

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

**Estratégias farmacêuticas com fósforo orgânico e
vitamina B₁₂ para melhorar a funcionalidade
hepática de vacas leiteiras primíparas após o parto**

Marcelo Moreira Antunes

Pelotas, 2015

Marcelo Moreira Antunes

Estratégias farmacêuticas com fósforo orgânico e vitamina B₁₂ para melhorar a funcionalidade hepática de vacas leiteiras primíparas após o parto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica Clínica).

Orientador: Marcio Nunes Corrêa

Coorientadores: Cássio Cassal Brauner

Viviane Rohrig Rabassa

Rubens Alves Pereira

Pelotas, 2015

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

A636e Antunes, Marcelo Moreira
Estratégias farmacêuticas com fósforo orgânico e
vitamina B12 para melhorar a funcionalidade hepática de
vacas leiteiras primíparas após o parto / Marcelo Moreira
Antunes. – 35f.. – Dissertação (Mestrado). Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de
Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas,
2015. – Orientador Marcio Nunes Corrêa ; coorientadores
Cássio Cassal Brauner, Viviane Rohrig Rabassa, Rubens
Alves Pereira.

1.Biotecnologia. 2.Butafosfan . 3.Catosal. 4.Vitamina
B12. 5.Fígado. 6.Inflamação. 7.Reprodução. i.Corrêa,
Marcio Nunes. ii.Brauner, Cássio Cassal. iii.Rabassa,
Viviane Rohrig. iv.Pereira, Rubens Alves. v.Título.

CDD: 620.5

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Félix H. D. González (Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Faculdade de Veterinária).

Prof. Dr. Rogério Bermudes (Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de
Zootecnia).

Dr. Rubens Alves Pereira (Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de
Veterinária).

Prof. Dr. Marcio Nunes Corrêa (Orientador, Universidade Federal de Pelotas,
Faculdade de Veterinária).

Agradecimentos

A Deus, acima de tudo, por ser um caminho quando me surgiram dúvidas, incertezas, medos...

Ao meu pai, Sadir João Antunes Zauza e especialmente à minha mãe Ana Líbera Antunes, pelo irrestrito suporte afetivo, educacional e financeiro, assim como pela confiança e apoio nas minhas decisões. Amo muito vocês! Ao meu irmão Gustavo Moreira Antunes pela amizade e apoio. Às minhas tias maternas, especialmente à Gecilda Moreira Maram, por agir comigo como se fosse minha mãe!

À minha namorada Lucimara Konflanz Bergmann pelo companheirismo, carinho e compreensão durante a execução dos projetos.

Ao professor Marcio Nunes Corrêa pela amizade, apoio e orientações no decorrer desses sete anos de convivência.

Ao Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC), por proporcionar as condições necessárias para o meu desenvolvimento pessoal e profissional e idealizar comigo os projetos realizados. Também aos atuais e ex-integrantes do núcleo, pela amizade, coleguismo, compartilhamento de experiências e sonhos, meu muito obrigado.

A Granjas 4 Irmãos S.A., ao gerente da pecuária leiteira, Eduardo Xavier, e aos demais funcionários da leitaria, pela amizade e colaboração na realização destes trabalhos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

À Capes pelo auxílio financeiro.

A todos aqueles que contribuíram com a alegria de meus dias, muito obrigado!

“A história será gentil para mim, pois pretendo escrevê-la.”

Winston Churchill

Resumo

ANTUNES, Marcelo Moreira. **Estratégias farmacêuticas com fósforo orgânico e vitamina B₁₂ para melhorar a funcionalidade hepática de vacas leiteiras primíparas após o parto.** 2015. 35f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da aplicação de fósforo orgânico (butafosfan) e vitamina B₁₂ (cianocobalamina) sobre marcadores do metabolismo energético, mineral e inflamatório, produção de leite e sobre o índice de funcionalidade hepática de vacas leiteiras primíparas. Vinte e três vacas da raça Holandês foram aleatoriamente separadas em três grupos experimentais: Catosal (CAT, n = 8), que receberam total de 100 mL de Catosal®; Butafosfan (BUT, n = 8), que receberam total de 100 mL de solução aquosa de Butafosfan; e Controle (CTL, n = 7), que receberam total de 100 mL de solução fisiológica 0,9%. Todos os animais receberam os 100 mL divididos em 5 aplicações de 20 mL, em intervalos de 24 horas, por via subcutânea, iniciando logo após o parto. Os animais do grupo BUT apresentaram menores concentrações (P<0,05) de beta hidroxibutirato que os animais do grupo CTL. Os demais parâmetros metabólicos, o escore de condição corporal e a produção de leite não foram influenciados pelos tratamentos (P>0,05). O índice de funcionalidade hepática não foi influenciado pelos tratamentos (P>0,05). Após a separação dos animais em grupos de alto e baixo índice de função hepática, os animais do grupo com melhor função hepática (alto) apresentaram menores concentrações de beta hidroxibutirato (P<0,05) e tendência de menores concentrações de ácidos graxos não esterificados (P<0,10), enquanto que os animais com pior função hepática (baixo) apresentaram tendência de menores concentrações de albumina (P<0,10). Em conclusão, neste estudo o índice de funcionalidade hepática não foi influenciado pelos tratamentos.

Palavras-chave: Butafosfan, Catosal, Vitamina B₁₂, Fígado, Inflamação.

Abstract

ANTUNES, Marcelo Moreira. **Pharmaceutical strategies with organic phosphorus and vitamin B₁₂ to improve the hepatic functionality of primiparous dairy cows after calving.** 2015. 35f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The objective of this study was to evaluate the effects of organic phosphorus (butafosfan) and vitamin B₁₂ (cyanocobalamin) on markers of energy, mineral and inflammatory metabolism, milk production and the liver functionality index of primiparous dairy cows. Twenty-three Holstein dairy cows were randomly allocated into three groups: Catosal (CAT, n = 8), receiving total of 100 mL of Catosal[®]; Butafosfan (BUT, n = 8) that received a total of 100 mL of aqueous Butafosfan; and Control (CTL, n = 7), receiving total of 100 mL of 0.9% saline. All the animals received the 100 mL divided in five 20 mL applications at 24-hour intervals, subcutaneously, beginning soon after birth. The animals in the group BUT showed lower beta-hydroxybutyrate concentrations ($P < 0.05$) than animals in the CTL group. The other metabolic parameters, body condition score and milk production were not affected by treatments ($P > 0.05$). The liver functionality index was not affected by treatments ($P > 0.05$). After the separation of the animals in groups of high and low index of liver function, the animals of the group with better liver function (high) had lower concentrations of beta-hydroxybutyrate ($P < 0.05$) and a trend of lower concentrations of non-esterified fatty acids ($P < 0.10$), whereas the animals with poor liver function (low) showed a tendency to have lower concentrations of albumin ($P < 0.10$). In conclusion, in this study the liver functionality index was not affected by treatments.

Keywords: Butafosfan, Catosal, Vitamin B₁₂, Liver, Inflammation.

Lista de Abreviaturas

AGNE – Ácidos graxos não esterificados

BEN – Balanço energético negativo

BHBA - Beta hidroxibutirato

ECC - Escore de condição corporal

IFH - Índice de funcionalidade hepática

IMS - Ingestão de matéria seca

TAG - Triacilglicerol

VLDL – *Very Low Density Lipoproteins* (Lipoproteínas de densidade muito baixa)

Sumário

1 INTRODUÇÃO GERAL	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3 HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	16
3.1 Hipótese.....	16
3.2 Objetivo Geral	16
3.3 Objetivos Específicos.....	16
4 CAPÍTULOS	17
Artigo 1 – Estratégia metafilática com fósforo orgânico e cianocobalamina para melhorar a funcionalidade hepática de vacas leiteiras após o parto.....	17
5 CONCLUSÃO GERAL.....	32
6 REFERÊNCIAS.....	33

1 INTRODUÇÃO GERAL

O período de transição é um momento crítico para a lactação da vaca, em virtude da ocorrência de inúmeras mudanças nutricionais, fisiológicas e sociais que culminam com a maior vulnerabilidade do organismo em apresentar desordens metabólicas e doenças infecciosas (Drackley, 1999) Estes fatos fazem da citação de Goff & Horst (1997) “a transição de um estado de prenhez, lactante, para um estado de não prenhez e lactante é frequentemente uma experiência desastrosa para a vaca”, uma importante consideração a respeito desse período.

Durante esse período o organismo tem de adaptar-se metabolicamente para garantir o adequado acesso de nutrientes à glândula mamária (Drackley, 1999). O fígado é fundamental nessa fase, em virtude de atuar no recebimento e processamento da maioria dos nutrientes que serão redistribuídos ao organismo (Overton, 2001). Atribuições hepáticas importantes dessa fase incluem o aumento na gliconeogênese e o processamento de ácidos graxos não esterificados (AGNE) (Drackley et al., 2001). Portanto, pode-se afirmar que os problemas com as vacas em transição estão relacionados à inadequada capacidade metabólica do fígado (Overton, 2001).

Mesmo diante dos processos adaptativos neste período, a demanda energética acaba sendo maior do que a capacidade do organismo, e os animais acabam enfrentando estados negativos de energia, marcado principalmente pela mobilização lipídica, perda de peso e de escore de condição corporal (ECC) (Drackley, 1999). No fígado, os AGNE podem ser completamente oxidados, transportados como triacilglicerol (TAG) pelas lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) ou induzir a síntese de vias alternativas de energia, como os corpos cetônicos (McArt et al., 2013). Em virtude da baixa capacidade hepática em exportar TAG via VLDL nessa fase, o fígado não consegue lidar com o excesso de AGNE, os quais se acumulam no órgão (lipidose hepática), prejudicando a função hepática e deprimindo ainda mais a ingestão de matéria seca (IMS) (Bobe et al., 2004).

Os efeitos negativos do balanço energético negativo (BEN) incluem a diminuição da IMS, da produção de leite, do desempenho reprodutivo, além de imunossupressão (Butler, 2000, McAart et al., 2013). Não é anormal que nessa fase 30% dos animais apresentem alguma desordem clínica. Além do BEN, esse período também é marcado por condições inflamatórias, em que citocinas pró-inflamatórias

são liberadas pelas células de defesa e acabam por induzir respostas de fase aguda que alteram o padrão normal de síntese hepática (Bertoni et al., 2008), afetando a sua funcionalidade, como pode ser observado, por exemplo, na diminuição da síntese de albumina e colesterol (Bionaz et al., 2007; Bertoni et al., 2008). As principais consequências para o organismo incluem lipotoxicidade (Kato, 2002) e diminuição da função hepática (Bionaz et al., 2007; Bertoni et al., 2008). Diante disso, garantir a saúde do animal em transição torna-se fundamental frente aos malefícios que essa fase pode trazer e estratégias que visem melhorar a funcionalidade hepática devem ser encorajadas.

Ambas as concentrações de fósforo e cianocobalamina diminuem após o parto (Girard & Matte, 2005; Grünberg et al., 2009) e afetam negativamente a produção de energia pelo animal. A suplementação de fósforo orgânico (butafosfan) e vitamina B₁₂ (cianocobalamina) em vacas leiteiras vêm se mostrando eficaz em minimizar o BEN e suas consequências (Fürrl et al., 2010; Rollin et al., 2010; Pereira et al., 2013a,b), por isso, a utilização dessa combinação pode potencialmente melhorar as condições de atuação hepática e o desempenho geral do animal.

O butafosfan é uma fonte orgânica de fósforo, importante no metabolismo energético celular, já que todos os compostos intermediários da via gliconeogênica devem ser fosforilados (Berg et al., 2006). A cianocobalamina, também conhecida como vitamina B₁₂, atua como precursor do cofator da enzima metilmalonil-CoA mutase, responsável pela conversão do propionato, um importante precursor glicogênico, em succinil-CoA, fundamental para a velocidade do ciclo de Krebs e a gliconeogênese (Girard & Matte, 2005). Sua falta pode afetar a produção de energia (Preynat et al., 2009) pela redução na atividade do ciclo de Krebs e acúmulo de acetil-CoA, gerando a diminuição da IMS, aumento da cetogênese e na predisposição à lipidose hepática (Girard & Matte, 2005). Diante disso, a utilização desses compostos pode potencialmente favorecer a produção energética e, assim, melhorar o funcionamento hepático das vacas.

A função hepática pode ser medida numericamente através do índice de funcionalidade hepática (IFH), que leva em consideração a variação na síntese hepática de proteínas: albumina, lipoproteínas (medida indiretamente como colesterol total) e bilirrubina (medida indireta das enzimas responsáveis pela sua depuração) (Bertoni & Trevisi, 2013).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Efeitos do butafosfan e da cianocobalamina sobre o metabolismo e função hepática de vacas leiteiras.

A transição entre o final da gestação e o início da lactação certamente é o estágio mais desafiador do ciclo de lactação de uma vaca (Drackley, 1999). Essa fase é marcada por variações endócrinas em resposta ao aumento nas necessidades nutricionais para a produção de leite (homeoesse), que cursam com alterações no metabolismo tecidual e afetam a utilização de nutrientes pelo organismo (Drackley et al., 2005).

O fígado tem um papel central nessa fase, pois tem que adequar-se às mudanças nas rotas metabólicas quanto à priorização, processamento e redistribuição ao organismo da maior parte dos nutrientes oriundos da dieta (Drackley et al., 2001). Como exemplo, a gliconeogênese e o processamento de elevadas quantidades de AGNE oriundos da lipólise são atribuições hepáticas para garantir a adequada disponibilidade de nutrientes à glândula mamária. Portanto, pode-se inferir que a adequada saúde hepática é primordial para o sucesso do período de transição e que os problemas com as vacas nessa fase estão relacionados à inadequada capacidade metabólica do fígado (Overton, 2001).

Mesmo diante de todos os processos adaptativos, o organismo não consegue dispor de toda a energia que precisa, e os animais frequentemente enfrentam períodos de BEN. O BEN provoca catabolismo tecidual, especialmente lipídico, com perda de peso e de condição corporal (Drackley et al., 1999) Os AGNE oriundos da lipólise são uma das principais fontes de energia nessa fase (Drackley et al., 2005), mas quando o excesso de AGNE no fígado supera a capacidade hepática de oxidação (β -oxidação), os AGNE podem ser re-esterificados em TAG e exportados ao organismo junto às VLDL. Como a capacidade de exportação via VLDL é limitada nessa fase, o excesso de TAG acumula-se no órgão, condição conhecida como lipidose hepática (Drackley, 1999; Bobe et al., 2004). Este acúmulo de gordura pode prejudicar ainda mais a função hepática, além de exacerbar os efeitos do BEN (Bobe et al., 2004). O excesso de AGNE também pode originar a síntese de corpos cetônicos e o desenvolvimento de cetose (Drackley et al., 2001). Elevadas concentrações de AGNE e corpos cetônicos estão associados à

imunossupressão no pós-parto (Moyes et al., 2009) e maior ocorrência de desordens metabólicas e infecciosas no início da lactação (Bohe et al., 2004; Drackley, 1999).

O período de transição também é marcado por inflamação (Bertoni et al., 2008), resultado da ação de citocinas pró-inflamatórias. No fígado, mesmo condições inflamatórias subclínicas induzem respostas de fase aguda (Bionaz et al., 2007; Bertoni et al., 2008) que alteram o padrão normal de síntese hepática. Os efeitos negativos das proteínas de fase aguda incluem lipotoxicidade (Kato, 2002), diminuição da função hepática e da produção leiteira (Bionaz et al., 2007; Bertoni et al., 2008). Vacas com disfunção hepática apresentaram menor eficiência energética (Trevisi et al., 2007).

Diante do exposto, não é incomum que esse curto espaço de tempo (30 dias) consiga abrigar mais de dois terços da ocorrência de todas as doenças metabólicas e infecciosas da lactação, o que faz da citação de Goff & Horst (1997) “A transição de um estado de prenhez, não lactante para um estado de não prenhez e lactante é frequentemente uma experiência desastrosa para a vaca” uma importante observação a respeito desse período, e reafirma o compromisso na busca de alternativas que possam incrementar o metabolismo energético e a função hepática, maximizando assim o desempenho produtivo dos animais.

O índice de funcionalidade hepática permite avaliar as consequências da inflamação durante o período de transição (Bertoni & Trevisi, 2013). O cálculo consiste em avaliar as variações nas concentrações de albumina, colesterol (medida indireta de lipoproteínas) e bilirrubina total (medida indireta das enzimas hepáticas responsáveis pela sua depuração) entre os dias 3 e 28 de lactação. A albumina, por exemplo, é reconhecida como uma proteína de fase aguda negativa, ou seja, que tem sua síntese diminuída em condições inflamatórias. Baixas concentrações de albumina podem indicar a redução da função hepática e desvio na síntese de proteínas (Bertoni et al., 2008).

O IFH é determinado após duas etapas: na primeira são calculados índices para os três metabólitos (albumina, colesterol e bilirrubina) conforme a fórmula para albumina e colesterol: $(0,5 \times V_0 + 0,5 \times (V_{28} - V_0))$ e para bilirrubina: $(0,67 \times V_0 + 0,33 \times (V_{28} - V_0))$, em que V corresponde ao valor (concentração) do metabólito no dia 3 ou 28, e 0,33, 0,5 ou 0,67 representam o quanto (percentualmente) do resultado final dos índices (etapa 1) é atribuído as concentrações encontradas no dia 3 ou à diferença entre os dois momentos. Na segunda etapa os índices encontrados

são inseridos numa fórmula com padrões numéricos pré determinados de acordo com resultados observados em vacas “saudáveis” (Bertoni et al., 2008).

$$IFH = \left[\left(\frac{I_{albumina} - 17,71}{1,08} \right) + \left(\frac{I_{colesterol} - 2,57}{0,43} \right) - \left(\frac{I_{bilirrubina} - 6,08}{2,17} \right) \right]$$

I = Índice

O IFH varia de -12 a +5 e indica alta e baixa resposta inflamatória, respectivamente. Valores acima de 0 são considerados benéficos (Bertoni & Trevisi, 2013). O IFH tem sido relacionado com o desempenho geral da vaca, condições inflamatórias e anormalidades metabólicas (Trevisi et al., 2010, 2013), ou seja, está relacionado com a melhor capacidade hepática em lidar com os desafios do período de transição.

Um das alternativas para incrementar o metabolismo energético e melhorar a função hepática, com isso minimizando desordens associadas ao período de transição, é a utilização da associação de butafosfan (100 mg/mL) e cianocobalamina (50 ug/mL), comercialmente conhecida como Catosal[®] (Bayer Saúde Animal, São Paulo). Esta combinação está presente no mercado desde 1958 e atualmente é comercializado em mais de 70 países. Resumidamente, o Catosal[®] é um estimulante metabólico e sua aplicação tem por objetivo alavancar energeticamente o metabolismo animal, principalmente nas fases de maior demanda metabólica, como o início da lactação.

Recentes trabalhos mostraram que a associação de butafosfan e cianocobalamina apresenta efeitos positivos sobre a minimização da ocorrência de cetose (Rollin et al., 2010), aumento na produção de leite (Kreipe et al., 2011; Pereira et al., 2013b) e melhoria na composição do leite (Pereira et al., 2013b), além de induzir respostas de melhora sobre indicadores do metabolismo energético como ingestão de matéria seca, AGNE e corpos cetônicos (Fürl et al., 2010; Pereira et al., 2013a; Rollin et al., 2010). O IFH mostrou-se melhor (valores próximos de 0) em animais com baixas concentrações de AGNE, corpos cetônicos (Bertoni et al., 2008; Trevisi et al., 2013) e elevadas concentrações de fósforo inorgânico (Grünberg et al., 2005).

A utilização de minerais orgânicos vem ganhando destaque nos últimos anos em virtude de sua melhor biodisponibilidade em relação aos inorgânicos (Maciel et

al., 2010). Minerais orgânicos são íons de metal ligados quimicamente a uma molécula orgânica (aminoácidos), formando uma estrutura química com características únicas de estabilidade e alta disponibilidade mineral (AAFCO, 1997). O butafosfan é uma fonte orgânica de fósforo, importante no metabolismo energético celular, já que todos os compostos intermediários da via gliconeogênica devem ser fosforilados (Berg et al., 2006). De acordo com Grünberg et al. (2009), as baixas concentrações de fósforo hepático após o parto foram relacionadas com baixa ingestão de matéria seca e diminuição da função hepática (Grünberg et al., 2005).

A cianocobalamina, ou também chamada de vitamina B₁₂, atua como precursor do cofator da enzima metilmalonil-CoA mutase. Essa enzima é responsável pela conversão do propionato, um importante precursor gliconeogênico, em succinil-CoA, portanto afetando a velocidade do ciclo de Krebs e a produção de energia pela gliconeogênese (Girard & Matte, 2005). Baixas concentrações de cianocobalamina após o parto estão associadas à baixa produção energética (Preynat et al., 2009), através do acúmulo de acetil-CoA pela baixa atividade do ciclo de Krebs. Um ciclo de Krebs menos ativo pode levar a mais lipólise e acúmulo de acetil-CoA, com respostas sobre a produção de cetose e acúmulo de gordura hepática (Girard & Matte, 2005).

O modo exato pelo qual essa combinação (butafosfan + cianocobalamina) age ainda é incerto e precisa ser melhor elucidado. Entretanto, achados de Kreipe et al. (2011) indicaram influências positivas sobre o metabolismo hepático, conforme demonstrado pela expressão de algumas enzimas associadas com a beta-oxidação, cetogênese e ciclo de Krebs após o tratamento com essa combinação. Diante do exposto, fica clara a oportunidade de utilização desses compostos para minimizar o desafio hepático de vacas no período de transição e com isso favorecer uma melhor adaptação do organismo às mudanças que ocorrem nessa fase.

3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1 Hipótese

O uso de estratégias farmacêuticas com fósforo orgânico (butafosfan) e vitamina B₁₂ (cianocobalamina) no início da lactação melhora a funcionalidade hepática de vacas leiteiras.

3.2 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do butafosfan e da cianocobalamina no início da lactação sobre o metabolismo energético, mineral, estado inflamatório e funcionalidade hepática de vacas leiteiras primíparas.

3.3 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos do butafosfan ou sua associação com cianocobalamina sobre o estado inflamatório (haptoglobina e paraoxonase) de vacas leiteiras primíparas após o parto;
- Avaliar os efeitos do butafosfan ou sua associação com cianocobalamina sobre marcadores do balanço energético (AGNE, BHBA e ECC) de vacas leiteiras primíparas após o parto;
- Avaliar os efeitos do butafosfan ou sua associação com cianocobalamina sobre marcadores minerais (cálcio e fósforo) de vacas leiteiras primíparas após o parto;
- Avaliar os efeitos do butafosfan ou sua associação com cianocobalamina sobre os indicadores da função hepática (albumina, colesterol e bilirrubina total) de vacas leiteiras primíparas após o parto.

4 CAPÍTULOS

4.1 Artigo 1 – Estratégia metafilática com fósforo orgânico e cianocobalamina para melhorar a funcionalidade hepática de vacas leiteiras após o parto.

Artigo formatado para ser submetido à revista *The Veterinary Journal*

M.M. Antunes^{a,b}, R.A. Pereira^{a,b}, P. Montagner^{a,b}, R.F. Prietsch^{a,b}, J.O. Feijó^{a,b}, C. Pizoni^{a,b}, A. Schneider^{b,c}, V.V. Rabassa^{a,b}, C.C. Brauner^{b,d}, F.A.B. Del Pino^{b,e}, M.N. Corrêa^{a,b*}

^aFaculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 96010-900, Pelotas, RS, Brasil

^bNúcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

^cFaculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 96010-610, Pelotas, RS, Brasil

^dFaculdade de Zootecnia, Universidade Federal de Pelotas, 96010-900, Pelotas, RS, Brasil

^eFaculdade de Química, Universidade Federal de Pelotas, 96010-900, Pelotas, RS, Brasil

* Correspondência para autor

End.: Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 96010-900, Pelotas, RS, Brasil. Tel.: +55 53 3275-7136, nupeec@gmail.com.

Endereço de e-mail: marcio.nunescorrea@gmail.com (M.N Corrêa).

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da aplicação de fósforo orgânico (butafosfan) e vitamina B₁₂ (cianocobalamina) sobre marcadores do metabolismo energético, mineral e inflamatório, produção de leite e sobre o índice de funcionalidade hepática de vacas leiteiras primíparas. Vinte e três vacas da raça Holandês foram aleatoriamente separadas em três grupos experimentais: Catosal (CAT, n = 8), que receberam total de 100 mL de Catosal[®]; Butafosfan (BUT, n = 8), que receberam total de 100 mL de solução aquosa de Butafosfan; e Controle (CTL, n = 7), que receberam total de 100 mL de solução fisiológica 0,9%. Todos os animais receberam os 100 mL divididos em 5 aplicações de 20 mL, em intervalos de 24 horas, por via subcutânea, iniciando logo após o parto. Os animais do grupo BUT apresentaram

menores concentrações ($P < 0,05$) de beta hidroxibutirato que os animais do grupo CTL. Os demais parâmetros metabólicos, o escore de condição corporal e a produção de leite não foram influenciados pelos tratamentos ($P > 0,05$). O índice de funcionalidade hepática não foi influenciado pelos tratamentos ($P > 0,05$). Após a separação dos animais em grupos de alto e baixo índice de função hepática, os animais do grupo com melhor função hepática (alto) apresentaram menores concentrações de beta hidroxibutirato ($P < 0,05$) e tendência de menores concentrações de ácidos graxos não esterificados ($P < 0,10$), enquanto que os animais com pior função hepática (baixo) apresentaram tendência de menores concentrações de albumina ($P < 0,10$). Em conclusão, neste estudo o índice de funcionalidade hepática não foi influenciado pelos tratamentos.

Palavras chave

Butafosfan, catosal, vitamina B₁₂, fígado, inflamação.

Introdução

O período de transição de vacas leiteiras é marcado por mudanças endócrinas que cursam com alterações no metabolismo tecidual e utilização de nutrientes pelo organismo (Drackley, 1999). Não é incomum que aproximadamente 75% de todas as desordens metabólicas e infecciosas ocorram nas primeiras três semanas de lactação (Drackley, 1999), oriundas da incapacidade adaptativa de muitos animais a essas alterações.

A capacidade do animal em se adaptar a essas mudanças passa em parte pela capacidade hepática de se adequar as demandas homeorréticas para a lactogênese. Resumidamente, o fígado precisa moldar-se ao aumento nos requerimento por glicose e ao maior recebimento de ácidos graxos não esterificados (AGNE) oriundos da lipólise (Drackley et al., 2001). Em condições inflamatórias ou de sobrecarga hepática, como o excesso de

AGNE, o fígado responde alterando o padrão normal de síntese hepática e torna-se menos eficiente frente aos desafios desse período (Bobe et al., 2004). Assim, propor alternativas que melhorem a funcionalidade hepática é a garantia de eficiência produtiva e rentabilidade das fazendas leiteiras.

O índice de funcionalidade hepática (IFH) permite a avaliação inflamatória do organismo ao final do primeiro mês de lactação (Bertoni & Trevisi, 2013). O cálculo do IFH considera as concentrações nos dias 3 e 28 após o parto de três metabólitos associados com a função hepática: albumina, colesterol e bilirrubina. De maneira geral, respostas positivas do IFH estão relacionadas com a melhor capacidade hepática frente aos desafios dessa fase.

Nosso grupo de pesquisa já realizou estudos com a combinação de butafosfan e cianocobalamina (Catosal[®], Bayer Saúde Animal, Brasil), que mostram efeitos benéficos sobre o perfil energético através da maior ingestão de matéria seca e menores concentrações séricas de AGNE e beta-hidroxibutirato (BHBA), além de efeitos positivos sobre a produção de leite (Pereira et al., 2013a,b). Bertoni et al. (2008) e Trevisi et al. (2013) observaram que as vacas com melhor função hepática apresentavam menores concentrações de AGNE e corpos cetônicos.

O butafosfan é uma fonte orgânica de fósforo, importante no metabolismo energético celular, já que todos os compostos intermediários da via gliconeogênica devem ser fosforilados (Berg et al., 2006). A cianocobalamina, também conhecida como vitamina B₁₂, atua como precursor do cofator da enzima metilmalonil-CoA mutase, responsável pela conversão de um importante precursor gliconeogênico dessa fase, o propionato, em succinil-CoA, fundamental para a velocidade do ciclo de Krebs e a gliconeogênese (Girard & Matte, 2005). Sabendo-se que as concentrações de fósforo (Grünberg et al., 2009) e cianocobalamina (Girard & Matte, 2005) estão reduzidas no pós-parto inicial, a suplementação dessas substâncias pode auxiliar o organismo com a produção de energia e melhoria do perfil

energético animal. A falta de cianocobalamina contribui para síndrome de lipidose hepática por diminuir a taxa de utilização do propionato para a gliconeogênese (Girard & Matte, 2005).

Como o momento da obtenção do resultado do IFH é muito distante (28 dias pós parto) para permitir ações preventivas, nenhum estudo até agora avaliou estratégias farmacêuticas de melhorar esse índice. Assim, trabalhamos com a hipótese de que esses compostos possam melhorar a função hepática de modo indireto através da melhora do perfil energético dos animais, permitindo que o fígado tenha mais suporte para lidar com os desafios desse período, minimizando as possíveis alterações de síntese hepática que ocorrem quando este órgão sofre agressões de diferentes formas.

Materiais e métodos

Animais e grupos experimentais

O experimento foi realizado em uma fazenda comercial localizada no sul do Brasil (32° 16' S, 52° 32' E) de outubro a dezembro de 2014. O rebanho da fazenda era composto por 800 vacas da raça Holandês em lactação, manejadas em sistema baseado no consumo de pastagens e suplementação de uma mistura de forragens e concentrado (NRC, 2001), com duas ordenhas diárias. A média de produção do rebanho era de 5.500 kg de leite por lactação.

Após o parto ($2,6 \pm 2,6$ dias), 23 vacas primíparas foram aleatoriamente distribuídas em três grupos experimentais: grupo Catosal (CAT, n = 8) que recebeu 5 doses de 20 mL de Catosal[®] B₁₂ (combinação de 10% butafosfan e 0,005% cianocobalamina - Bayer Saúde Animal, Brasil); grupo Butafosfan (BUT, n = 8) que recebeu 5 doses de 20 mL de solução aquosa de butafosfan 10% e grupo Controle (CTL, n = 7), que recebeu 5 doses de 20 mL de solução fisiológica 0,9% (Equiplex Indústria Farmacêutica[®], Brasil). Todas as aplicações foram realizadas por 5 dias em intervalos de 24 horas, a partir do dia 0, por via subcutânea e

de maneira asséptica, imediatamente antes da alimentação da manhã e após a coleta de sangue.

Coleta sanguínea e análises bioquímicas

Antes da alimentação da manhã, amostras de sangue foram coletadas de todos os animais, por punção do complexo arterio-venoso caudal, nos dias 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 e 28. As amostras foram centrifugadas a 3.000 g por 15 min, os soros foram divididos em três frascos e armazenados à -20°C para análises posteriores. Cálcio, fósforo, AGNES e BHBA foram analisados nos dias 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 e 28, enquanto que as concentrações de albumina, bilirrubina, colesterol total, haptoglobina e paraoxonase foram determinadas nos dias 0, 3, 5, 10, 15, 20 e 28. As análises de cálcio, fósforo, albumina, colesterol e bilirrubina foram realizadas com kits comerciais (Labtest[®], Brasil), por ensaio colorimétrico em espectrofotômetro semi-automático (SP 22, Biospectro[®], Brasil). A atividade da paraoxonase foi determinada com kit comercial (ZeptoMetrix Corporation[®], USA) por espectrofotometria cinética (T80 UV/VIS, PG Instruments Ltd[®], Inglaterra). A haptoglobina foi determinada com kit comercial (Sigma Aldrich, Life Science[®], USA) em leitora de microplacas (TP-Reader, Thermo Plate[®], Brasil). AGNES foram avaliados colorimetricamente com kit comercial (Wako NEFA-HR, Wako Chemicals[®], USA), de acordo com a técnica descrita por Ballou et al. (2009) e o BHBA foi analisado com kit comercial (Ranbut, Randox Laboratories Limited[®], UK). Os coeficientes de variação de todas as análises foram inferiores a 10%.

Escore de condição corporal e produção de leite

O escore de condição corporal foi avaliado visualmente, pelo mesmo avaliador, nos dias 0, 15 e 30 do experimento, de acordo com a escala de 5 pontos (ADAS, 1986), enquanto que a produção de leite (Kg/dia) foi registrada nos dias 15 e 30 do experimento, através da

leitura dos registros de produção de leite do software de gerenciamento leiteiro Alpro (Delaval[®], USA).

Determinação do índice de funcionalidade hepática e formação dos grupos

A determinação do IFH, que indica a diferença entre as concentrações plasmáticas do dia 3 e 28 após o parto de três índices hepáticos: albumina, lipoproteínas (indiretamente medida como colesterol total) e bilirrubina total (medida indireta das enzimas sintetizadas pelo fígado e que também são responsáveis pela sua depuração hepática) foi determinado considerando os diferentes tratamentos.

O IFH (adaptado de Trevisi et al., 2012) foi determinado após duas etapas: na primeira foram calculados índices para os três metabólitos, considerando-se os dias 0 e 28 do experimento e conforme a fórmula para albumina e colesterol: $(0,5 \times V0 + 0,5 \times (V28 - V0))$ e para bilirrubina: $(0,67 \times V0 + 0,33 \times (V0 - V28))$, em que **V** corresponde ao valor (concentração) do metabólito no dia 0 ou 28, e os coeficientes representam o quanto (percentualmente) do resultado final dos índices (etapa 1) é atribuído as concentrações encontradas no dia 0 ou à diferença entre os dois momentos. Para a albumina e o colesterol, tanto o dia 0 quanto a diferença entre os dias 28 e 0 representam 50% do resultado do índice, enquanto que para a bilirrubina a concentração no dia 0 representa 67% e a diferença entre os dias 0 e 28 os outros 33%. Na segunda etapa os índices parciais foram padronizados de acordo com as médias e desvios padrões encontrados em vacas “saudáveis” (Bertoni et al., 2008).

$$IFH = \left[\left(\frac{I_{albumina} - 17,71}{1,08} \right) + \left(\frac{I_{colesterol} - 2,57}{0,43} \right) - \left(\frac{I_{bilirrubina} - 6,08}{2,17} \right) \right]$$

I = Índice

O IFH varia de -12 à +5 e indica alta e baixa resposta inflamatória, respectivamente. Valores acima de 0 são considerados benéficos (Bertoni & Trevisi, 2013).

Todos os parâmetros foram avaliados levando-se em conta os três grupos experimentais. Após, independente do grupo, os animais foram retrospectivamente agrupados em dois grupos de acordo com o IFH observado (alto e baixo), e os parâmetros foram novamente avaliados.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o software SAS 9.0 (SAS Institute Inc[®], Cary, NC, USA, 2004). Todos os dados medidos ao longo do tempo (haptoglobina, paraoxonase, AGNES, BHBA, ECC, albumina, bilirrubina, colesterol, calico e fósforo e produção de leite) foram avaliados com a análise de variância (ANOVA) com o procedimento MIXED para avaliar efeitos de grupo, tempo e a interação grupo x tempo. O IFH entre os grupos foi avaliado usando o procedimento ANOVA. A avaliação da distribuição de frequências entre os grupos alto e baixo IFH foi feita através do *Fisher's Exact Test*. $P \leq 0,05$ foi considerado resposta estatística, enquanto tendência foi considerada em $P \leq 0,10$.

Resultados

O IFH das vacas variou de -9,3 à +1,9 e os níveis médios foram de: BUT: $-6,3 \pm 0,7$, CAT: $-5,9 \pm 1,3$ e CTL: $-7,9 \pm 1,1$. O IFH não diferiu entre os grupos ($P > 0,05$, Tabela 1). Entretanto, quando os animais foram separados em dois grupos (alto e baixo) de acordo com o IFH, o grupo com alto índice de funcionalidade hepática (-5,8 à +1,9, $n = 7$, média = $-3,7 \pm 1,4$) apresentou 85,7% de animais tratados com butafosfan ou butafosfan e cianocobalamina, enquanto que no grupo com baixo IFH (-9,3 à -8,3, $n = 7$, média = $-8,9 \pm 0,1$), 57% dos animais eram do grupo controle. Essa diferença não foi estatística ($P = 0,26$).

As concentrações de albumina, bilirrubina e colesterol, usadas para o cálculo do IFH, não foram diferentes entre os tratamentos ($P > 0,05$, Tabela 1), mas a albumina tendeu a ser

menor no grupo com Baixo IFH ($P=0,06$). As concentrações séricas de BHBA foram menores nos animais do grupo BUT do que nos animais do grupo CTL ($P=0,04$, Tabela 1). As concentrações séricas de AGNE não diferiam entre os tratamentos ($P>0,05$, Tabela 1). Quando os animais foram categorizados em alto e baixo IFH (independente do grupo de origem), os animais do grupo alto IFH tiveram menor BHBA ($P=0,04$) e tenderam a ter menor AGNE ($P=0,07$) do que os animais que se encontravam no grupo com baixo IFH.

As concentrações séricas de paraoxonase e haptoglobina não diferiram entre os tratamentos ($P>0,05$, Tabela 1) e entre os grupos com alto ou baixo IFH ($P>0,05$). As concentrações séricas de cálcio e fósforo não foram influenciadas pelos tratamentos ($P>0,05$, Tabela 1) e entre os grupos alto e baixo IFH ($P>0,05$). A produção de leite e o ECC também não foram diferentes em nenhum momento ($P>0,05$, Tabela 1).

Discussão

Diversos trabalhos já avaliaram os efeitos do butafosfan e da cianocobalamina sobre marcadores do metabolismo energético e produção de leite de vacas leiteiras (Fürl et al., 2010; Pereira et al., 2013a,b). Entretanto, esse é o primeiro estudo avaliando a influência desses compostos sobre o índice de funcionalidade hepática.

Trabalhos já demonstraram a segurança na utilização da associação de butafosfan e cianocobalamina. A utilização dessas substâncias não sobrecarrega ou causa lesão hepática, além de permitir ainda uma melhora na condição geral do órgão pela redução da atividade beta-oxidativa dos AGNE (Kreipe et al., 2011).

Trabalhos anteriores suportam nossa hipótese de que vacas em melhores condições energéticas tem melhor função hepática. Por exemplo, Bertoni et al. (2008) e Trevisi et al. (2013) observaram que as vacas com melhor função hepática apresentavam menores concentrações de AGNE e corpos cetônicos, enquanto que Grünberg et al. (2005) observaram

maiores concentrações de fósforo inorgânico em vacas com melhor função hepática. Neste trabalho, quando os animais foram separados em dois grupos de acordo com o resultado do IFH (Alto e Baixo), observamos que o grupo Alto IFH continha mais de 80% dos animais tratados com butafosfan ou butafosfan combinado à cianocobalamina, além de apresentar menor concentração de BHBA e tendência de menor AGNE, o que nos indica o uso potencial desses compostos para melhorar a função hepática através da melhoria no metabolismo energético dos animais. A mobilização lipídica em excesso pode favorecer o acúmulo de TAG no fígado e prejudicar ainda mais a função hepática (Bobe et al., 2004). Em contrapartida, o IFH não diferiu entre os grupos BUT, CAT e CTL, apesar dos animais do grupo BUT apresentar menores concentrações séricas de BHBA do que os animais do grupo CTL (Tabela 1).

Nós esperávamos melhores resultados com o uso da associação do butafosfan com a cianocobalamina e atribuímos os resultados do grupo BUT ao número limitado de animais em cada grupo. Apesar disso, os resultados do grupo BUT são suportados pelo papel do fósforo no metabolismo hepático de carboidratos, já que muitos intermediários na rota gliconeogênica devem ser fosforilados (Berg et al., 2006). De acordo com Grünberg et al. (2009), pequenas reduções nas concentrações de fósforo citosólico após o parto podem afetar a atividade metabólica do fígado.

Este trabalho foi realizado com primíparas. Analisando as concentrações médias de AGNE e BHBA, além da produção de leite e a manutenção do ECC em todos os grupos (Tabela 1), fica claro que os animais passaram por um baixo desafio metabólico (Kreipe et al., 2011; McAart et al., 2013). Neste caso, os tratamentos não tiveram os efeitos esperados, uma vez que a maioria dos trabalhos com a associação de butafosfan e cianocobalamina (Catosal[®]) tem sido realizado com multíparas, de elevado mérito genético e alta produção leiteira (Fürrl et al., 2010; Kreipe et al., 2011; Pereira et al., 2013b), em que o balanço energético negativo

intenso é uma ameaça constante. Além do mais, baixas concentrações de cianocobalamina e fósforo ocorrem principalmente em vacas de alta produção leiteira (Girard & Matte, 2005; Grünberg et al. 2009). Portanto, acreditamos que a utilização dos tratamentos em vacas com alta demanda metabólica poderia resultar em respostas mais satisfatórias.

Neste trabalho, os resultados gerais do IFH (Tabela 1) demonstram baixos índices de funcionalidade hepática, o que pode indicar que os animais tiveram de passar por algumas condições inflamatórias durante o periparto. Situações como troca de dieta, ambiente, interação social, entre outros, pode estimular respostas inflamatórias que afetam a funcionalidade hepática. O fato de termos trabalhado com novilhas nos faz crer que a transição para a lactação pode ter sido demasiadamente estressante e que os animais já apresentavam processos inflamatórios subclínicos antes do parto (Bertoni et al., 2008).

Nenhum dos parâmetros usados para o cálculo do IFH foi afetado pelos tratamentos. Entretanto, nós observamos algumas peculiaridades com relação a alguns marcadores. De maneira interessante, as concentrações médias de albumina ficaram abaixo do fisiológico para a espécie (2,7-3,8 mg/dL, Tabela 1), o que pode nos indicar a incapacidade hepática de sua síntese. Baixas concentrações de albumina podem indicar infiltração gordurosa no fígado (Bobe et al., 2004) e baixa função hepática (Burke et al., 2010). Além disso, altas concentrações de albumina no dia 28 são importantes para a melhora do IFH (Bertoni & Trevisi, 2013). As concentrações de bilirrubina foram duas vezes mais altas que o considerado normal em vacas “saudáveis” para o período, fato que pode indicar a incapacidade das enzimas hepáticas de fazerem sua depuração (Bertoni & Trevisi, 2013), provavelmente em virtude da baixa funcionalidade hepática.

Apesar de não serem utilizadas para o cálculo do IFH, as proteínas de fase aguda (haptoglobina e paraoxonase) são importantes indicadoras de processos inflamatórios e estão associadas às mudanças no padrão de síntese hepática (Bertoni et al., 2008). Neste estudo, as

concentrações de haptoglobina somente retornaram aos valores considerados “fisiológicos” (abaixo de 0,2 g/L (Bertoni et al., 2008) ao término do primeiro mês de lactação, em todos os grupos. Normalmente o pico de haptoglobina ocorre na primeira semana após o parto e atinge 0,4 a 0,5g/L (Bertoni & Trevisi, 2013), mas nós observamos pico ao parto e concentrações bem mais altas, o que nos faz crer que a transição à lactação possa ter sido demasiadamente estressante para as novilhas e que os animais já apresentavam processos inflamatórios subclínicos importantes no pré-parto (Bertoni et al., 2008).

Raros são os trabalhos que avaliaram a ação direta desses compostos sobre marcadores inflamatórios. No trabalho de Nuntaprasert & Watanapongchart (2006), o Catosal[®] foi capaz de reduzir a resposta de fase aguda através da diminuição das concentrações de haptoglobina, fator de necrose tumoral e interleucina-6. Entretanto, nesse estudo as avaliações foram feitas minutos após a administração das substâncias, diferente de nós que avaliamos as respostas um dia após. Esse fato nos dá um indício da rápida ação e resposta desses compostos, principalmente se levarmos em conta a meia vida plasmática do butafosfan de apenas 116 minutos (EMEA, 2000).

Achados de Füll et al. (2010) e Deniz et al. (2008) comprovam os benefícios da utilização do butafosfan e da cianocobalamina no pré-parto sobre marcadores do metabolismo energético. Portanto, a utilização desses compostos no pré-parto pode contribuir para uma resposta mais acurada sobre a influência desses tratamentos no IFH, e realmente avaliar se o butafosfan e a cianocobalamina têm o potencial de extrapolar os efeitos benéficos sobre o metabolismo energético para o índice de funcionalidade hepática. Além disso, mais trabalhos devem ser encorajados nessa área, principalmente com a utilização de vacas de alto desafio metabólico e que realmente se beneficiem dos efeitos do butafosfan e da cianocobalamina.

Conclusão

No presente estudo o tratamento com butafosfan ou butafosfan associado à cianocobalamina não foi capaz de alterar o índice de funcionalidade hepática de vacas leiteiras primíparas.

Declaração de conflito de interesse

Nenhum dos autores desse artigo tem relação financeira ou pessoal com outras pessoas ou organizações que possam influenciar ou confundir inapropriadamente o conteúdo desse trabalho.

Agradecimentos

Aos integrantes do Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC) que auxiliaram no projeto. Ao gerente da pecuária leiteira e aos demais funcionários da Granjas 4 Irmãos S.A. pelo apoio na realização do trabalho.

Referências

- ADAS - Agricultural development and advisory service, 1986. Condition scoring of dairy cows. Publ. 612, Agric. Dev. Advisory Serv., Min. Agric., Fisheries Food, Lion House, Alnwick, Northumberland, UK.
- Ballou, M.A., Gomes, R.C., Juchem, S.O., DePeters, E.J., 2009. Effect of dietary supplemental fish oil during the peripartum period on bloodmetabolites and hepatic fatty acid compositions and total triacylglycerol concentration of multiparous Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 92, 657-669.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2006. Glycolysis and gluconeogenesis. In: *Biochemistry*, Sixth Ed. W. H. Freeman and Company, New York, NY, USA, pp. 433-474.
- Bertoni, G., Trevisi, E., 2013. Use of the liver activity index and other metabolic variables in the assessment of metabolic health in dairy cows. *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice* 29, 413-431.

- Bertoni, G., Trevisi, E., Bionaz, M., 2008. Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 91, 3300-3310.
- Bobe, G., Young, J.W., Beitz, D.C., 2004. Pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 87, 3105-3124.
- Burke, C.R., Meier, S., McDougall, S., Compton, C., Mitchell, M., Roche, J.R., 2010. Relationships between endometritis and metabolic state during the transition period in pasture-grazed dairy cows. *Journal of Dairy Science* 93, 5363-5373.
- Deniz A, Westphal B, Illing C., 2008. Effects of prepartum metaphylactic treatment with Catosal on postpartum metabolic functions in cows. Oral and Poster Presentations. Proceedings of the XXVth World Buiatrics Congress. Budapest, Hungary, pp. 26-31.
- Drackley, J.K., 1999. ADSA Foundation Scholar Award - Biology of dairy cows during the transition period: the final Frontier? *Journal of Dairy Science* 82, 2259-2273.
- Drackley, J.K., Overton, T.R., Dowlen, H.H., 2001. Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. *Journal of Dairy Science* 84, E110-E112.
- EMA, 2000. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Veterinary Medicines and Information Technology Unit. EMA/MRL/734/00-FINAL, p 1-2. EMA, London, UK.
- Fürll, M., Deniz, A., Westphal, B., Illing, C., Constable, P.D., 2010. Effects of multiple intravenous injections of butaphosphan and cyanocobalamin on the metabolism of periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science* 93, 4155-4164.
- Girard, C.L and Matte, J.J., 2005. Effects of intramuscular injections of vitamin B12 on lactation performance of dairy cows fed dietary supplements of folic acid and rumen-protected methionine. *Journal of Dairy Science* 88, 671-676.
- Grünberg, W., Constable, P.D., Schröder, U., Staufenbiel, R., Morin, D.E., Rohn, M., 2005. Phosphorus homeostasis in dairy cows with abomasal displacement or abomasal volvulus. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 20, 1471-1478.
- Grünberg, W., Staufenbiel, R., Constable, P.D., Dann, H.M., Morin, D.E., Drackley, J.K., 2009. Liver phosphorus content in Holstein-Friesian cows during the transition period. *Journal of Dairy Science* 92, 2106-2117.
- Kreipe, L., Deniz, A., Bruckmaier, R.M., van Dorland, H.A., 2011. First report about the mode of action of combined butaphosphan and cyanocobalamin on hepatic metabolism in nonketotic early lactating cows. *Journal of Dairy Science* 94, 4904-4914.
- McArt, J.A.A., Nydam, D.V., Oetzel, G.R., Overton, T.R., Ospina, P.A., 2013. Review - Elevated non-esterified fatty acids and β -hydroxybutyrate and their association with transition dairy cow performance. *The Veterinary Journal* 192, 560-570.

- NRC - National Research Council, 2001. In: Nutrient Requirements of Dairy Cattle, Seventh Ed. Academy Press, Washington DC, USA.
- Nuntaprasert, A., Watanapongchart, S., 2006. A field effect of Catosal on the acute phase response, performance and metabolic disorders of farrowing sows in Thailand. In: Proceedings of the 19th International Pig Veterinary Society Congress, Copenhagen, Denmark, pp. 487.
- Pereira, R.A., Fensterseifer, S., Barcelos, V.B., Martins, C.F., Schneider, A., Schmitt, E., Pfeifer, L.F.M., Delpino, F.A.B., Corrêa, M.N., 2013a. Metabolic parameters and dry matter intake of ewes treated with butaphosphan and cyanocobalamin in the early postpartum period. *Small Ruminant Research* 114, 140-145.
- Pereira, R.A., Silveira, P.A.S., Montagner, P., Schneider, A., Schmitt, E., Rabassa, V.R., Pfeifer, L.F.M., Delpino, F.A.B., Pulga, M.E., Corrêa, M.N., 2013b. Effect of butaphosphan and cyanocobalamin on postpartum metabolism and milk production in dairy cows. *Animal* 7, 1143-1147.
- Trevisi, E., Amadori, M., Cogrossi, S., Razzioli, E., Bertoni, G., 2012. Metabolic stress and inflammatory response in high-yielding, periparturient dairy cows. *Research in Veterinary Science* 93, 695-704.
- Trevisi, E., Ferrari, A., Piccioli-Cappeli, F., Grossi, P., Bertoni, G., 2010. An additional study on the relationship between the inflammatory condition at calving time and net energy efficiency in dairy cows. *EAAP Scientific Series*. In: Croveto, G. M. (Ed). *Energy and protein metabolism and nutrition*, v. 127. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, Netherlands, pp. 489-490.

Tabela 1

Médias (\pm erro padrão da média) de parâmetros metabólicos (paraoxonase, haptoglobina, albumina, colesterol, bilirrubina, cálcio, fósforo), IFH, ECC e produção de leite de vacas primíparas tratadas com Butafosfan, Butafosfan e Cianocobalamina (Catosal) ou solução fisiológica (Controle).

Parâmetro	Grupos			Valor de P		
	BUT	CAT	CTL	Grupo	Dia	Grupo x Dia
IFH ¹	-6,38	-5,94	-7,97	0,31	-	-
BHBA ² (mmol/L)	0,421 ^a \pm 0,02	0,455 ^{ab} \pm 0,02	0,500 ^b \pm 0,02	0,04	<0,0001	0,88
AGNE ³ (mmol/L)	0,307 \pm 0,02	0,359 \pm 0,02	0,342 \pm 0,02	0,10	<0,0001	0,12
Paraoxonase (U/L)	91,9 \pm 5,4	100,0 \pm 5,7	106,2 \pm 5,8	0,20	0,09	0,61
Haptoglobina (g/L)	0,420 \pm 0,1	0,500 \pm 0,1	0,494 \pm 0,1	0,77	<0,0001	0,43
Albumina (g/L)	2,47 \pm 0,1	2,59 \pm 0,1	2,61 \pm 0,1	0,23	0,14	0,85
Colesterol (mg/dL)	103,1 \pm 3,6	108,7 \pm 4,0	109,5 \pm 4,1	0,41	0,01	0,88
Bilirrubina (mmol/L)	11,10 \pm 0,4	11,57 \pm 0,5	11,33 \pm 0,5	0,83	<0,0001	0,07
Cálcio (mg/dL)	9,62 \pm 0,1	9,56 \pm 0,1	9,29 \pm 0,1	0,31	0,06	0,53
Fósforo (mg/dL)	6,13 \pm 0,2	6,05 \pm 0,2	6,28 \pm 0,2	0,76	0,15	0,45
ECC ⁴	2,56 \pm 0,1	2,58 \pm 0,1	2,47 \pm 0,1	0,49	0,99	0,77
Produção de (L/dia)	19,23 \pm 1,3	20,13 \pm 1,2	19,18 \pm 1,3	0,84	0,03	0,47

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($P < 0,05$). $P < 0,10$ indicam tendência.

¹ Índice de funcionalidade hepática; ² Beta hidroxibutirato; ³ Ácidos graxos não esterificados; ⁴ Escore de condição corporal.

5 CONCLUSÃO GERAL

No presente estudo o butafosfan e o butafosfan associado à cianocobalamina não foram capazes de alterar o índice de funcionalidade hepática de vacas leiteiras primíparas. Mais estudos são necessários para determinar se a utilização desses compostos durante o pré-parto e em animais com elevado desafio metabólico pode potencialmente melhorar a funcionalidade hepática através da melhoria do perfil energético das vacas. Uma das dificuldades do trabalho foi o número limitado de animais e a falta de múltíparas disponíveis no momento da realização do trabalho.

6 REFERÊNCIAS

AAFCO (1997). ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS. ATLANTA.

BERG, J.M., TYMOCZO, J.L., STRYER, L. (2006). Glycolysis and gluconeogenesis. In: Berg, J.M., Tymoczko, J.L. & Stryer, L. Biochemistry. 6° ed. New York, NY: W. H. Freeman and Company.

BERTONI, G. & TREVISI, E. (2013). Use of the liver activity index and other metabolic variables in the assessment of metabolic health in dairy cows. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 29. p. 413-431.

BERTONI, G., TREVISI, E., BIONAZ, M. (2008). Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 91. p. 3300-3310.

BIONAZ, M., TREVISI, E., CALAMARI, L., LIBRANDI, F., FERRARI, A., BERTONI, G. (2007). Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 90. p. 1740-1750.

BOBE, G., YOUNG, J.W., BEITZ, D.C. (2004). Pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 87. p. 3105-3124.

DRACKLEY, J.K. (1999). ADSA Foundation Scholar Award - Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? *Journal of Dairy Science*. 82. p. 2259-2273.

DRACKLEY, J.K., OVERTON, T.R., DOWLEN, H.H. (2001). Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. *Journal of Dairy Science*. 84. E110-E112.

DRACKLEY, J.K., DANN, H.M., DOUGLAS, G.N., GURETZKY, N.A.J., LITHERLAND, N.B., UNDERWOOD, J.P., LOOR, J.J. (2005). Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. *Italian Journal of Animal Science*. 4. p. 323-344.

FÜRLL, M., DENIZ, A., WESTPHAL, B., ILLING, C. & CONSTABLE, P.D. (2010). Effects of multiple intravenous injections of butaphosphan and cyanocobalamin on the metabolism of periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 93. p. 4155-4164.

GIRARD, C.L & MATTE, J.J. (2005). Effects of intramuscular injections of vitamin B12 on lactation performance of dairy cows fed dietary supplements of folic acid and rumen-protected methionine. *Journal of Dairy Science*. 88. p. 671-676.

GOFF, J.P. & HORST, R.L. (1997). Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *Journal of Dairy Science*. 80, p. 1260-1268.

GRÜNBERG, W., CONSTABLE, P.D. SCHRÖDER, U., STAUFENBIEL, R., MORIN, D.E., ROHN, M. (2005). Phosphorus homeostasis in dairy cows with abomasal displacement or abomasal volvulus. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 20. p. 1471-1478.

GRÜNBERG, W. STAUFENBIEL, R., CONSTABLE, P.D., DANN, H.M., MORIN, D.E., DRACKLEY, J.K. (2009). Liver phosphorus content in Holstein-Friesian cows during the transition period. *Journal of Dairy Science*. 92. p. 2106-2117.

KATOH, N. (2002). Relevance of apolipoproteins in the development of fatty liver and fatty liver-related peripartum diseases in dairy cows. *Journal of Veterinary Medical Science*. 64. p. 293-307.

KREIPE, L., DENIZ, A., BRUCKMAIER, R.M., VAN DORLAND, H.A. (2011). First report about the mode of action of combined butaphosphan and cyanocobalamin on hepatic metabolism in nonketotic early lactating cows. *Journal of Dairy Science*. 94. p. 4904-4914.

MACIEL, M.P., SARAIVA, E.P., AGUIAR, E.F., RIBEIRO, P.A.S., PASSOS, D.P., SILVA, J.B. (2010). Effect of using organic microminerals on performance and external quality of eggs of commercial laying hens at the end of laying. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 39. p. 344-348.

MCART, J.A.A., NYDAM, D.V., OETZEL, G.R., OVERTON, T.R. & OSPINA, P.A. (2013). Elevated non-esterified fatty acids and β -hydroxybutyrate and their association with transition dairy cow performance. *The Veterinary Journal*. 198. p. 560-570.

MOYES, K.M., LARSEN, T., FRIGGENS, N.C., DRACKLEY, J.K., INGVAERTSEN, K.L. (2009). Identification of potential markers in blood for the development of subclinical and clinical mastitis in dairy cattle at parturition and during early lactation. *Journal of Dairy Science*. 92. p. 5419-5428.

OVERTON, T.R. (2001). Healthy livers make for healthy cows. *Advances in Dairy Technology*. 13. p. 169-180.

PEREIRA, R.A., FENSTERSEIFER, S., BARCELOS, V.B., MARTINS, C.F., SCHNEIDER, A., SCHMITT, E., PFEIFER, L.F.M., DELPINO, F.A.B., CORRÊA, M.N. (2013a). Metabolic parameters and dry matter intake of ewes treated with butaphosphan and cyanocobalamin in the early postpartum period. *Small Ruminant Research*. 114. p. 140-145.

PEREIRA, R.A., SILVEIRA, P.A.S., MONTAGNER, P., SCHNEIDER, A., SCHMITT, E., RABASSA, V.R., PFEIFER, L.F.M., DELPINO, F.A.B., PULGA, M.E., CORRÊA, M.N. (2013b). Effect of butaphosphan and cyanocobalamin on postpartum metabolism and milk production in dairy cows. *Animal*. 7(7). p. 1143-1147.

PREYNAT, A., LAPIERRE, H., THIVIERGE, M.C., PALIN, M.F., MATTE, J.J., DESROCHERS, A., GIRARD, C.L. (2009). Effects of supplements of folic acid, vitamin B12, and rumen-protected methionine on whole body metabolism of methionine and glucose in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 92. p. 677-689.

ROLLIN, E., BERGHAUS, R.D., RAPNICKI, P., GODDEN, S.M., OVERTON, M.W. (2010). The effect of injectable butaphosphan and cyanocobalamin on postpartum serum β -hydroxybutyrate, calcium, and phosphorus concentrations in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 93. p.978-987.

TREVISI, E., BERTONI, G., LOMBARDELLI, R., MINUTI, A. (2013). The role of inflammation and liver function with the plasma cortisol response to

adrenocorticotropin in early lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 96. p. 5712-5722.

TREVISI, E., FERRARI, A., PICCIOLI-CAPPELI, F., GROSSI, P., BERTONI, G. (2010). An additional study on the relationship between the inflammatory condition at calving time and net energy efficiency in dairy cows. In: Croveto, G. M. (ed). EAAP Scientific Series. v.127. Wageningen Academic Publishers.

TREVISI, E., HAN, X.T., PICCIOLI-CAPPELLI, F. (2007). Intake reduction before calving affects milk yield and metabolism in dairy cows. In: Honing, V. Y. (Ed). Proceedings of the 53rd Annual Meeting EAAP. V. 53. Cairo, Egypt, Wageningen Academic Publishers. pp. 54.