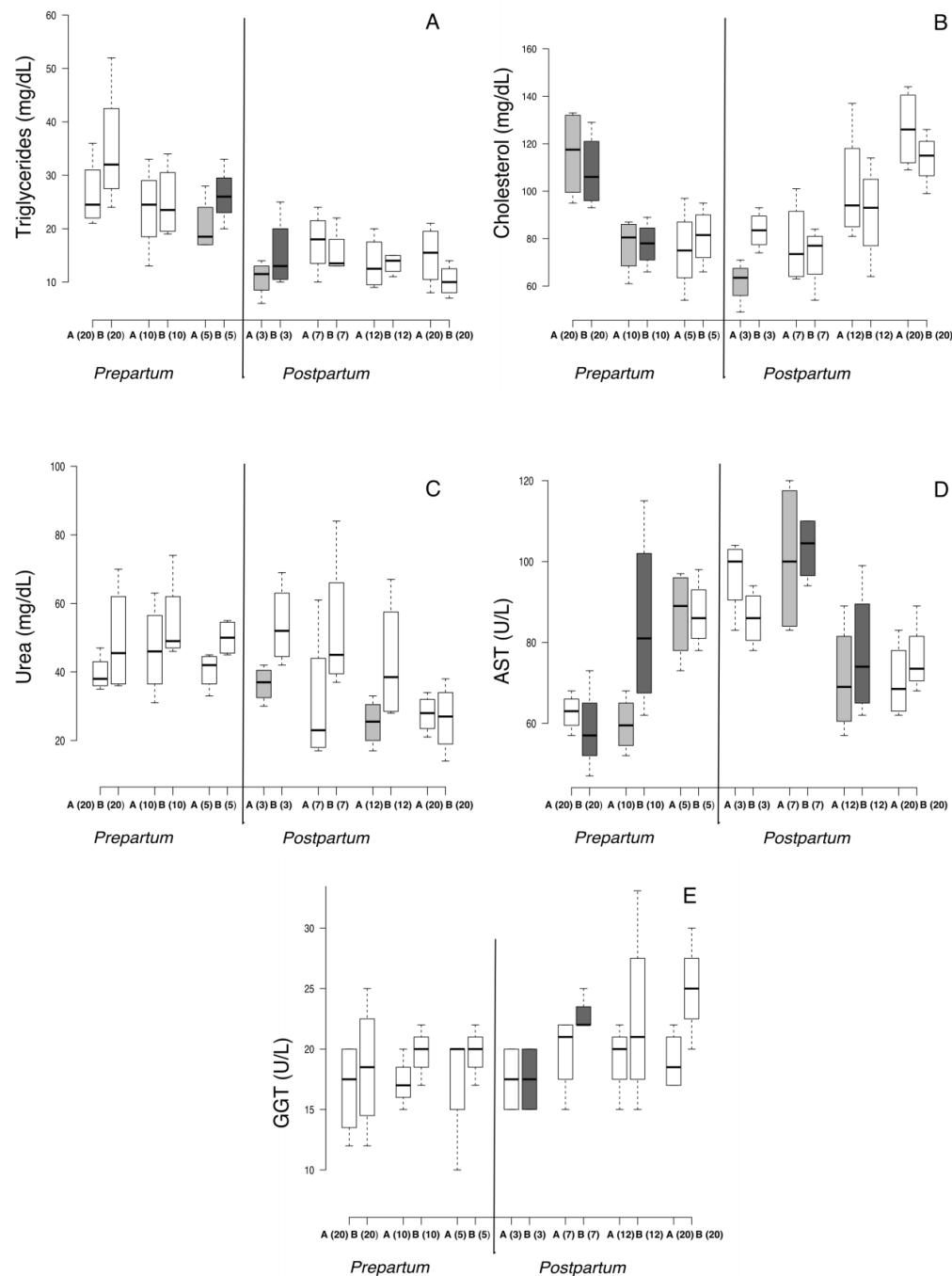


Figure 2. Levels of triglycerides [A], cholesterol [B], urea [C], and aminotransferase aspartate - AST [D] and gamma glutamyl transferase - GGT [E] in the serum of dairy cows during the pre and postpartum considering the groups (image B). Groups differ with different colors over time (the group A: brown color; the group B: gray color). Note: the group A (control diet) and the group B (DCAD diet).

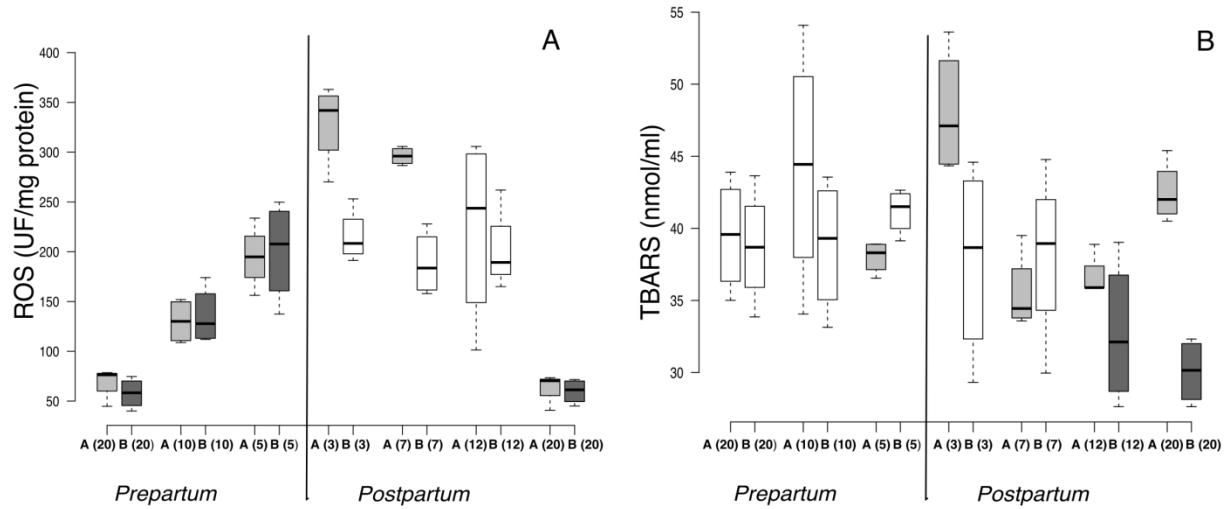


Figure 3. Levels of reactive oxygen species - ROS [A] and lipid peroxidation - TBARS [B] in serum samples of dairy cows during pre and postpartum. Groups differ with different color over time (the group A: brown color; the group B: gray color). Note: the group A (control diet) and the group B (DCAD diet).

Table 1: Diet composition provided to dairy cows during the prepartum period.

	Control diet (% DM)	Anionic diet (% DM)
INGREDIENTS		
Corn silage	57.3	57.0
Tifton grazing	3.8	3.8
Tifton hay	13.4	11.1
Ground corn	10.3	11.0
Soybean meal	8.9	8.9
Wheat bran	4.4	3.5
Commercial mineral	1.8	3.8
Calcareous	0.0	0.8
NUTRIENTS (% DM)		
Crude protein	12.8	12.3
Neutral detergent fiber	43.6	40.0
Acid detergent fiber	24.5	24.2
Ca	0.44	1.12
P	0.37	0.42
Mg	0.20	0.50
Na	0.13	0.10
K	1.26	1.21
Cl	0.34	0.70
S	0.45	0.43
DCAD ⁽¹⁾	2.57	-112.2

Note: (Na+K) – (Cl+S) in mEq/kg of dry matter (DM).

Table 2: Diet composition provided to all dairy cows at the postpartum period (groups A and B).

	Postpartum supplementation (% DM)
INGREDIENTS	
Corn silage	36.5
Tifton hay	26.3
Premix mineral	1.0
Commercial concentrate (18% protein)	35.3
Sodium bicarbonate	0.8
NUTRIENTS (% DM)	
Crude protein	15.6
Neutral detergent fiber	25.49
Acid detergent fiber	37.53
Ca	0.93
P	0.44
Mg	0.3
Na	0.49
K	1.36
Cl	0.2
S	0.17

Table 3. Median and range (minimum and maximum) levels of total protein, albumin, triglycerides, cholesterol, urea, AST, ALT and GGT in the serum of dairy cows (the group A-control) and (the group B-DCAD).

Variables	Days	Median (minimum and maximum)		P value
		Group A	Group B	
Total protein (g/dL)	20 prepartum	8.65 (8.3-1)	8.45 (6.9-12.9)	0.77
	10 prepartum	7.25 (6.3-9.3)	8.90 (7.7-9.6)	0.19
	5 prepartum	7.50 (5.9-8.9)	8.25 (7.5-8.9)	0.37
	3 postpartum	7.10 (6.6-8.3)	8.00 (7.3-8.3)	0.23
	7 postpartum	10.50 (8.1-11.7)	8.50 (7.3-9.7)	0.11
	12 postpartum	8.45 (8.1-9.5)	8.80 (6.6-11.2)	0.68
	20 postpartum	8.95 (7.4-11)	8.65 (4.9-9.4)	0.65
Albumin (g/dL)	20 prepartum	2.85 (2.5-3.5)	2.45 (2.2-2.9)	0.30
	10 prepartum	2.70 (2.0-3.4)	2.40 (2.1-3.0)	0.77
	5 prepartum	2.95 (1.6-3.1)	2.25 (2.1-3.4)	0.88
	3 postpartum	2.75 (2.2-3.1)	2.35 (1.9-2.4)	0.19
	7 postpartum	2.35 (2.1-2.5)	2.25 (1.6-2.9)	1.00
	12 postpartum	2.65 (2.2-3.1)	2.15 (1.9-2.8)	0.14
	20 postpartum	2.70 (2.1-3.3)	2.35 (1.4-2.8)	0.38
Triglycerides (mg/dL)	20 prepartum	24.5 (21.2-36.1)	32.0 (24.7-52.8)	0.34
	10 prepartum	24.5 (13.4-33.7)	23.5 (19.5-34.7)	0.88
	5 prepartum	18.5 (17.4-28.7)	26.0 (20.4-33.3)	0.23
	3 postpartum	11.5 (6.0-14.1)	13.0 (10.4-25.5)	0.56
	7 postpartum	18.0 (10.1-24.3)	13.5 (13.0-22.2)	0.66
	12 postpartum	12.5 (9.7-20.8)	14.0 (11.4-15.5)	0.88
	20 postpartum	15.5 (8.7-21.7)	10.0 (7.1-14.4)	0.34
Cholesterol (mg/dL)	20 prepartum	117.5 (95.4-133.0)	106 (93.4-129.6)	0.48
	10 prepartum	80.5 (61.4-87.7)	78 (66.8-89.2)	0.98
	5 prepartum	75.0 (54.1-97.2)	81.5 (66.0-95.3)	0.68
	3 postpartum	63.5 (49.7-71.5)	83.5 (74.4-93.3)	0.02*
	7 postpartum	73.5 (63.7-101.9)	77.0 (54.8-84.0)	0.88
	12 postpartum	94.0 (81.4-137.5)	93.0 (64.3-114.0)	0.89
	20 postpartum	126.0 (109.7-144.5)	115.0 (99.4-126.1)	0.48
Urea (mg/dL)	20 prepartum	38.0 (35.1-37.8)	45.5 (36.7-70.3)	0.56
	10 prepartum	46.0 (31.4-63.6)	49.0 (46.6-74.3)	0.56
	5 prepartum	42.0 (33.0-45.4)	50.0 (45.6-55.7)	0.04*
	3 postpartum	37.0 (30.7-42.4)	52.0 (42.4-69.7)	0.04*
	7 postpartum	23.0 (17.7-61.3)	45.0 (37.3-84.4)	0.20
	12 postpartum	25.5 (17.5-33.8)	38.5 (28.4-67.9)	0.14
	20 postpartum	28.0 (21.6-34.8)	27.0 (14.1-38.0)	1.00
AST (U/L)	20 prepartum	63.0 (57.0-68.5)	57.0 (47.1-73.3)	0.45
	10 prepartum	59.5 (52.5-68.4)	81.0 (62.6-115.9)	0.08
	5 prepartum	89.0 (73.8-97.4)	86.0 (78.8-98.3)	0.88
	3 postpartum	100.0 (83.2-104.0)	86.0 (78.7-94.0)	0.14
	7 postpartum	100.0 (83.1-120.6)	104.5 (94.9-110.7)	1.00
	12 postpartum	69.0 (57.6-89.3)	74.0 (62.2-99.6)	0.68
	20 postpartum	68.0 (62.8-83.0)	73.5 (68.0-89.3)	0.38

ALT (U/L)	20 prepartum	15.0 (13.1-20.3)	15.0 (13.9-22.6)	0.88
	10 prepartum	16.0 (13.3-17.9)	16.0 (13.5-24.0)	0.88
	5 prepartum	17.0 (13.3-20.6)	16.0 (10.2-20.6)	0.88
	3 postpartum	17.0 (13.5-22.6)	15.0 (12.6-24.7)	0.77
	7 postpartum	18.0 (10.5-20.9)	17.0 (15.3-24.3)	1.00
	12 postpartum	21.0 (10.0-24.3)	24.0 (19.1-26.0)	0.38
	20 postpartum	23 (16.6-24.7)	22.0 (17.7-27.0)	1.00
GGT (U/L)	20 prepartum	17.5 (12.5-20.2)	18.5 (12.1-25.9)	0.76
	10 prepartum	17.0 (15.7-20.6)	20.0 (17.4-22.9)	0.17
	5 prepartum	20.0 (10.4-26.7)	20.0 (17.1-22.6)	0.61
	3 postpartum	17.5 (15.8-20.8)	17.5 (15.7-20.3)	1.00
	7 postpartum	21.0 (15.3-24.6)	22.0 (22.6-25.0)	0.13
	12 postpartum	20.0 (15.6-22.8)	21.0 (15.8-33.7)	0.63
	20 postpartum	18.5 (17.0-22.8)	25.0 (20.5-30.0)	0.07

Note: Mann-Whitney test with median of any difference between lines of P<0.05 (*).

Table 4. Median and range (minimum and maximum) levels of ROS and TBARS in the serum of dairy cows (the group A-control) and (the group B-DCAD).

Variables	Days	Median (minimum and maximum)		
		Group A	Group B	P value
ROS (UF/mg protein)	20 prepartum	76.3 (44.75-78.53)	85.5 (60.90-120.90)	0.20
	10 prepartum	130.1 (108.72-151.96)	127.7 (112-174.06)	0.88
	5 prepartum	194.8 (156.23-233.73)	207.7 (137.46-249.79)	1.00
	3 postpartum	341.9 (270.18-363.0)	208.4 (191.29-253.07)	0.02*
	7 postpartum	296.0 (286.59-305.72)	183.6 (157.94-227.88)	0.02*
	12 postpartum	243.7 (101.27-305.72)	189.3 (165.02-261.95)	0.62
	20 postpartum	70.4 (34.75-73.43)	61.3 (45.05-71.66)	0.68
TBARS (nmol/mL)	20 prepartum	39.6 (35.01-43.9)	38.7 (33.86-43.65)	0.88
	10 prepartum	44.4 (34.06-54.08)	39.3 (33.14-43.56)	0.34
	5 prepartum	38.3 (36.54-39.91)	41.5 (39.14-42.65)	0.06
	3 postpartum	47.1 (44.34-53.62)	38.7 (33.32-44.19)	0.05*
	7 postpartum	34.4 (33.57-39.5)	38.9 (29.96-44.78)	0.67
	12 postpartum	35.9 (35.89-38.89)	32.1 (27.63-39.03)	0.30
	20 postpartum	42.0 (40.51-45.4)	30.2 (27.63-32.32)	0.02*

Note: Mann-Whitney test with median of any difference between lines of P<0.05 (*).

2.2. Manuscrito I

Metaphylactic effect of calcium on milk composition and animal health in postpartum dairy cows

Autores: Kássio Duan Albani; Leandro Sâmia Lopes; Gabriela Campigotto¹; Matheus D. Baldissera, Aleksandro Schafer da Silva

De acordo com normas para publicação em:

Anais da Academia Brasileira de Ciências

**Metaphylactic effect of calcium on milk composition and animal health in
postpartum dairy cows**

Kássio Duan Albani¹; Leandro Sâmia Lopes^{1,2}; Gabriela Campigotto¹; Matheus D.
Baldissera³, Aleksandro Schafer da Silva^{1,4}

¹ Graduate Program of Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Rua Beloni Trombeta Zanim, bairro Santo Antônio, 89815-630, Chapecó, Brazil.

² Department of Animal Science, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

³ Department of Microbiology and Parasitology, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

⁴ Department of Animal Science, UDESC, Rua Beloni Trombeta Zanin, bairro Santo Antônio, 89815-630

Corresponding authors: Department of Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina, Chapecó, Brazil. [\(L.S.Lopes\)](mailto:leandrosamia@uol.com.br); [\(A.S.Da Silva\)](mailto:dasilva.aleksandro@gmail.com). Fone: +55 49 2049-9560.

Keywords: Animal health; Dairy cattle; Pre-delivery; Subcutaneous calcium; Hypocalcemia.

Academy Section: Health Sciences

Running Head: Metaphylactic effect of calcium in dairy cows

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of subcutaneous calcium administration in postpartum dairy cows with respect to carbohydrate, protein and lipids metabolism, as well as its effects on milk composition. Twenty postpartum dairy cows were randomly divided into two groups ($n=10$): a control and a treated group with a single dose (150 mL) of calcium. Blood collection was performed on postpartum days 1, 2, 3, 7 and 10. In addition, we measured serum levels of total calcium, total proteins, albumin, globulins, glucose, cholesterol, triglycerides, as well as creatine kinase (CK) activity. We determined milk composition on postpartum days 5, 10 and 20. Serum total calcium levels was higher on postpartum days 3 and 7 in the treated group. Serum urea (day 3) and triglycerides (days 7 and 10) levels were higher in the treated group, as were CK activity levels at postpartum days 2 and 3. Serum glucose and cholesterol levels were lower on postpartum day 2 in treated animals. Fat (day 20) and lactose (day 10) content in milk samples were higher than in the treated animals. We concluded that treatment with calcium in cows during the postpartum period changes biochemical variables related to metabolism.

Keywords: animal health; calcium; hypocalcemia; livestock production; postpartum.

INTRODUCTION

Livestock production, including milk production, is one of the largest agribusiness sub-sectors, with a global asset value of at least \$1.4T (Thornton, 2010). Some phases of production are critical to animal health, including the peripartum period, defined as the period 21 days before parturition and 21 days after parturition. During this period, several metabolic and endocrine alterations provoke metabolic disturbances in the postpartum animal; it is a period when the animal has a negative

energy balance, using a large portion of her reserves for production of colostrum and milk (Hernández-Castellano et al., 2017).

Hypocalcemia, associated with placental retention, is the principal disturbance found in cows during the postpartum period, since the animals do not maintain physiological concentrations of serum calcium (Goff and Koszewski, 2018). According to McLaren et al. (2006), approximately 5 % of cases are diagnosed as clinical hypocalcemia, while subclinical hypocalcemia occurs principally in multiparous cows, affecting up to 54 % of the herd (Reinhardt et al., 2011). This condition results from excessive animal effort during parturition, as well as from the large demand of calcium in the generation of colostrum (McGrath et al., 2016).

Hypocalcemia can contribute to dystocia, uterine prolapse, retention of fetal membranes, endometritis, reduction of fertility, mastitis and reduction of ruminal motility, frequently requiring pharmacological interventions (Curtis et al., 1983; Borsberry and Dobson, 1989). According to Santos (2011), these disturbances can be prevented by two main methods, i.e., the use of Ca deficient diets, which stimulate activity and paratormonium secretion (PTH) (negative feedback) (Albani et al., 2017); or one second method, easier to implement and more effective in the control of subclinical hypocalcemia, is the manipulation of the cationic-anionic balance of the diet, which influences PTH activity and, therefore, the mechanism of active absorption of calcium (Albani et al., 2017b). Another option would be oral calcium supplementation, which was beneficial even for dairies with a very low incidence of hypocalcemia (Oetzel and Miller, 2012), however, there is controversy as to the beneficial effects of this practice (Martinez et al., 2016).

According to literature, the subclinical hypocalcemia compromised appetite, altered metabolism, and impaired function of immune cells in dairy cows (Martinez et

al., 2014). The same research group had already verified that the relative risk of developing metritis decreased by 22% for every 1mg/dL increase in serum calcium (Martinez et al., 2014), which shows the importance of maintaining in levels of this adequate mineral. Calcium application in the postpartum period as a preventive measure is a common practice on many farms, but the effects of its application on metabolism of carbohydrates, lipids and proteins needs more studies. Thus, the aim of this study was to evaluate whether administration of subcutaneous calcium soon after parturition had positive effects on animal's health, as well as on maintenance of physiological serum calcium levels, consequently avoid hypocalcemia, characterized in cows when calcium levels are lower 8.0 mg/dL (Blanc et al., 2014).

MATERIALS AND METHODS

The present study was conducted on a farm in Pinhalzinho (Santa Catarina, Brazil), where milk production is the principal activity. The farm includes approximately 50 lactating animals. There is a pasture production system, a prepartum confinement sob compost barn system, with animals individually fed and maintained in yokes. The prepartum cows were separated 21 days before parturition and received a diet (pre-dried, silage and concentrate) (Table I) provided twice a day. After parturition, the animals received a postpartum diet (Table I) twice a day individually, and they were observed daily. Importantly, on the farm, all ingredients were added in a device known as a “wagon mixer”, and after homogenization, feed was offered to the individual animals. Per cow, the total food supply was 20 kg and 30 kg/day, with pre-dried oats at 9 kg and 7 kg/day, in the pre- and postpartum periods, respectively.

Twenty multiparous Holstein cows (two to four lactations) and milk production (28 ± 4 L) were divided into two groups of ten animals each: the control group (CG)

and animals that received treatment with injectable calcium to aid in the prevention of subclinical hypocalcemia. The treated animals received a single dose of 150 mL of calcium subcutaneously after parturition (2 hours). The drug used was composed of calcium gluconate monohydrate (22.83 g), D-calcium saccharide tetrahydrate (0.0387) and calcium lactate pentahydrate (3.03 g) for each 100 mL of product.

During the experiment, homogenized food samples (silage, pre-dried and concentrate) were collected, packed and sent to the laboratory for analysis (Table 1). Blood samples were collected from the caudal vein using tubes without anticoagulant on days 1 (parturition), and postpartum days 2, 3, 7 and 10. Samples were transported to laboratory and centrifuged (3500 rpm, 10 min) to obtain serum. The serum was collected and stored at -20 °C until assay. Milk samples were collected on postpartum days 5, 10 and 20 for analysis of milk composition (fat, protein, lactose and total solids) using automatic equipment (LactoStar Funke Gerber®).

Serum levels of total calcium, total protein, albumin, cholesterol, triglycerides, glucose and urea, as well as creatine kinase (CK) activity, were measured using commercial kits (Analisa®) using a semi-automated analyzer (Bio Plus 2000®) according to manufacturers' instructions. The serum globulin levels were obtained by subtracting albumin from total protein levels.

On the day of blood collection, a drop of blood collected form caudal vein was used to quantify ketone bodies levels using a portable digital meter (KetoVet TD-4235®) following the manufacturer's recommendations.

The data were subjected to normality testing (Shapiro-Wilk), and the data that did not present normality were transformed to logarithms for normalization. Subsequently, the data were compared using the Student's t test, with $P < 0.05$ between

groups (control and treated) and over time (repeated measures) considered statistically significant.

RESULTS

After parturition, no clinical signs linked to hypocalcemia, placenta retention and mastitis were observed in either group. Serum total calcium levels were higher in treated animals than in the control group on postpartum days 3 and 10 (Figure I). Over time, a calcium increase from day 2 to 3 ($P < 0.05$) was observed.

Serum levels of urea (postpartum day 3) and triglycerides (postpartum days 7 and 10), and CK activity (days 2 and 3 postpartum) were higher in the treated group than in the control group. Serum levels of glucose and cholesterol were lower in the treated group than in the control group on postpartum day 2 (Tables II and III). No difference was observed between groups regarding ketone bodies, total proteins, albumin or globulin content (Tables II and III).

Over time, ketone body levels increased after delivery in both groups (Table II), and globulin levels were higher on postpartum day 3 than on other evaluated days (control group only) (Table II). CK activity increased soon after delivery in both groups, and decreased on day 10 (Table III). Glucose and triglyceride serum levels were higher shortly after calving, and then decreased in both groups (Table III). Cholesterol levels only differed over time in the control group, that is, on postpartum days 2, 3 and 7 compared to the others days (Table III). Other variables (total protein, urea and albumin) did not differ over time ($P < 0.05$).

Regarding milk composition, we observed no difference between groups in terms of proteins or defatted dry extract. However, fat and lactose content were higher in the treated group than the control group on days 20 and 10 postpartum, respectively

(Table IV). Over time, there were no differences in milk composition variables ($P > 0.05$ – Table IV).

DISCUSSION

According to literature, fluctuations in blood Ca were observed after prophylactic intravenous Ca supplementation in multiparous Jersey × Holstein crossbreed cows (Blanc et al., 2014). Similarly, we observed also fluctuations, but with significant higher serum total calcium levels in treated animals than in the control group. Researchers verified that the postpartum oral supplementation with 2 doses of 50 to 60 g of calcium increased this mineral concentration in serum and reduced the prevalence of subclinical hypocalcemia in Jersey cows; but this authors observed that the initial calcemic status highly influenced treatment effects, with subclinically hypocalcemic cows showing a greater serum calcium concentration increase after supplementation than normocalcemic cows (Valdecabres et al., 2018). Based on these data, the researchers conclude that the oral calcium supplementation seemed to disrupt Ca homeorhetic mechanisms in normocalcemic cows, and future studies should evaluate the long-term implications on production and reproduction (Valdecabres et al., 2018). A study conducted by Jahani-Moghadam et al. (2018) reported that oral Calcium bolus administration increased concentrations of calcium in serum on Day 2 postpartum in Holstein dairy cows, and increased first service conception rates, in cows fed a diet with a positive DCAD prior to calving compared to cows that received no oral Ca bolus supplementation. It is important emphasize that use of a single dose of calcium 24 h following parturition was reduced several risks, including retention placenta risk, mastitis, heart disease risk and displaced abomasum in multiparous cows (Leno et al.,

2018). Thus, treatment with oral calcium can be considered an approach to prevent not only hypocalcemia but also other disorders of dairy cows during the postpartum period.

After parturition, a negative energy balance favors the occurrence of subclinical or clinical ketosis, as observed by Ceciliani et al. (2018) in dairy cows during the transition period. Although no clinical signs associated with ketosis were observed in this study, it is important to highlight a tendency ($P=0.08$) toward increased ketone bodies in the control group, with a trend toward fewer ketone bodies in the treated group than in the control group. Valldecabres et al. (2018) reported that oral calcium supplementation reduced the incidence of subclinical ketosis in multiparous cows during the postpartum period. The transitory increase in serum urea levels in the treated group can be considered a direct consequence of increased serum total calcium levels, since calcium is principally metabolized via the kidney (Massey and Whiting, 1993). In addition, it is important emphasize that increased serum urea levels can indicate substantial catabolism of amino acids, because urea is a major nitrogenous end-product of protein and amino acid catabolism (Gowda et al., 2010).

In cow calving and post-partum, there is an increase in the inflammatory response (LeBlanc, 2012), as it is known that inflammatory activity is one factor associated with reduced CK (Lee et al., 2000), and the study indicates that inflammation may initiate a process leading to reduction in CK levels, ie the CK may have an anti-inflammatory effect (Bekkelund and Johnsen, 2018). However, in our study have increase in serum CK activity observed in calcium-treated animals can be considered an attempt on the part of the organism to provide energy in a period of negative energy balance, such as the postpartum period. This occurs because CK catalyzes the reversible conversion of creatine and ATP to phosphocreatine and ADP (Wallimann et al., 1992), and phosphocreatine serves as an energy reservoir that rapidly produces ATP. Thus, CK

is a crucial enzyme for generation of phosphocreatine, functioning as an energy buffer and as an energy carrier (Schlattner et al., 2006). However, it is important emphasize that the augmentation of CK activity can be considered an adverse effect of calcium supplementation, since CK is released into the circulation from damaged cells (e.g., damaged muscles) (Kim et al., 2016). This can be corroborated by the positive correlation between calcium and CK serum levels during myocardial infarction (Speich et al., 1988). In the present study, we observed that animals treated with calcium had lower serum glucose levels on the second day postpartum than did the control group, demonstrating that calcium can influence carbohydrate metabolism. Glucose reduction may be explained by the fact that glucose is a substrate for lactose synthesis; this phenomenon was observed in cows receiving calcium that produced a higher percentage of lactose in their milk. In agreement with our observations, Valldecabres et al. (2018) demonstrated that Jersey cows prophylactically treated with oral calcium in the postpartum period had lower serum glucose levels than did the control group, while no difference was observed in this parameter in Holstein dairy cows treated orally with calcium boluses (Jahani-Moghadam et al., 2018). Finally, we observed that calcium also altered lipid metabolism, demonstrated by increased triglycerides and decreased cholesterol levels, change that we do not find an explanation in the literature.

We observed that fat and lactose content was higher in animals treated with calcium than in the control group, contrary to observations by Jahani-Moghadam et al. (2018), who no observed difference in milk composition in Holstein dairy cows treated with oral calcium, and contrary as well to observations by Amanlou et al. (2016) in Holstein cows treated subcutaneously with calcium. More recently, Domino et al. (2017) demonstrated that two sources of calcium (calcium gluconate or calcium bolus) did not affect the milk composition of multiparous Holstein cows. It is important

emphasize that increases in these parameters occurred only in one moment of sample collection, and then returned to the same values as the control group. The increase on milk fat content can be directly associated with augmentation of calcium via diet, since several studies have demonstrated the effects of calcium on lipid metabolism (Fu et al., 2011). However, this alteration should not raise concern, since the results demonstrated that it was a transitory effect.

CONCLUSION

The use of a single dose of calcium subcutaneously maintained calcium levels above 8 mg/dL, and this avoided the subclinical hypocalcemia observed in five cows in the control group. In addition, calcium application produced few alterations in milk composition at the evaluated time points, all of which can be considered positive effects. Thus, this prophylactic treatment can be considered an approach to avoid hypocalcemia in dairy cows during the postpartum period. However, it is important to emphasize that the most appropriate method to prevent hypocalcemia is the use of anionic diet in pre-partum (Albani et al. 2017a).

Ethics Committee

The experiment was approved by the Ethics Committee on Animal Research of the Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), under protocol number 3317190417.

REFERENCES

- ALBANI KD, DA SILVA AS. 2017a: Dieta com restrição de cálcio ou aniônica em vacas leiteiras no pré-parto. Arq Ciênc Vet Zool Unipar 20(1): 93-99.
- ALBANI KD, DA SILVA AS, MACHADO G, BOTTARI NB, CAMPIGOTTO G, FRITZEN A, MORSCH VM, SCHETINGER MRC, LOPES LS. 2017b: Benefits of a Prepartum Anionic Diet on the Health of Dairy Cows in the Transition Period: Prevented Subclinical Hypocalcemia and Minimizing Oxidative Stress. Acta Sci Vet 45: 1517.
- AMANLOU H, AKBARI A P, FARSUNI N E, SILVA-DEL-RÍO N. 2016: Effects of subcutaneous calcium administration at calving on mineral status, health, and production of Holstein cows. J Dairy Sci 99(11): 9199-9210.
- BEKKELUND SI, JOHNSEN SH. 2018: Creatine kinase is associated with reduced inflammation in a general population: The Troms study. PLoS ONE 13(5): e0198133.
- BLANC CD, VAN DER LIST M, ALY SS, ROSSOW HA, SILVA-DEL-RÍO N. 2014: Blood calcium dynamics after prophylactic treatment of subclinical hypocalcemia with oral or intravenous calcium. J Dairy Sci 97(11): 6901-6906.
- CECILIANI F, LECCHI C, URH C, SAUERWEIN H. Proteomics and metabolomics characterizing the pathophysiology of adaptive reactions to the metabolic challenges during the transition from the late pregnancy to early lactation in dairy cows. J Proteomics 178: 92-106.
- DOMINO A R, KORZEC H C, MCART J A A. 2017: Field trial of 2 calcium supplements on early lactation health and production in multiparous Holstein cows. J Dairy Sci 100(12): 9681-9690.

- DUFFIELD T. 2000: Subclinical Ketosis in Lactating Dairy Cattle. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice 16(2): 231–253.
- FU S, YANG L, LI P, HOFMANN O, DICKER L, HIDE W, LIN X, WATKINS S M, IVANOV A R, HOTAMISLIGIL G S. 2011: Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity. Nature 473(7348): 528-531.
- GOFF J P, AND N J KOSZEWSKI. 2018: Comparison of 0.46% calcium diets with and without added anions a 0.7% calcium anionic diet as a means to reduce periparturient hypocalcemia. J Dairy Sci 101:5033-5045.
- GOWDA S, DESAI P B, KULKARNI S S, HULL V V, MATH A A K, VERNEKAR S N. 2010: Markers of renal function tests. N Am J Med Sci 2(4): 170-173.
- HERNÁNDEZ-CASTELLANO L E, HERNANDEZ L L, SAUERWEIN H, BRUCKMAIER R M. 2017: Endocrine and metabolic changes in transition dairy cows are affected by prepartum infusions of a serotonin precursor. J Dairy Sci 100(6): 5050-5057.
- JAHANI-MOGHADAM M, CHASHNIDEL Y, TEIMOURI-YANSARI A, MAHJOUBI E, DIRANDEH E. 2018: Effect of oral calcium bolus administration on milk production, concentrations of minerals and metabolites in serum, early-lactation health status, and reproductive performance of Holstein dairy cows. New Zealand Vet J 66(3): 132-137.
- KIM S, SIMON E, MYERS L, HAMM L L, JAZWINSKI S M. 2016: Programmed cell death genes are linked to elevated creatine kinase levels in unhealthy male nonagenarians. Gerontol 62(5): 519-529.

- LEBLANC SJ. 2012: Interactions of metabolism, inflammation, and reproductive tract health in the postpartum period in dairy cattle. *Reprod Domest Anim.* 47(Suppl 5): 18-30.
- LEE YH, CHOI SJ, JI JD, SONG GG. 2000: Serum creatine kinase in patients with rheumatic diseases. *Clinical Rheumatol* 19(4): 296–300.
- LENO B M, NEVES R C, LOUGE I M, CURLER M D, THOMAS M J, OVERTON T R, MCART J A A. 2018: Differential effects of a single dose of oral calcium based on postpartum plasma calcium concentration in Holstein cows. *J Dairy Sci* 101(4): 3285-3302.
- MASSEY L K, WHITING S K. 1993: Caffeine, urinary calcium, calcium metabolism and bone. *J Nutr* 123(9): 1611-1614.
- MARTINEZ N, SINEDINO LDP, BISINOTTO RS, DAETZ R, LOPERA C, RISCO CA, GALVÃO KN, THATCHER WW, SANTOS JEP. 2016: Effects of oral calcium supplementation on mineral and acid-base status, energy metabolites, and health of postpartum dairy cows. *J Dairy Sci.* 99(10): 8397-8416.
- MARTINEZ N, SINEDINO LDP, BISINOTTO RS, RIBEIRO ES, GOMES GC, LIMA FS, GRECO LF, RISCO CA, GALVÃO KN, SANTOS JEP. 2014: Effect of induced subclinical hypocalcemia on physiological responses and neutrophil function in dairy cows. *J Dairy Sci* 97(2): 874–887.
- MARTINEZ N, RISCO CA, LIMA FS, BISINOTTO RS, GRECO LF, RIBEIRO ES, MAUNSELL F, GALVÃO K, SANTOS JE. 2012: Evaluation of peripartal calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. *J Dairy Sci* 95(12): 7158-7172.

- MCGRATH B A, FOX P F, MCSWEENEY P L H, KELLY A L. 2016: Composition and properties of bovine colostrum: a review. *Dairy Science and Technology* 96(2): 133-158.
- MCLAREN C J, LISSEMORE K D, DUFFIELD T F, LESLIE K E, KELTON D F, GREXTON B. 2006: The relationship between herd level disease incidence and a return over feed index in Ontario dairy herds. *Can Vet J* 47(8): 767–773.
- OETZEL GR. 2013: Oral calcium supplementation in peripartum dairy cows. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 29(2): 447-455.
- OETZEL GR, MILLER BE. 2012: Effect of oral calcium bolus supplementation on early-lactation health and milk yield in commercial dairy herds. *J Dairy Sci* 95: 7051– 7065.
- REINHARDT T A, LIPPOLIS J D, MCCLUSKEY B J, GOFF J P, HORST R L. 2011: Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. *Vet J* 188(1): 122–124.
- SANTOS J E P D. 2011: Distúrbios metabólicos. Em: BERCHIELLI T T, PIRES A V, OLIVEIRA S G. Distúrbios metabólicos. Nutrição de Ruminantes. Jaboticabal. FUNEP 616(2): 439-520.
- SPEICH M, GELOT S, DRY J F. 1998: Calcium, potassium, and creatine kinase after acute myocardial infarction: additional findings on their relations. *Journal of the American College of Nutrition* 7(3): 251-253.
- SCHLATTNER U, TOKARSKA-SCHLATTNER M, WALLIMANN T. 2006: Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1762(2): 164–180.
- THORNTON P K. 2010: Livestock production: recent trends, future prospects. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 365(1554): 2853-2867.

- VALLDECABRES A, PIRES J A A, SILVA-DEL-RÍO N. 2018: Effect of prophylactic oral supplementation on postpartum mineral status and markers of energy balance of multiparous Jersey cows. *J Dairy Sci* 101(5): 4460-4472.
- WALLIMANN T, WYSS M, BRDICZKA D, NICOLAY K, EPPENBERGER H M. 1992: Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: The 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J* 281(1): 21–40.
- YACOWITZ H, FLEISCHMAN A I, BIERENBAUM M L, KRITCHEVSKY D. 1971: Calcium and lipid metabolism: effects of increased dietary calcium on atherosclerosis in rabbits. *New York Academy of Sciences* 33(3): 344-350.

Table I: Ingredients and chemical composition of diet provided to the cows in the pre and postpartum.

INGREDIENTS *	Prepartum diet (%)	Postpartum diet (%)
Corn silage	60.6	69.3
Pre-Dried Oats	27.3	16.2
Commercial Concentrate	12.1	13.9
Commercial Mineral	-	0.6
CHEMICAL COMPOSITION (% DR) AT TOTAL DIET		
Crude protein	14.2	12.0
Neutral detergent fiber (NDF)	21.4	39.0
Acid detergent fiber (ADF)	14.1	21.8
Calcium	0.81	0.73
Phosphorus	0.40	0.38
Magnesium	0.25	0.19
Sodium	0.16	0.13
Potassium	1.16	1.21
Chlorine	0.63	0.17
Sulfur	0.54	0.14
DCAD	-120.60	231.39

Note: (Na+K) – (Cl+S) in mEq/kg of dry matter. * All ingredients are mixed, and offered to animals within 30 min after homogenization

Table II: Serum levels of ketone bodies, total proteins, albumin, globulin and urea on postpartum of cows supplemented with calcium on the day of parturition.

Variable	Day	Control	Supplemented	P value
Ketone bodies (mMol/L)	1	0.76 ± 0.24 ^C	0.54 ± 0.1 ^C	0.341
	2	0.84 ± 0.13 ^C	0.69 ± 0.13 ^C	0.083
	3	0.91 ± 0.20 ^{BC}	0.82 ± 0.21 ^{BC}	0.434
	7	1.5 ± 0.85 ^{AB}	1.42 ± 0.40 ^A	0.744
	10	1.55 ± 0.54 ^A	1.27 ± 0.51 ^{AB}	0.131
P value		0.001	0.001	
Total proteins (g/dL)	1	7.3 ± 1.07	8.02 ± 0.85	0.673
	2	9.85 ± 2.11	8.71 ± 2.10	0.431
	3	11.5 ± 2.9	10.0 ± 2.4	0.709
	7	7.91 ± 1.08	7.51 ± 1.53	0.849
	10	7.77 ± 1.15	7.77 ± 1.21	0.978
P value		0.092	0.145	
Albumin (g/dL)	1	2.86 ± 0.56	3.38 ± 0.85	0.455
	2	4.53 ± 1.05	4.11 ± 1.08	0.675
	3	3.50 ± 0.68	4.11 ± 0.93	0.753
	7	3.27 ± 0.79	3.46 ± 0.81	0.871
	10	3.01 ± 0.26	2.96 ± 0.39	0.849
P value		0.061	0.356	
Globulin (g/dL)	1	4.44 ± 1.00 ^B	4.64 ± 1.06	0.905
	2	5.32 ± 2.20 ^{AB}	5.03 ± 1.19	0.844
	3	8.00 ± 2.65 ^A	6.05 ± 1.94	0.074
	7	4.55 ± 1.20 ^B	4.05 ± 1.35	0.678
	10	4.76 ± 1.25 ^B	4.81 ± 1.07	0.889
P value		0.001	0.087	
Urea (mg/dL)	1	43 ± 9.6	38.7 ± 8.48	0.686
	2	34.3 ± 8.9	44.2 ± 7.02	0.065
	3	35.8 ± 5.2	47 ± 8.6	0.040*
	7	38.0 ± 7.8	39.3 ± 11.2	0.845
	10	42.4 ± 5.0	39.5 ± 7.8	0.817
P value		0.225	0.536	

Note: P<0.05 in the same line shows difference between groups. P<0.05 in the same column shows difference in each group over time (different letters in the same column shows difference between evaluated periods).

Table III: Serum creatine kinase (CK) activity, and glucose, triglycerides and cholesterol levels on postpartum of cows supplemented with calcium on the day of parturition.

Variable	Day	Control	Supplemented	P value
CK (mg/dL)	1	282.1 ± 143.5 ^B	294.1 ± 100.8 ^B	0.875
	2	113.0 ± 50.8 ^C	250.3 ± 19.0 ^B	0.001*
	3	169.6 ± 48.5 ^C	514 ± 85.9 ^A	0.001*
	7	465.0 ± 32.3 ^A	485.5 ± 68.5 ^A	0.905
	10	258.6 ± 11.0 ^B	275 ± 125.6 ^B	0.853
P value		0.001	0.001	
Glucose (mg/dL)	1	53.6 ± 23.6 ^B	72 ± 23.5 ^A	0.148
	2	108.6 ± 27.2 ^A	85.5 ± 15.5 ^A	0.047*
	3	107.9 ± 31.4 ^A	79.2 ± 22.7 ^A	0.096
	7	48.6 ± 15.6 ^B	47.2 ± 9.4 ^B	0.924
	10	69.2 ± 27.7 ^B	49.6 ± 13.6 ^B	0.175
P value		0.001	0.008	
Triglycerides (mg/dL)	1	10.5 ± 6.6 ^B	8.2 ± 3.9 ^{BC}	0.743
	2	36.2 ± 11.8 ^A	33.1 ± 6.5 ^A	0.834
	3	6.69 ± 2.9 ^B	6.66 ± 2.7 ^C	0.897
	7	7.28 ± 1.49 ^B	13.1 ± 4.4 ^B	0.001*
	10	8.00 ± 2.8 ^B	12.0 ± 4.1 ^B	0.047*
P value		0.001	0.001	
Cholesterol (mg/dL)	1	62.5 ± 13.7 ^C	63.3 ± 24.0	0.879
	2	131.9 ± 35.0 ^A	85.6 ± 32.0	0.001*
	3	111.4 ± 32 ^A	87.1 ± 31.0	0.067
	7	99.1 ± 34.2 ^{AB}	64.8 ± 23.2	0.033
	10	73.5 ± 13.1 ^{BC}	59.12 ± 16.7	0.082
P value		0.001	0.201	

Note: P<0.05 in the same line shows difference between groups. P <0.05 in the same column shows difference in each group over time (different letters in the same column shows difference between evaluated periods)

Table IV: Milk composition on days 5, 10 and 20 postpartum of cows that received calcium injectable on parturition day.

Variable (%)	Day	Control	Supplemented	P value
Fat	5	3.35 ± 0.9	4.18 ± 1.20	0.340
	10	3.15 ± 1.2	3.61 ± 1.17	0.635
	20	3.34 ± 1.38	5.44 ± 2.12	0.027*
P value		0.356	0.095	
Protein	5	3.53 ± 0.15	3.47 ± 0.10	0.137
	10	3.35 ± 0.14	3.50 ± 0.12	0.080
	20	3.15 ± 0.11	3.14 ± 0.10	0.897
P value		0.368	0.436	
Lactose	5	5.17 ± 0.22	5.09 ± 0.16	0.834
	10	4.75 ± 0.20	5.14 ± 0.17	0.012*
	20	4.61 ± 0.17	4.58 ± 0.68	0.817
P value		0.265	0.652	
Defatted dry extract	5	9.54 ± 0.30	9.53 ± 0.26	0.967
	10	9.18 ± 0.33	9.58 ± 0.36	0.535
	20	8.67 ± 0.32	8.81 ± 1.2	0.605
P value		0.351	0.476	
Minerals	5	0.85 ± 0.09	0.86 ± 0.12	0.950
	10	0.89 ± 0.11	0.88 ± 0.12	0.912
	20	0.87 ± 0.08	0.89 ± 0.09	0.844
P value		0.865	0.896	

Note: P<0.05 in the same line shows difference between groups. P <0.05 in the same column shows difference in each group over time (different letters in the same column shows difference between evaluated periods).

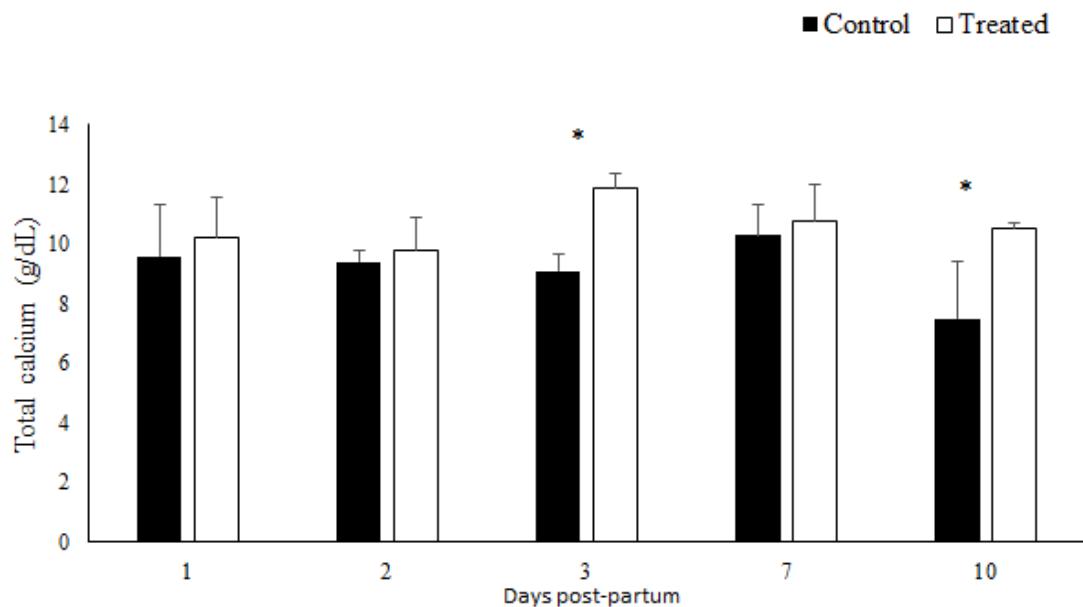


Figure I: Serum total calcium levels of cows supplemented with calcium on days 1, 2, 3, 7 and 10 postpartum (* $P<0.05$). Over time, a calcium increase from day 2 to 3 ($P <0.05$) was observed.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O fornecimento de dieta anionica para vacas de leite, em que a concentração de cálcio no dia do parto é menor, demonstrou não reduzir muito a concentração de cálcio comparado com o grupo que não recebeu dieta anionica e também, as vacas deste grupo recuperaram com mais rapidez os níveis de Ca sanguíneo após o parto.

O uso de uma dose única de cálcio subcutâneo após o parto aumentou os níveis séricos totais de cálcio, efeito este que pode contribuir para evitar a cetose subclínica ou clínica. Além disso, o tratamento com cálcio produziu poucas alterações na composição do leite nos momentos avaliados, e todos podem ser considerados efeitos positivos.

Podemos confirmar o objetivo de utilizarmos dieta com DCAD negativo, pois esta prepara a vaca para o período de transição (parto e inicio da lactação), momento que exige muito do animal, no qual este tratamento ativa os mecanismos de reabsorção de calcio dos ossos. Bem como a aplicação subcutânea de cálcio, disponibilizando maiores quantidades para o animal. Os tratamentos por si só podem ser considerado uma abordagem para prevenir hipocalcemia e distúrbios associados em vacas leiteiras durante o período pós-parto, por tanto se associarmos os dois a eficiência de resultado é maior.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUELO, A et al. The importance of the oxidative status of dairy cattle in the periparturient period: revisiting antioxidant supplementation. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 99, n. 6, p. 1003-1016, 2014.
- AIELLO, F. E.; MAYS, A. **Um manual para o diagnóstico, tratamento, prevenção e controle de doenças para o veterinário**. Manual Merck de veterinária. São Paulo: Roca. p. 152-154, 2001.
- BAŁASIŃSKA, B. Evaluation of antioxidant status in living organisms. **Medycyna Weterynaryjna**. v. 60, p. 579-583, 2004.
- BEDEE, D. K. The DCAD concept: Transitionrations for dry pregnant cows. **Feedstuffs**, v. 26, p. 12-19, 1992.
- BERNABUCCI, U. et al. Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 6, p. 2017-2026, 2005.
- BERNARD, L. et al. Expression and nutritional regulation of lipogenic genes in the ruminant lactating mammary gland. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.606, p.67–108, 2008.
- BREMNER, D. R. et al. Changes in hepatic microsomal triglyceride transfer protein and triglyceride in periparturient dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.83, p. 2252–2260, 2000.
- BURHANS, W. S.; Bell A. W.; Nadeau R.; Knapp J. R. Factors associated with transition cow ketosis incidence in selected New england herds. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 1, p.247, 2003.
- BLOCK, E. Manipulating dietary anions and cations for prepartum dairy cows to reduce incidence of milk fever. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 12, p. 2939-2948, 1984.
- CASTILHO, C. et al. Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. **The Veterinary Journal**, v. 169, n. 2, p. 286-292, 2005.
- CHARBONNEAU, E.; PELLERIN, D.; OETZEL, G. R. Impact of lowering dietary cation-anion difference in non-lactating dairy cows: A meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 2, p. 537-548, 2006.
- CONEGLIAN, M. M.; FLAIBAN, K. K. M. C.; LISBOA, J. A. Hipocalcemia não puerperal em vacas leiteiras sob pastejo de aveia e azevém: estudo de fatores predisponentes. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 1, p. 15-23, 2014.

- DEGROOT, M. A.; BLOCK, E.; FRENCH, P. D. Effect of prepartum anionic supplementation on periparturient feed intake, health, and milk production. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 11 p. 5268-5279, 2010.
- DE-PAULA, F. J. A. A insuficiência óssea na doença renal crônica: papel do paratormônio. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 53, n. 9, p. 1059-1060, 2009.
- DE KOSTER, J. D; OPSOMER, G. Insulin resistance in dairy cows. **Veterinary Clinics of North America**, v. 29, n. 2, p. 299-322, 2013.
- GALVÃO, K. N. et al. Association between uterine disease and indicators of neutrophil and systemic energy status in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 7, p. 2926-2937, 2010.
- GITTO, E. et al. Causes of oxidative stress in the pre- and perinatal period. **Biology of the Neonate** v. 81, n. 3, p. 146-157, 2002.
- GOFF, J. P.; HORST, R. L. Effects of the addition of Potassium or Sodium, but not Calcium, to prepartum rations on milk fever in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 1, p. 176-186, 1997.
- GOFF, J. P. Calcium and magnesium disorders. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 30, n. 2, p. 359-381, 2014.
- GOFF, J. P.; RUIZ, R.; HORST, L. Relative acidifying activity of anionic salts commonly used to prevent milk fever. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 1245-1255, 2004.
- GOFF, J. P. The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. **Journal Veterinary**, v. 176, n. 1, p. 50-57, 2008.
- GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. Introdução à bioquímica clínica veterinária. **Porto Alegre: UFRGS**, v.8, n.2, p.337 2006.
- GONZÁLEZ, F. H. D. Uso do perfil metabólico para determinar o status nutricional em gado de corte. In: GONZÁLEZ, F. H. D.; BARCELLOS, J. O.; OSPINA, H.; RIBEIRO, L. A. O. Perfil metabólico em ruminantes e seu uso em nutrição e doenças nutricionais. **Porto Alegre: UFRGS**, p. 108, 2000.
- GREGHI, G. F. et al. Suplemento mineral aniônico para vacas no periparto: parâmetros sanguíneos, urinários e incidência de patologias de importância na bovinocultura leiteira. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 4, p. 337-342, 2014.

- HARMEYER, J.; SCHLUMBOHM, C. Pregnancy impairs ketone body disposal in late gestating ewes: Implications for onset of pregnancy toxæmia. **Research in Veterinary Science**, v.81, p. 254-264, 2006.
- HYDBRING, E. et al. Hormonal changes during parturition in heifers and goats are related to the phases and severity of labour. **Journal of Endocrinology**, v.160, n.1, p.75-85, 1999.
- HU, W.; KUNG JR, L.; MURPHY, M. R. Relationship between dry matter intake and acid-base status of lactating dairy cows as manipulated by dietary cation-anion difference. **Animal Feed Science Technology**, v. 136, n. 3-4, p. 216-225, 2007.
- JACQUES, F. E. S. Hipocalcemia puerperal em vacas de leite. Monografia (Graduação em medicina veterinária) – **Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, p. 22, 2011.
- JORDAN, E. R.; STOKES, S. R. Pampering dry cows pays dividends. **Hoard's Dairyman**. p. 510, 2000.
- KEADY, T. W. J. et al. Effect of concentrate feed level in late gestation on subsequent milk composition, and fertility of dairy cows. **Journal Dairy Science**, v. 84, n. 1, p. 1468-1479, 2001.
- KICHURA, T. S. et al. Relationships between prepartal dietary calcium and phosphorus, vitamin D metabolism, and parturient paresis in dairy cows. **Journal of Nutrition**, v. 112, n. 3, p. 480-487, 1982.
- KIMURA, K. et al. Decreased neutrophil function as a cause of retained placenta in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 3, p. 544-550, 2002.
- KUMARAGURUPARAN, R.; SUBAPRIYA R.; KABALIMOORTHY J.; NAGINI S. Antioxidant profile in the circulation of patients with fibroadenoma and adenocarcinoma of the breast. **Clinical Biochemistry**. v. 35, n.4, p. 275-279. 2002.
- LEAN, I. J. et al. Hypocalcemia in dairy cattle: Meta-analysis and dietary cation-anion difference theory revisited. **Journal Dairy Science**, v. 89, n. 2, p. 669-684, 2006.
- LEBLANC, S. J. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 56, p. 29-35, 2010.
- LEITE, L. C. et al. Diferentes Balanços Catiônicos-Aniônicos da Dieta de Vacas da Raça Holandesa. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 5, p. 1259-1265, 2003.
- LEMOS, J. C. Perfil bioquímico e status oxidativo em vacas leiteiras mestiças no período de transição em clima tropical. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Veterinária, p.65, 2015.

- LIMA, A. S. Metabolismo oxidativo, perfil bioquímico e função de polimorfonucleares de vacas holandesas primíparas e multíparas no periparto suplementadas com vitaminas ADE. **Tese (Doutorado em Ciências) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Universidade de São Paulo, São Paulo, p.118, 2013.
- MACHADO, V. S et al. The effect of injectable trace minerals (selenium, copper, zinc, and manganese) on peripheral blood leukocyte activity and serum superoxide dismutase activity of lactating Holstein cows. **The Veterinary Journal**. v. 200, n. 2, p. 299-304, 2014.
- MARTINEZ, N. et al. Evaluation of peripartal calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. **Journal of Dairy Science**. v. 95, n. 12, p. 7158-7172, 2012.
- MELENDEZ, P.; RISCO, C. A. Management of transition cows to optimize reproductive efficiency in dairy herds. **Veterinary Clinics Food Animal**. v. 21, p. 485-501, 2005.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). Nutrient requirements of dairy cattle. Washington, D.C.: **National Academy Press**, p. 408, 2001.
- OBA, M.; OAKLEY, A. E.; TREMBLEY, G. F. Dietary Ca concentration to minimize the risk of hypocalcemia in dairy cows is affected by the dietary cation – anion difference. **Animal Feed Science and Technology**, v. 164, n. 3-4, p. 164-147-153, 2011.
- OETZEL, G. R.; MILLER, B. E. Effect or oral calcium bolus supplementation on early-lactation health and milk yield in commercial dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 12, p. 7051-7065, 2012.
- ORTOLANI, E. L. Aspectos clínicos, epidemiológicos e terapêuticos da hipocalcemia de vacas leiteiras. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 47, n. 6, p. 799-808, 1995.
- PAIVA, F. A.; NEGRÃO, J. A.; NETTO, A. S.; PORCIONATO, M. A. F.; LIMA, C. G. Efeito do manejo de aleitamento nos níveis de cortisol no metabolismo e na produção de leite de vacas holandesa. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n.6, 2376-2380, 2006.
- PEACOCK, M. Calcium metabolism in health and disease. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 5, n. 1, p. 23-30, 2010.

- SANTOS, J. E. P. 2011. **Doenças metabólicas.** In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. Nutrição de Ruminantes, **Jaboticabal:** FUNEP, v. 15, n.2, p. 616-657.
- SANTOS, J. E. P.; SANTOS, F. A. P. Novas estratégias no manejo e alimentação de vacas pré-parto. In: Simpósio Sobre Produção Animal, 10, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba, 1998. p.165-214.
- SETTI, M. C. et. al. Estudo do balanço cátion-anônico da dieta no desempenho de vacas holandesas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 27, n. 6, p. 1241-1247, 1998.
- Shanks, R. D., A. E. Freeman and F. N. Dickinson. Postpartum distribution of costs and disorders of health. *J. Dairy Sci.* v.64, n.4, p.683, 1981.
- SOARES, M.P. Outras doenças. In: RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos.** São Paulo: Varela, v.7, n.7, p. 471–561, 2001.
- SORDILLO, L. M.; AITKEN S. L. 2009. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology.** v.128, P.104-109, 2009.
- SORDILLO, L. M. Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. **Livestock Production Science**, v.98, p.89-99, 2005.
- SORDILLO, L. M et al. Shifts in thioredoxin reductase activity and oxidant status in mononuclear cells obtained from transition dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.90, n.3, p.1186-1192, 2007.
- RADOTITS, O. M. et al. **Clínica Veterinária:** um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, caprinos e equinos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. v. 9, p. 1278-1297, 2002.
- REYNOLDS, C. K et al. Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. **Journal of Dairy Science**, n.86, p. 1201-1217, 2003.
- TURK, R et al. Influence of oxidative stress and metabolic adaptation on PON1 activity and MDA level in transition dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v.108, p.98-106, 2008.
- TURK, R et al. Lipid mobilisation and oxidative stress as metabolicadaptation processes in dairy heifers during transition period. In press: **Animal Reproduction Science**, v.141, p. 109-115, 2013.

WALLER, K. P. Mammary gland immunology around parturition. Influence of stress, nutrition and genetics. **Advances in Experimental Medicine and Biology** v.480, p.231-245, 2000.

ZHAO, X. J et al. Effects of chelated Zn/Cu/Mn on redox status, immune responses and hoof health in lactating Holstein cows. **Journal of Veterinary Science**. v. 16. n. 4, p. 439–446. 2015.

ANEXO I – Artigo de Revisão

93

DIETA COM RESTRIÇÃO DE CÁLCIO OU ANIÔNICA EM VACAS LEITEIRAS NO PRÉ-PARTO

Kassio Duan Albani¹
Aleksandro Schafer da Silva^{1,2*}

ALBANI, K. D.; SILVA, A. S. da. Dietia com restrição de cálcio ou aniônica em vacas leiteiras no pré-parto. *Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR*, Umuarama, v. 20, n. 2, p. 93-99, abr./jun. 2017.

RESUMO: Várias são as enfermidades metabólicas que acometem vacas leiteiras, entre elas a hipocalcemia, conhecida também como febre do leite, paresia puerperal ou síndrome da vaca caída. Essa patologia pode acometer animais em até 72 horas após o parto, devido a uma falha no metabolismo nutricional de cálcio, que ocorre após uma demanda súbita desse mineral para o início da lactação. Esta tem sua maior ocorrência em animais de alta produção de leite e principalmente com mais de duas lactações. Assim, o objetivo deste trabalho, por meio de revisão de literatura, foi cogitar sobre as metodologias de fornecimento de dieta aniônica e dietas deficientes em cálcio, fornecidas no período de pré-parto das vacas, a fim de evitar ou minimizar problemas futuros em decorrência da hipocalcemia, o que tem apresentados resultados positivos.

PALAVRAS-CHAVE: Bovinos de Leite. Dieta Aniônica. Hipocalcemia.

CALCIUM-RESTRICTION OR ANIONIC DIET IN DAIRY COWS DURING PRE-PARTUM

ABSTRACT: Hypocalcemia is one of several metabolic diseases affecting dairy cows. It is also known as milk fever, puerperal paresis or fallen cow syndrome. The pathology can affect animals up to 72 hours after calving, due to a failure in the nutritional metabolism of calcium, which occurs after the sudden demand of this mineral in order to start lactation. The highest prevalence of this disease is in animals of high dairy production and especially those with more than two lactations. Thus, the purpose of this paper is develop a literature review in order to muse on the methodologies of supplying anionic and calcium deficient diets in the pre-calving period in order to mitigate or minimize future problems due to hypocalcemia.

KEYWORDS: Anionic Diet. Dairy Cows. Hypocalcemia.

ANEXO II – Artigo I

Acta Scientiae Veterinariae, 2017. 45: 1517.RESEARCH ARTICLE
Pub. 1517

ISSN 1679-9216

Benefits of a Prepartum Anionic Diet on the Health of Dairy Cows in the Transition Period: Prevented Subclinical Hypocalcemia and Minimizing Oxidative Stress

Kassio Duan Albani¹, Aleksandro Schafer Da Silva^{1,2}, Gustavo Machado³, Nathieli Bottari Bottari², Mariana Sauzen Alves², Gabriela Campigotto¹, Alexandre Fritzen¹, Maria Rosa Chitolina Schetinger², Vera Maria Morsch², Roberto Zaboot⁴ & Leandro Samia Lopes¹

ABSTRACT

Background: There are many metabolic diseases that affect dairy cows during the transition period, among them, the postparturient hypocalcemia, also known as milk fever, puerperal paresis syndrome, or fallen cow. This disease may affect

ANEXO III – Comitê de Ética do Artigo I



CARTA DE APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal da UDESC analisou o(s) projeto(s):

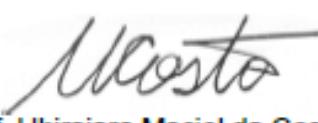
Protocolo: 1.30.15

Tituto: Avaliação do efeito de sais aniónicos em vacas leiteiras no período de transição (pré-parto) sobre níveis séricos de cálcio, ferro, potássio e óxido nítrico, assim como variáveis bioquímicas relacionados ao metabolismo lipídico e proteico.

Coordenador/Pesquisador: Aleksandro Schafer da Silva

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) APROVOU o(s) projeto(s) acima relacionado(s) em seus aspectos éticos e metodológicos, para utilização de animais em pesquisa, de acordo com as diretrizes e normas nacionais e internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa no Brasil.

Lages, 02 de maio de 2016.



Prof. Ubirajara Maciel da Costa
Coordenador do CETEA/UDESC

ANEXO IV – Comissão de Ética do Manuscrito I



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Administração de cálcio subcutâneo pós-parto de vacas leiteiras pode ter efeito benéfico para saúde dos animais?", protocolada sob o CEUA nº 3317190417 (ID 000274), sob a responsabilidade de **Aleksandro Schafer da Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA/UDESC) na reunião de 26/05/2017.

We certify that the proposal "Postpartum subcutaneous calcium administration of dairy cows may have a beneficial effect on animal health?", utilizing 30 Bovines (30 females), protocol number CEUA 3317190417 (ID 000274), under the responsibility of **Aleksandro Schafer da Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of Santa Catarina State (CEUA/UDESC) in the meeting of 05/26/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **05/2017** a **12/2017** Área: **Zootecnia**

Origem:	Animais de proprietários	sex:	Fêmeas	idade:	3 a 5 anos	N:	30
Espécie:	Bovinos			Peso:	500 a 600 kg		
Linhagem:	Holandês						

Local do experimento: O experimento será realizado na propriedade a ser definida no município de Pinhalzinho [] SC. Para definir a propriedade será considerado ser ela tem a atividade da bovinocultura de leite como principal, assim como tenha 30 vacas com previsão de parto em intervalo máximo de 15 dias. Também vamos priorizar propriedade de sistema de produção é a pasto, mas que recebem alimentação no comedouro duas vezes ao dia, tenha instalações apropriadas para contenção dos animais a fim de efetuar a coleta de sangue, ordenha mecânica com possibilidade de mensuração do leite individualmente.

Lages, 16 de maio de 2018

Marcia Regina Pfuetzenreiter
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina

Prof. Dr. Ubirajara Maciel da Costa
Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina