

CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE FERRO E HEPCIDINA EM VACAS LEITEIRAS SUPLEMENTADAS COM *LITHOTHAMNIUM CALCAREUM* DESAFIADAS COM UMA DIETA RICA EM AMIDO

MAGNA FABRÍCIA BRASIL SAVELA¹; LAURA VALADÃO VIEIRA²; URIEL SECCO LONDERO²; ELIZA ROSSI KOMNINOU²; RAQUELI TERESINHA FRANÇA²; MARCIO NUNES CORRÊA³

¹Universidade Federal de Pelotas/NUPEEC HUB – fabibrasil93@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas/NUPEEC HUB – nupeec@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas/NUPEEC HUB – marcio.nunescorreia@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A acidose ruminal subaguda (SARA) é um distúrbio metabólico que afeta as vacas leiteiras e é considerada a segunda principal enfermidade em bovinos confinados, ficando atrás somente do Complexo Respiratório Bovino (MACEDO et al., 2020). A SARA está associada à ingestão de grandes quantidades de carboidratos rapidamente fermentáveis, como as dietas ricas em grãos que resultam no aumento de ácidos graxos voláteis (AGV) no rúmen, levando à diminuição do pH ruminal e intestinal (GOLDER et al., 2023).

As consequências do pH ácido estão associadas à liberação de grandes quantidades de endotoxinas no fluido ruminal e intestinal, que são translocadas através dos tecidos do rúmen e do cólon para a circulação, resultando em uma inflamação sistêmica no animal (VOULGARAKIS et al., 2023). Uma vez na circulação, as toxinas ativam a cascata pró-inflamatória, levando a um aumento da secreção de marcadores da inflamação, como as proteínas de fase aguda, interleucinas (IL-1, IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF- α), esses marcadores são utilizados no diagnóstico de doenças inflamatórias; no entanto, sua mensuração é considerada cara (PLAIZER et al. 2018).

O ferro sérico (Fe), é um micronutriente essencial para todos os tecidos do animal e suas concentrações séricas são baratas e de fácil mensuração (MURAKAMI et al., 2023). Estudos indicam que as concentrações séricas de Fe diminuem em condições que requerem ativação da resposta de fase aguda, podendo ser utilizado como marcador de inflamação aguda em bovinos (BAYDAR & DABAK, 2014). A homeostase sistêmica do Fe é regulada pela hepcidina, uma proteína sintetizada no fígado, que tem seus níveis aumentados durante a inflamação. A redução dos níveis de Fe pela hepcidina ocorre devido à sua ligação à ferroportina, único exportador do ferro da célula para a circulação, bloqueando dessa forma a saída de ferro celular (NEMETH & GANZ, 2023). Essa diminuição é importante para a defesa do hospedeiro, uma vez que o Fe é necessário para a virulência e replicação de microrganismos (SATUÉ et al., 2023).

Dessa forma, a diminuição do Fe, associada à elevação da hepcidina, tem sido associada à ocorrência de infecção, inflamação e estresse oxidativo em humanos (SUEGA et al., 2019), e outras espécies animais (QASIM & BADAWI, 2023). No entanto, estudos que avaliam a relação de Fe sérico e hepcidina para diagnosticar inflamação aguda em bovinos ainda são escassos (ERKILIC et al., 2016).

Visando evitar a SARA e o desenvolvimento de inflamação sistêmica em bovinos, tampões ruminais são adicionados em dietas altamente energéticas. A alga marinha *Lithothamnium calcareum*, tem sido bastante estudada nos últimos

anos como tampão ruminal com o objetivo de manter a saúde ruminal (NEVILLE et al. 2022). Assim, o objetivo deste estudo foi comparar os efeitos de algas marinhas calcárias (*Lithothamnium calcareum*, LithoNutri, Oceana Minerals) com um controle à base de bicarbonato de sódio, sobre o tamponamento ruminal e os níveis séricos de ferro e hepcidina em vacas leiteiras da raça Holandesa alimentadas com uma dieta rica em amido.

2. METODOLOGIA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas, registrado sob número 13784-2021. O experimento foi conduzido em uma propriedade leiteira comercial localizada no município de Rio Grande, Rio Grande do Sul, nas coordenadas geográficas 32°16'S, 52°32'E, sendo as vacas mantidas em um galpão com cama de material orgânico coletiva (sistema *Bedded-pack barn*), com alimento e água *ad libitum*, com acesso a comedouros automatizados e individuais e água a vontade.

Foram utilizados para o estudo trinta e seis vacas multíparas da raça Holandês, com 63.74 ± 18.63 dias em lactação (DEL), pesando 694 ± 20 kg, com paridade média de $3 \pm 0,59$ lactações, e média de produção de leite pré-experimental 38.83 ± 9.29 kg/d, distribuídas aleatoriamente em dois grupos: Controle (CON) e *Lithothamnium calcareum* (LITHO), ambos compostos por três animais, durante um período experimental de 60 dias. Os dois grupos experimentais receberam a mesma dieta basal, uma ração total misturada (TMR), com uma relação concentrado:volumoso de 54:46% e 29,28% de amido na TMR. As diferenças entre os grupos foram a inclusão de 0,5% da MS da dieta de *Lithothamnium calcareum* para o grupo LITHO e para o grupo CON um total de 1,1% da MS de bicarbonato de sódio. Ambos os tamponantes foram previamente misturados no cocho à TMR, imediatamente antes da oferta.

Amostras de sangue foram coletadas por punção do complexo arteriovenoso coccígeo utilizando o sistema Vacutainer (BD Diagnostics, São Paulo, Brazil) nos dias 0, antes da suplementação com tampão, e nos dias 21, 42 e 60 em tubo para análises de ferro sérico (Fe_s) e hepcidina (He). Os níveis de ferro sérico (Fe_s) foi mensurado em analisador bioquímico automático (Labmax Plenno, Labtest®, Minas Gerais, Brazil), utilizando kit comercial de acordo com as recomendações do fabricante (Labtest®, Minas Gerais, Brazil). A concentração de hepcidina foi mensurada pelo método de ELISA (ELK Biotechnology, Wuhan, China). Amostras de líquido ruminal foram coletados por ruminocentese 4h após a alimentação matinal no dia 0, anterior a suplementação, e após nos dias 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 e 60 do experimento. O pH do líquido ruminal foi imediatamente mensurado através de um Phametro de bancada.

Os resultados foram analisados usando o programa estatístico JMP Pro 17 (SAS Institute inc., North Carolina, USA) por Mixed Models, tendo como efeitos fixos o grupo, coleta e interação deles.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de pH ruminal 4h após a alimentação matinal não diferiram entre os grupos LITHO e CON (6,70 e 6,80 respectivamente, $P > 0,10$) encontrando-se dentro dos níveis fisiológicos para a espécie (Beigh et al., 2018). As concentrações de ferro e de hepcidina não diferiram entre os grupos LITHO e CON ($P > 0.05$) conforme demonstrado na tabela 1.

Tabela 1. Ferro e Hepcidina sérica de vacas Holandesas alimentadas com dietas contendo 29,28% de amido, suplementadas com *Lithothamnium calcareum* (LITHO) e Bicarbonato de sódio (CON).

Parâmetros	Tratamento média±EP ¹		Valor de P
	LITHO	CON	
Ferro (µg/dL)	142.58±6.41	136.15±6.47	0.48
Hepcidina (ng/mL)	1.47±0.19	1.47±0.19	0.99

No presente estudo, vacas de ambos os grupos LITHO e CON recebendo dieta rica em amido não apresentaram alterações significativas nas concentrações de Fe, bem como, mantiveram o pH ruminal dentro do fisiológico. Este resultado sugere que ambos os tratamentos foram eficazes em controlar a SARA dos animais não sendo evidenciadas alterações inflamatórias. Uma vez que estudos demonstram diminuição das concentrações de ferro em doenças infecciosas e não infecciosas, mas que levam a inflamação, ZEBELLI et al. (2010) observaram concentrações plasmáticas diminuídas de Fe durante respostas inflamatórias em vacas e tais alterações foram relacionadas ao aumento da endotoxina ruminal induzido pela ingestão de dietas ricas em concentrado pelas vacas. ANTANAÍTIS et al. (2019) observou que o ferro diminuiu em vacas com SARA e cetose, comparativamente ao controle sadio. Estudos de TSUKANO et al. (2021) e TSUKANO et al. (2019) demonstram que as concentrações séricas de Fe diminuíram significativamente em bovinos de corte com doenças respiratórias e em bezerros durante as primeiras 24 horas após a descorna. Já BAYDAR & DABAK (2014) relataram diminuição dos níveis de Fe em vacas com mastite e reticulo pericardite traumática.

Da mesma forma que os níveis de Fe, os níveis de hepcidina não apresentaram alteração entre os grupos. Embora ainda haja poucas pesquisas explorando o uso da hepcidina como marcador inflamatório em ruminantes, estudos demonstram que a síntese de hepcidina aumenta durante doenças que induzem infecção e inflamação, principalmente por estimulação da interleucina-6 (NEMETH & GANZ, 2023). Durante a inflamação ocorre um aumento na concentração sistêmica de interleucina-6, que estimula os hepatócitos a liberarem hepcidina. Esta, por sua vez, bloqueia a saída de ferro das células (hepatócitos, enterócitos e macrófagos) ao se ligar à ferroportina, a única responsável por exportar o ferro das células para o sangue. Esse mecanismo reduz a concentração de ferro necessário para o desenvolvimento e replicação microbiana (NEMETH & GANZ, 2023).

Os resultados deste estudo sugerem que o *Lithothamnium calcareum* foi eficaz no controle do desenvolvimento da SARA e na prevenção da translocação de endotoxinas para a circulação sanguínea, mantendo os níveis de Fe sérico inalterados.

4. CONCLUSÕES

A suplementação de *Lithothamnium calcareum* em uma dieta rica em amido, no presente estudo, foi eficaz em manter o pH ruminal dentro dos níveis adequados, sem causar diferenças nas concentrações de ferro e hepcidina em relação ao grupo controle, que recebeu bicarbonato de sódio. Esses resultados indicam que ambos os tampões foram igualmente eficazes no controle da SARA e na prevenção da

inflamação. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar esses achados e explorar melhor seus mecanismos de ação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTANAITIS, R., JUOZAITIENĖ, V., MALAŠAUSKIENĖ, D., & TELEVIČIUS, M. Can rumination time and some blood biochemical parameters be used as biomarkers for the diagnosis of subclinical acidosis and subclinical ketosis? **Veterinary and animal science**, 8, 100077, 2019.
- BAYDAR E. & DABAK M. Serum iron as an indicator of acute inflammation in cattle. **Journal of Dairy Science**. 97: 222-228, 2014.
- GOLDER, H. M., LEBLANC, S. J., DUFFIELD, T., ROSSOW, H. A., Bogdanich, R., Hernandez, L., ... & Lean, I. J. Characterizing ruminal acidosis risk: A multiherd, multicountry study. **Journal of Dairy Science**, 106(5), 3155-3175, 2023.
- MACEDO, G. G., KAMURA, B.C, FERREIRA, L. V. O. Aspectos gerais da acidose ruminal subaguda. **Ciência Animal**, 30(3), 85-96, 2020.
- MURAKAMI, Y., TSUKANO, K., HIRATA, H., & SUZUKI, K. (2023). Evaluation of blood serum iron concentration as an alternative biomarker for inflammation in dairy cows. **Biological Trace Element Research**, 201(10), 4710-4717.
- NEMETH, E; GANZ, T. Hepcidin and iron in health and disease. **Annual review of medicine**, v. 74, p. 261-277, 2023.
- NEVILLE, E.W.; FAHEYF, A.G.; MEADE, K.G.; MULLIGAN, F.J. Effects of calcareous marine algae on mil yield, feed intake, energy balance, mineral status, and inflammatory markers in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**. V 105. P 6616–6627. 2022.
- PLAIZIER JC, DANESH MESGARAN M, DERAKHSHANI H, GOLDER H, KHAFIPOUR E, KLEEN J.L. Review: Enhancing gastrointestinal health in dairy cows. **Animal**.12:s399-s418, 2018.
- QASIM, N. A. A. K., & BADAWI, N. M. The Haematological Values and Serum Iron Profile in Dogs with Some Pathological and Physiological Conditions. **Journal of Survey in Fisheries Sciences**, 10(3S), 737-745, 2023.
- SUEGA, K., & WIDIANA, G. R. Predicting hepcidin level using inflammation markers and iron indicators in patients with anemia of chronic disease. **Hematology, transfusion and cell therapy**, 41, 342-348, 2019.
- TSUKANO K., SHIMAMORI T., FUKUDA T., NISHI Y., OTSUKA M., KITADE Y. & SUZUKI K. Serum iron concentration as a marker of inflammation in young cows that underwent dehorning operation. **Journal of Veterinary Medical Science**. 81: 626-628, 2019.
- TSUKANO K., SHIMAMORI T. & SUZUKI K. Serum iron concentration in cattle with endotoxaemia. **Acta Veterinaria Hungarica**. 68: 53-58.2020.
- VOULGARAKIS, N., GOUGOULIS, D., PSALLA, D., PAPAKONSTANTINO, G., ANGELIDOU-TSIFIDA, M., PAPATSIROS, V., ... & CHRISTODOULOPOULOS, G. Ruminal Acidosis Part I: Clinical manifestations, epidemiology and impact of the disease. **Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society**, 74(3), 5883-5891, 2023.
- ZEBELI, Q.; DUNN, S. M.; AMETAJ, B. N. Strong associations among rumen endotoxin and acute phase proteins with plasma minerals in lactating cows fed graded amounts of concentrate. **Journal of animal science**, v. 88, n. 4, p. 1545-1553, 2010.