



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

JOÃO VICTOR JOSÉ DE BARROS DANTAS

**Relação da expressão da chemerina placentária com biomarcadores de perfil
metabólico em vacas no momento do parto**

RECIFE

2024

JOÃO VICTOR JOSÉ DE BARROS DANTAS

Relação da expressão da chemerina placentária com biomarcadores de perfil metabólico em vacas no momento do parto

Monografia apresentada à coordenação do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza

RECIFE

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Bibliotecário(a): Auxiliadora Cunha – CRB-4 1134

D192r Dantas, João Victor José de Barros.
Relação da expressão da chemerina placentária com biomarcadores de perfil metabólico em vacas no momento do parto / João Victor José de Barros Dantas. – Recife, 2024. 42 f.; il.

Orientador(a): Paulo Roberto Eleutério de Souza.
Co-orientador(a): Pierre Soares Castro.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em Ciências Biológicas, Recife, BR-PE, 2024.

Inclui referências.

1. Chemerina. 2. Periparto. 3. Homeostase. 4. Balanço energético negativo I. Souza, Paulo Roberto Eleutério de, orient. II. Castro, Pierre Soares, coorient. III. Título

CDD 574

Relação da expressão da chemerina placentária com biomarcadores de perfil metabólico em vacas no momento do parto

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Data da apresentação: 11 de Julho de 2024

Resultado: APROVADO

Banca Examinadora

Orientador: _____

Presidente: Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza
Departamento de Biologia-UFRPE

Examinadora: _____

Titular: Dra. Camilla Albertina Dantas de Lima
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami- UFRPE

Examinadora: _____

Titular: Profa. Dra. Nara Suzy Aguiar de Freitas
Departamento de Biologia - UFRPE

Examinadora: _____

Suplente: Prof. Dr. Pierre Soares Castro
Departamento de Veterinária-UFRPE

RECIFE-PE

2024

Dedicatória...

Este trabalho de conclusão é realizado com muita resiliência e sacrifício. À memória eterna dos meus avós, Paulo J. de Barros, meu sócio, e Maria de Lourdes de Barros, minha segunda mãe. Quero que saibam que eu consegui. Ao meu pai Adriano e à minha avó Nalva, agradeço por estarem presentes em minha vida e sempre estar do meu lado, independente da situação. Por fim, à minha mãe, dona Andrea, aquela que nunca desistiu de mim e sacrificou uma parte da sua vida para me criar e me dar a melhor educação possível. Eu te amo, mainha.

AGRADECIMENTOS

Ao finalizar este trabalho, quero expressar minha profunda gratidão a todos que foram fundamentais nesta jornada desafiadora.

Aos meus pais, que mesmo em tempos difíceis, acreditaram em mim quando ninguém mais o fez, principalmente à minha mãe, minha heroína, meu anjo, meu tudo.

À memória da minha vó Lourdes e do meu vô Paulo, que me criaram e cuidaram de mim durante a infância.

À minha vó Nalva que me ajudou bastante na trajetória.

À professora Nara, com quem pude aprender muito e foi ela quem mais se preocupou comigo fora do âmbito acadêmico. Sou muito grato a senhora.

Ao meu orientador, Professor Paulo, sou muito grato por me aceitar como seu orientando desde o período da pandemia, sem o senhor não seria possível estar aqui.

Ao Laboratório Genoma e ao CENAPESQ, onde tornou possível toda a realização dos meus experimentos e me acolheu para ser um dos seus pesquisadores.

Aos meus antigos colegas de laboratório da Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco, onde pude iniciar a minha jornada na biologia molecular.

À banca examinadora, agradeço por aceitarem meu convite e avaliarem este trabalho.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, agradeço por tornar possível o meu sonho e permitir meu crescimento profissional e acadêmico.

Este trabalho é graças a todos que estavam lá junto de mim para agregar positivamente na minha vida, minha roda de amigos, meus professores e meus mestres na carreira profissional. Mas não é o fim de um ciclo, apenas o começo de um novo.

“Mas a vida ensina, só eu sei o que passei
A vida não é fácil, mas eu tô ligado, eu sei,
eu sigo o meu caminho, tô firme, tô aí.
Não há nada nessa vida que me faça
desistir.”

Charlie Brown Jr.

RESUMO

O período do parto é um momento importante para vacas, caracterizado por alta demanda energética e balanço energético negativo, o que aumenta a suscetibilidade a distúrbios metabólicos como hipercetonemia e hipocalcemia, afetando negativamente a saúde e a imunidade dos animais. Este estudo investigou a relação da expressão da proteína chemerina com diferentes biomarcadores metabólicos no momento do parto, considerando a hipótese de que a chemerina pode atuar como um marcador substitutivo ou auxiliar dos biomarcadores existentes devido ao seu papel nos processos metabólicos e inflamatórios. Foram coletados sangue e tecido placentário de 14 vacas prenhas, submetidas a exames clínicos e coleta de sangue e tecido placentário. Parâmetros bioquímicos e hormonais foram analisados a partir de amostras de sangue, enquanto a expressão gênica da chemerina foi avaliada a partir de amostras dos tecidos placentários. Os resultados mostraram uma moderada correlação negativa entre a expressão da chemerina e a concentração de sódio no soro ($r=-0,60$; $p=0,0241$) sugerindo um possível papel regulatório da chemerina no equilíbrio eletrolítico durante o parto. Além disso, correlações positivas significativas foram encontradas entre os biomarcadores energéticos BHB e AGNE, e entre os biomarcadores do perfil proteico proteína total e globulina, refletindo o estado metabólico durante o periparto. No entanto, não foram observadas correlações diretas significativas entre a expressão da chemerina e a maioria dos outros biomarcadores metabólicos estudados. Conclui-se que a expressão da chemerina no tecido placentário pode ter um papel regulatório no equilíbrio eletrolítico, mas sua influência sobre outros aspectos do perfil metabólico é limitada e requer investigação adicional. Futuras pesquisas devem focar em elucidar os mecanismos pelos quais a chemerina pode influenciar o metabolismo e a homeostase durante o parto.

Palavras chaves: Chemerina, Periparto, Homeostase, Balanço energético negativo.

ABSTRACT

The calving period is a critical time for cows, characterized by high energy demands and negative energy balance, which increases susceptibility to metabolic disorders such as hyperketonemia and hypocalcemia, negatively affecting animal health and immunity. This study investigated the relationship between chemerin protein expression and various metabolic biomarkers at calving, considering the hypothesis that chemerin could serve as a substitute or auxiliary marker for existing biomarkers due to its role in metabolic and inflammatory processes. Blood and placental tissue samples were collected from 14 pregnant cows, subjected to clinical examinations and collection of blood and placental tissue. Biochemical and hormonal parameters were analyzed from blood samples, while chemerin gene expression was evaluated from placental tissue samples. The results showed a moderate negative correlation between chemerin expression and serum sodium concentration ($r=-0.60$; $p=0.0241$), suggesting a possible regulatory role of chemerin in electrolyte balance during calving. Additionally, significant positive correlations were found between the energy biomarkers BHB and NEFA, and between the protein profile biomarkers total protein and globulin, reflecting the metabolic state during the peripartum period. However, no significant direct correlations were observed between chemerin expression and most of the other metabolic biomarkers studied. It is concluded that chemerin expression in placental tissue may have a regulatory role in electrolyte balance, but its influence on other aspects of the metabolic profile is limited and requires further investigation. Future research should focus on elucidating the mechanisms by which chemerin may influence metabolism and homeostasis during calving.

Keywords: Chemerin, Peripartum, Homeostasis, Negative Energy balance.

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Sequência de primers utilizada no estudo.....	23
Tabela 2: Estatística descritiva das variáveis dos perfis de energia, proteína, atividade enzimática, eletrólitos, hormônios e índices de resistência insulínica em vacas híidas no momento do parto.....	24
Tabela 3: Estudo de correlação entre a expressão gênica da Chemerina com variáveis dos perfis energético, proteico e atividade enzimática em vacas híidas no momento do parto.....	26
Tabela 4: Estudo de correlação entre a expressão gênica da Chemerina com variáveis do perfil eletrolítico em vacas híidas no momento do parto.....	27
Tabela 5: Estudo de correlação entre a expressão gênica da Chemerina com variáveis do perfil hormonal e índices de resistência insulínica em vacas híidas no momento do parto.....	28

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1:	Representação gráfica, equação de linearidade e coeficiente de correlação (r) da correlação entre a concentração plasmática de β -Hidroxi butirato (mmol/L) e AGNE (mmol/L) em vacas no momento do parto.....	28
Figura 2:	Representação gráfica, equação de linearidade e coeficiente de correlação (r) da correlação entre a concentração sérica de proteína total (gl/L) e globulina (gl/L) em vacas no momento do parto.....	29
Figura 3:	Representação gráfica, equação de linearidade e coeficiente de correlação (r) da correlação entre a concentração sérica de proteína total (gl/L) e A:G (gl/L) em vacas no momento do parto	29
Figura 4:	Representação gráfica, equação de linearidade e coeficiente de correlação (r) da correlação entre a concentração sérica de albumina (gl/L) e A:G (gl/L) em vacas no momento do parto.....	30
Figura 5:	Representação gráfica, equação de linearidade e coeficiente de correlação (r) da correlação entre a concentração sérica de globulina (gl/L) e A:G (gl/L) em vacas no momento do parto.....	30
Figura 6:	Representação gráfica, equação de linearidade e coeficiente de correlação (r) da correlação entre a concentração sérica de CaI (mmol/L) e P (mmol/L) em vacas no momento do parto.....	31
Figura 7:	Representação gráfica, equação de linearidade e coeficiente de correlação (r) da correlação entre a concentração sérica de globulina (mmol/L) e A:G (mmol/L) em vacas no momento do parto.....	31
Figura 8:	Representação gráfica, equação de linearidade e coeficiente de correlação (r) da correlação entre a concentração sérica de P (mmol/L) e Ca:P (mmol/L) em vacas no momento do	32

	parto.....	
Figura 9:	Representação gráfica, equação de linearidade e coeficiente de correlação (r) da correlação entre a concentração sérica de Na (mmol/L) e chemerina (%) em vacas no momento do parto.....	32
Figura 10:	Representação gráfica, equação de linearidade e coeficiente de correlação (r) da correlação entre a concentração sérica de K (mmol/L) e Na:K (mmol/L) em vacas no momento do parto.....	33
Figura 11:	Representação gráfica, equação de linearidade e coeficiente de correlação (r) da correlação entre a concentração sérica de Na (mmol/L) e DIF (mmol/L) em vacas no momento do parto.....	33
Figura 12:	Representação gráfica, equação de linearidade e coeficiente de correlação (r) da correlação entre a concentração sérica de Cl (mmol/L) e DIF (mmol/L) em vacas no momento do parto.....	34
Figura 13:	Representação gráfica, equação de linearidade e coeficiente de correlação (r) da correlação entre a concentração sérica de insulina (pmol/L) e índice HOMAR-IR (%) em vacas no momento do parto.....	34
Figura 14:	Representação gráfica, equação de linearidade e coeficiente de correlação (r) da correlação entre a concentração sérica de insulina (pmol/L) e índice QUICK (%) em vacas no momento do parto.....	35
Figura 15:	Representação gráfica, equação de linearidade e coeficiente de correlação (r) da correlação entre a concentração sérica de insulina (pmol/L) e índice RQUICK _{βHB} (%) em vacas no momento do parto.....	35
Figura 16:	Representação gráfica, equação de linearidade e coeficiente de correlação (r) da correlação entre o índice HOMAR-IR (%) e	

índice QUICK (%) em vacas no momento do parto..... 36

Figura 17: Representação gráfica, equação de linearidade e coeficiente de correlação (r) da correlação entre o índice insulínica HOMAR-IR (%) e índice RQUICK_{βHB} (%) em vacas no momento do parto..... 36

Figura 18: Representação gráfica, equação de linearidade e coeficiente de correlação (r) da correlação entre o índice QUICK (%) e índice RQUICK_{βHB} (%) em vacas no momento do parto..... 37

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2. 1. Distúrbio metabólico	16
2.2 Ácido β -hidroxibutírico (β HBA)	17
2.3 Acetoacetato (AcAc)	17
2.4 Acetona (AC)	17
2.5 Adipocinas	18
2. 5.1 Chemerina	18
2. 6. Biomarcadores metabólicos	18
JUSTIFICATIVA	19
3. OBJETIVOS	20
3.1- Geral	20
3.2- Específicos:	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. Animais	20
4.2. Coleta e armazenamento de amostras	21
4.3. Bioquímica sanguínea	21
4.4. Hormônios	22
4.5 Avaliação de sensibilidade à insulina	22
4.5.1. Modelo de Avaliação da Homeostase	22
4.5.2. Índice Quantitativo de Verificação de Sensibilidade à Insulina	22
4.5.3. Índice Quantitativo de Verificação de Sensibilidade à Insulina	22
4.5.4. Índice Quantitativo de Verificação de Sensibilidade à Insulina Revisado	22
4.6. Extração de RNA	22
4.7. Síntese de cDNA:	23
4.8 Análise da expressão gênica:	23
4.9 Análise estatística:	23
5. RESULTADOS	24
6. DISCUSSÃO	37
7. CONCLUSÃO	38
8. PERSPECTIVAS	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1. INTRODUÇÃO

O período do parto é um momento crítico para as vacas, pois nesta ocorre maior demanda energética, gerando um balanço energético negativo (NEB) e maior suscetibilidade ao surgimento de distúrbios metabólicos como hipercetonemia, hipocalcemia, entre outros, os quais impactam negativamente a saúde do animal, afetando a sua imunidade (WALLESER et al., 2021; TUFARELLI et al., 2024).

Entre as proteínas envolvidas nos processos do metabolismo energético e do sistema imunológico, destaca-se a chemerina. Chemerina é uma proteína codificada pelo gene *RARRES2*, presente em diversos tecidos, principalmente no tecido adiposo e no fígado (YAMAUCHI et al., 2015). Trata-se de uma adipocina que, além de estar envolvida nos processos do metabolismo energético, também está associada a processos inflamatórios e à regulação da insulina, afetando a sensibilidade a esse hormônio (SUZUKI et al., 2015).

Além disso, a chemerina atua como "ligante natural para o receptor de quimiocina tipo 1 (CMKLR1)" e possui ação quimiotática na migração dos leucócitos (WITTAMER et al., 2003). Durante a diferenciação dos adipócitos, há uma alteração nos níveis de expressão gênica tanto da chemerina quanto do *CMKLR1* nos adipócitos bovinos, e esse processo é regulado pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), adiponectina e pelo análogo da chemerina (SUZUKI et al., 2012). O monitoramento do perfil metabólico durante o período de alta demanda energética é essencial, e os biomarcadores metabólicos são importantes nesse contexto, pois possibilitam o acompanhamento da saúde do animal, como os níveis de ácidos graxos não esterificados (AGNE) e beta-hidroxibutirato (BHB) (COUPERUS et al., 2021).

Até a presente data, não existem estudos que verificaram o nível de expressão de mRNA para adipocinas em tecido placentário de vacas saudáveis. Sendo assim, em decorrência do seu papel nos processos metabólicos e inflamatórios, a chemerina pode influenciar nos níveis desses biomarcadores. Desta forma, ~~no~~ presente estudo teve como objetivo avaliar a relação da expressão da chemerina, em tecido placentário com os principais biomarcadores do perfil metabólico no momento do parto em vacas provenientes da na clínica de bovinos de Garanhuns-PE.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2. 1. Distúrbio metabólico

Nas vacas, o momento do parto é um período delicado e que requer atenção. Durante esta fase, é preciso que haja uma alta demanda metabólica desses animais e, portanto, podem ocorrer distúrbios nesta fase da sua vida. Além da hipercetonemia, as vacas podem apresentar outras anormalidades em seu perfil metabólico, como hipocalcemia, hipomagnesemia ou o aumento dos níveis de ureia e AGNE, impactando negativamente na saúde destes animais (HUBNER et al., 2022), ocasionando distúrbios metabólicos, por exemplo.

Os distúrbios metabólicos acometem os animais em períodos que demandam mais energia do que o animal em questão possui. Um exemplo dessa condição é a cetose metabólica. Esta é uma doença comum no gado leiteiro e ocorre principalmente no período pós-parto e início da lactação, onde é requisitada uma maior demanda energética no metabolismo desses animais. Esse momento de maior necessidade por energia, gera um balanço energético negativo (NEB) (INGLETSEN, 2006). Tal condição ocorre em decorrência de que as vacas mobilizam suas reservas de gordura, visando a compensação do acelerado crescimento fetal nas últimas semanas de gestação e no início do período de lactogênese (ITLE et al., 2015).

As reservas de gordura, principalmente os triglicerídeos, são muito requisitadas nesse processo de superar o déficit ocasionado pelo aumento da necessidade energética e a ingestão de energia com a participação de um mecanismo fundamental para aumentar a lipólise. Deste modo, o receptor β -adrenérgico ao ser estimulado por catecolaminas, inicia o processo de lipase de triglicerídeo adiposo (ATGL) e lipase sensível a hormônios (HSL) nos adipócitos (McNAMARA et al., 1986).

Um dos sintomas mais característicos dessa desordem metabólica é a presença em excesso de corpos cetônicos nos fluidos corporais das vacas. Esses corpos cetônicos são constituídos por ácido β -hidroxibutírico (β HBA), ácido acetoacético (ACAC) e acetona (AC) (PIOTR GULIŃSKI et al., 2021). Tais substâncias são basicamente produtos alternativos da oxidação de ácidos graxos livres (FFA) no fígado, em que o processo de formação dos mesmos é chamado de cetogênese e o

acúmulo em excesso dessas substâncias pode impactar negativamente no funcionamento da insulina, contribuindo para essa condição metabólica (PIOTR GULIŃSKI et al., 2021).

A insulina é um importante fator na regulação do metabolismo energético e da glicose. Em um cenário de pleno funcionamento desse processo, a insulina auxilia na inibição do processo de lipólise e permite o acúmulo de gordura (NORTON et al., 2022). Os corpos cetônicos (β HBA), em condições normais, atuam como uma fonte alternativa de energia e contribuem para a resistência ao estresse oxidativo e inflamatório (KOLB et al., 2021).

2.2 Ácido β -hidroxibutírico (β HBA)

Quando os ácidos graxos são utilizados como fonte de energia, ao invés da glicose, há a produção do β HBA como uma substância secundária do metabolismo da gordura (PIOTR GULIŃSKI et al., 2021). A concentração sanguínea de β HBA, pode indicar a presença de distúrbio metabólico. Segundo Guliński e colaboradores (2021), concentrações sanguíneas < 1.2 mmol/L são indicativos de animais saudáveis, e concentrações sanguíneas > 1.2 mmol/L como indicativo de distúrbio metabólico naquele animal.

2.3 Acetoacetato (AcAc)

Por conta da alta demanda energética, o corpo necessita de fontes alternativas para lidar com o déficit da energia, principalmente durante os momentos de jejum ou na diminuição da ingestão de carboidratos. Após a quebra das moléculas de gordura em ácidos graxos, ocorre a beta oxidação destes para síntese de acetil-CoA, seguido pela etapa de formação do acetoacetil-CoA, partindo para a conversão deste para 3-hidroxi-3 metilglutaril-CoA e finalmente a formação do acetoacetato (DĄBEK et al., 2020).

2.4 Acetona (AC)

Alkede & Priefer (2021) afirmaram que embora haja presença de acetona (AC), esta substância não se encontra em quantidades significativas no sangue. Sua síntese ocorre através da descarboxilação do acetoacetato com a participação da

enzima acetoacetato descarboxilase. Além disso, esse corpo cetônico em especial pode ser avaliado através da respiração, enquanto BHB é medido através do sangue. Desta forma, esta substância também pode ser um bom biomarcador para indicar a condição de síndrome metabólica (MUSA VELOSO et al., 2002).

2.5 Adipocinas

As adipocinas são proteínas secretadas pelos adipócitos, sendo essenciais para funções biológicas, como o metabolismo energético e resistência à insulina e o seu desequilíbrio pode contribuir para a promoção de distúrbios metabólicos. A leptina e a adiponectina são exemplos de adipocinas usadas como biomarcadores. (SUZUKI et al., 2012).

2. 5.1 Chemerina

A chemerina é uma adipocina que pode estar relacionada tanto com funções regulatórias do sistema imune, quanto com o seu envolvimento com o metabolismo energético. É também conhecida como proteína 2 de resposta ao receptor de ácido retinóico (RARRES2) (SUZUKI et.al., 2015). Em 2012, Smith e colaboradores afirmam que “a chemerina é altamente expressa nos adipócitos e seu receptor, o CMKLR1, é expresso em células imunes e do tecido adiposo”. Desse modo, a chemerina se relaciona com a regulação da adipogênese e metabolismo dos adipócitos (GORALSKI et al., 2007).

Devido a sua possível relação com a cetose metabólica, a chemerina pode apresentar um importante papel no desenvolvimento de distúrbio metabólico e essa proteína também pode estar relacionada com a resposta inflamatória e imunológica do organismo (SUZUKI et.al., 2012). Além disso, os perfis de energia, proteína, eletrólitos ou endócrino para auxiliar na prevenção, diagnóstico, monitoramento e prognóstico durante o balanço negativo de energia das vacas no momento do parto (QIU et al., 2023).

2. 6. Biomarcadores metabólicos

Os biomarcadores metabólicos são ferramentas para monitorar a saúde do animal. Sua função consiste em analisar alterações no perfil metabólico, pois estas mudanças podem impactar negativamente na homeostase, aumentando a probabilidade do surgimento de doenças metabólicas. As vacas durante o momento do parto passam por uma alta demanda metabólica, surgindo a necessidade de acompanhar estes animais através dos biomarcadores a fim de compreender o estado metabólico do animal e investigar o início de distúrbios (KASIMANICKAM et al., 2020).

Durante os momentos de maior demanda energética, o fígado é o responsável pela coordenação de uma série de alterações metabólicas, pois promove o aumento da expressão de genes envolvidos com a oxidação de ácidos graxos e gliconeogênese (WATHES et al., 2021). É possível analisar o estado do fígado através de vários biomarcadores, como por exemplo as enzimas gama-glutamilttransferase (GGT), aspartato aminotransferase (AST) ou alanina aminotransferase (ALT) (PUPPEL et al., 2016).

Justificativa

Monitorar o perfil metabólico durante esse período é fundamental para detectar e desenvolver estratégias para tratar destes distúrbios. Os biomarcadores tradicionais apresentam limitações, como por exemplo a falta de uma avaliação completa dos processos inflamatórios e também quanto à regulação hormonal envolvida nos distúrbios metabólicos. A chemerina, uma adipocina envolvida no metabolismo energético e processos inflamatórios, pode apresentar relação com outros biomarcadores metabólicos devido à sua expressão em diversos tecidos, incluindo o tecido adiposo e o fígado (YAMAUCHI et al., 2015; SUZUKI et al., 2015). Porém, a literatura atual carece de estudos que investiguem a expressão de chemerina em tecido placentário de vacas e sua relação com biomarcadores metabólicos no momento do parto. Desta forma, avaliar a expressão de chemerina em tecido placentário e relacioná-la com biomarcadores metabólicos críticos, poderá proporcionar uma compreensão mais abrangente do papel dessa adipocina na saúde e produtividade das vacas durante o periparto.

3. OBJETIVOS

3.1- Geral

Avaliar a existência de relação da expressão da chemerina em tecido placentário com diferentes biomarcadores do perfil metabólico de vacas no momento do parto

3.2- Específicos:

3.2.1. Correlacionar a expressão da chemerina em tecido placentário com diferentes biomarcadores do perfil metabólico (energia, proteína, enzimas, eletrólitos e hormônios) de vacas no momento do parto.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais – CEUA, Universidade Federal Rural de Pernambuco, com licença nº 148/2018.

Foram utilizadas 14 vacas prenhas, oriundas de rebanhos leiteiros da bacia leiteira do município de Garanhuns, estado de Pernambuco, de diferentes raças, criadas predominantemente em sistema semi-intensivo e que recebiam dietas contendo forragens variadas, palma, bagaço de cana-de-açúcar, silagem de milho e casca de mandioca, além de ração concentrada e sal mineral. As vacas foram submetidas ao exame clínico seguindo as diretrizes estabelecidas na literatura (Dirksen et al., 1993), além de coleta de sangue, que foram coletadas exclusivamente no momento do parto, para exames laboratoriais, sendo estes animais sem alterações clínicas e apresentando concentrações séricas de β -hidroxibutirato $< 1,2\text{mmol/L}$ (GORDON et al., 2013; KANEMKO et al., 2008; LOIKLUNG et al., 2022; McART et al., 2013).

4.2. Coleta e armazenamento de amostras

Amostras de sangue foram coletadas por venopunção jugular, utilizando agulha de tubo a vácuo e tubos tipo vacutainer sem anticoagulante e com fluoreto de sódio + EDTA, para obtenção de soro e plasma, respectivamente.

Após retração de coágulo sanguíneo, os tubos foram submetidos à centrifugação por 15 min. a 3600g. Posteriormente as alíquotas de soro e plasma foram acondicionadas em tubos tipo Eppendorf e armazenadas à temperatura de -20°C para posteriores análises bioquímicas.

Amostras de tecido placentário foram coletadas após expulsão espontânea ou durante procedimentos obstétricos, sendo selecionadas porções próximo ao cordão umbilical. Posteriormente os tecidos foram lavados com água DEPC (livre de RNase), armazenados em criotubos de 2mL contendo 300µL de Trizol® e mantidos a -80°C.

4.3. Bioquímica sanguínea

Os parâmetros bioquímicos analisados no plasma foram: glicose, BHB e AGNE. Já para o soro sanguíneo foram: proteína total, albumina, ureia, creatinina, atividade sérica da gamaglutamiltransferase (GGT), atividade sérica da aspartato aminotransferase (AST), cloretos (Cl⁻) e fósforo (P), utilizando-se analisador bioquímico semiautomático da marca BIOPLUS.

A concentração de globulina foi obtida pela subtração da proteína total e albumina (PT — Albumina), enquanto que a relação albumina:globulina (A:G) foi obtida pela divisão do valor da albumina pelo valor da globulina (albumina ÷ globulina), bem como a relação sódio:potássio (Na:K) como descrito por Kanemko et al. (2008).

As concentrações séricas de cálcio ionizado (Ca⁺⁺), sódio (Na⁺) e potássio (K⁺) foram determinadas por um analisador de eletrólitos (Roche Diagnostics, São Paulo, Brasil).

A diferença de íons fortes foi calculada de acordo com as fórmulas utilizadas por Constable & Stämpfli (2005); e Masevicius et al. (2013), utilizando os valores obtidos da bioquímica, conforme seguinte fórmula:

$DIF = ([NaSr + [KSr] - [ClSr])$, onde:

[NaSr] = concentração de sódio no soro

[KSr] = concentração de potássio no soro

[ClSr] = concentração de cloro no soro.

As análises foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica da Clínica de Bovinos de Garanhuns da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

4.4. Hormônios

Os hormônios insulina e cortisol foram quantificados por eletroquimioluminescência, utilizando-se equipamento da Beckman Coulter — ACCESS 2, e kits (Access Immunoassay Sistemas, Beckman Coulter, EUA). Tais análises foram realizadas no Laboratório de Química Analítica do Centro de Apoio à Pesquisa (CENAPESQ), da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

4.5 Avaliação de sensibilidade à insulina

Diferentes índices substitutos para estimar o nível de resistência à insulina foram definidos conforme as fórmulas abaixo descritas:

4.5.1. Modelo de Avaliação da Homeostase: $HOMA-IR = [glucose \text{ (mmol/ml)} \times insulin \text{ (}\mu\text{U/ml)}] / 22.5$ (MUNIYAPPA et al., 2008)

4.5.2. Índice Quantitativo de Verificação de Sensibilidade à Insulina: $QUICKI = 1 / [\log glucose \text{ (mg/dl)} + \log insulin \text{ (}\mu\text{U/ml)}]$ (MUNIYAPPA et al., 2008)

4.5.3. Índice Quantitativo de Verificação de Sensibilidade à Insulina: $RQUICKI = 1 / [\log glucose \text{ (mg/dl)} + \log insulin \text{ (}\mu\text{U/ml)} + \log AGNE \text{ (mmol/l)}]$ (115 — HOLTENIUS; HOLTENIUS, 2007).

4.5.4. Índice Quantitativo de Verificação de Sensibilidade à Insulina Revisado: $RQUICKI_{BHB} = 1 / [\log glucose \text{ (mg/dl)} + \log insulin \text{ (}\mu\text{U/ml)} + \log AGNE \text{ (mmol/l)} + \log BHB \text{ (mmol/l)}]$ (BALOGH et al., 2008).

4.6. Extração de RNA

As amostras de tecido placentário de bovinos, após expulsão espontânea, foram lavadas com água DEPC (livre de RNase), armazenadas em criotubos de 2mL contendo 300 μ L de trizol e mantidas a -80°C até a extração de RNA total pelo método Trizol (Trizol; Invitrogen Life Technologies). Posteriormente, o RNA total foi purificado com DNase I (PROMEGA) e quantificado por espectrofotometria

utilizando o espectrofotômetro Bionnate 3 (THERMO SCIENTIFIC). A pureza do RNA foi avaliada pela razão das absorvâncias a 260/280 nm e 260/230 nm. A integridade do RNA foi verificada através de eletroforese em gel de agarose a 1%, com a utilização do corante SYBR Green II (LCG BIOTECNOLOGIA). A concentração de RNA foi calculada com base na absorvância a 260 nm, onde 1 unidade de absorvância corresponde aproximadamente a 40 µg/mL de RNA.

4.7. Síntese de cDNA:

O cDNA foi sintetizado utilizando o kit IMPROM-II TRANSCRIPTASE, conforme especificações descritas pelo fabricante (PROMEGA, Corporation, Madison, WI, EUA).

4.8 Análise da expressão gênica:

A análise da expressão do gene da quimerina foi realizada pela técnica da PCR em tempo real usando o aparelho Amplio 96 (LOCCUS). As reações foram realizadas em triplicatas juntamente com o controle negativo. A RNA polimerase II foi utilizada como controle endógeno. Utilizou-se o kit GoTaq® Probe qPCR and RT-qPCR Systems (Promega Corporation, Madison, WI, EUA) com primers específicos da chemerina, escolhidos a partir da literatura existente (SUZUKI et al., 2012) (Tabela 1). As análises da expressão gênica foram realizadas no Laboratório Multiusuário CENAPESQ da UFRPE.

Tabela 1 – Sequência de primers utilizadas no estudo

Gene	Sequência	Tamanho (bp)	Acesso
Chemerina	Forward: GTTTGTGAGGCTGGAGTTC	173	FJ594406.1
	Reverse: GAGTCTGTATGGGACAGTGC		

4.9 Análise estatística:

Os dados foram processados utilizando-se medidas de tendência central expressas pela média, desvio padrão, erro padrão da média, mediana e limites

inferior e superior, para o conjunto de variáveis do perfil metabólico das vacas no momento do parto. Realizou-se, também, estudo de correlação de Pearson para avaliar o grau de relação entre pares de variáveis. A significância obtida na correlação linear foi avaliada segundo Little e Hills (1978). Os dados foram analisados por meio do programa computacional Statistical Analysis System (SAS, 2009), utilizando-se o procedimento General Linear Model. Para todas as análises estatísticas foi adotado o nível de significância (p) de 5%.

5. RESULTADOS

Na tabela 2, são mostrados os dados correspondentes às medidas de tendência central, expressas pela média, desvio padrão, erro padrão da média, mediana e limites inferior e superior, para o conjunto de variáveis do perfil metabólico (energia, proteína, atividade enzimática, hormônios e índices de resistência insulínica) das vacas no momento do parto.

Tabela 2 — Estatística descritiva, média, desvio padrão (DP), erro padrão da média (EPM), mediana e limites inferior e superior, das variáveis dos perfis de energia, proteína, atividade enzimática, eletrólitos, hormônios e índices de resistência insulínica em vacas híbridas no momento do parto

Variáveis	Unidade	Medidas de Tendência Central					
		Média	DP	EPM	Mediana	Inferior	Superior
Expressão Gênica							
Chemerina	%	-2,24	2,69	0,72	-2,85	-3,86	-0,06
Energia							
β-Hidroxibutirato	mmol/L	0,67	0,30	0,08	0,72	0,41	0,96
AGNE	mmol/L	1,07	0,68	0,19	0,88	0,54	1,60
Glicose	mmol/L	5,70	1,12	0,30	5,84	5,16	6,29
Proteína							
PT	g/L	72,90	8,51	2,36	75,20	71,90	77,00
Albumina	g/L	30,60	5,11	1,42	31,60	27,50	33,60
Globulina	g/L	42,30	8,83	2,45	41,70	40,30	48,40
A:G	g/L	7,74	2,84	0,79	7,84	5,77	9,25
Ureia	mmol/L	4,70	1,28	0,36	4,86	3,66	5,53
Creatinina	μmol/L	127,73	27,85	7,44	131,72	99,89	145,86
Atividade Enzimática							
AST	UI/L	86,06	13,74	3,67	86,43	73,33	94,28
GGT	UI/L	22,40	5,58	1,49	22,95	15,30	22,95
Eletrólitos							
Ca Iônico	mmol/L	0,99	0,07	0,02	1,00	0,91	1,05
P	mmol/L	1,54	0,48	0,13	1,41	1,27	1,76
Ca:P	mmol/L	0,70	0,22	0,06	0,71	0,60	0,81

Na	mmol/L	142,64	3,59	0,96	142,50	140,00	145,00
K	mmol/L	4,14	0,44	0,12	4,10	3,80	4,30
Cl	mmol/L	99,99	4,73	1,31	98,31	97,22	103,93
Na:K	Mmol/L	34,73	3,14	0,84	35,24	33,66	37,11
DIF		46,90	5,79	1,60	46,77	43,36	50,99
Hormônios							
Insulina	pmol/L	15,71	18,60	4,97	9,90	5,69	16,18
Cortisol	nmol/L	143,89	66,92	17,89	139,19	123,60	161,40
Índices de Resistência Insulínica							
HOMAR-IR	%	0,53	0,62	0,17	0,34	0,18	0,51
QUICK	%	0,49	0,11	0,03	0,47	0,43	0,54
RQUICK	%	0,58	0,10	0,03	0,55	0,50	0,66
RQUICKI _{βHB}	%	0,57	0,17	0,05	0,54	0,47	0,65

Na tabela 3, é mostrado o estudo de correlação entre a expressão da chemerina com variáveis dos perfis energético, protéico e atividade enzimática em vacas híbridas no momento do parto. Os pares de variáveis que apresentaram alta correlação positiva foram: BHB x AGNE ($r=0,78$; $p=0,0016$); PT x Globulina ($r=0,83$; $p=0,0005$); Relação Ca:P ($r=0,62$; $p=0,0250$); Insulina x HOMAR-IR ($r=0,96$; $p<,0001$) e QUICK x RQUICK_{βHB} ($r=0,84$; $p=0,0002$).

As que apresentaram alta correlação negativa foram: Globulina x A:G ($r=-0,94$; $p<,0001$); P x Ca:P ($r=-0,92$; $p<,0001$); K x Na:K ($r=-0,98$; $p<,0001$); Cl x DIF ($r=-0,75$; $p=0,0032$); Insulina x QUICK ($r=-0,74$; $p=0,0025$); A:G ($r=-0,62$; $p=0,0237$); Insulina x RQUICK_{βHB} ($r=-0,62$; $p=0,0172$); HOMAR-IR x QUICK ($r=-0,74$; $p=0,0022$) e HOMAR-IR x RQUICK_{βHB} ($r=-0,62$; $p=0,0181$).

Albumina x A:G ($r=0,58$; $p=0,0362$) e Na x DIF ($r=0,59$; $p=0,0334$), apresentaram moderada relação positiva, enquanto que, Ca iônico x P ($r=-0,58$; $p=0,0377$) e chemerina x Na ($r=-0,60$; $p=0,0241$) apresentaram moderada relação negativa. Os demais pares de variáveis não apresentaram valores estatisticamente significativos.

Tabela 5 - Estudo de correlação entre a expressão gênica da Chemerina, onde “r” é o coeficiente de correlação e “p” é o valor de significância, com variáveis do perfil hormonal: Insulina e Cortisol; índices de resistência insulínica: HOMAR-IR, QUICKI, RQUICKI e RQUICKIBHB em vacas hígdas no momento do parto. As correlações significativas estão destacadas em negrito.

	Chemerina	Insulina	Cortisol	Homar-IR	Quick	RQuick	RQuick _{βHB}
Chemerina	1	r= -0,35 p= 0,2241	r= -0,10 p= 0,7444	r= -0,27 p= 0,3438	r= 0,40 p= 0,1546	r= -0,23 p= 0,4289	r= 0,31 p= 0,2890
Insulina		1	r= -0,09 p= 0,7715	r= 0,96 p= <,0001	r= -0,74 p= 0,0025	r= 0,03 p= 0,9287	r= -0,62 p= 0,0172
Cortisol			1	r= -0,11 p= 0,7199	r= 0,21 p= 0,4715	r= 0,01 p= 0,9706	r= 0,17 p= 0,5645
Homar-IR				1	r= -0,74 p= 0,0022	r= 0,04 p= 0,9011	r= -0,62 p= 0,0181
Quick					1	r= -0,18 p= 0,5306	r= 0,84 p= 0,0002
RQuick						1	r= 0,25 p= 0,3866
RQuick _{βHB}							1

5.1. Representação gráfica das correlações entre pares de variáveis

A representação gráfica das correlações entre pares de variáveis são mostrados nas Figuras de 1 a 18. As figuras foram expressas pela equação de linearidade e respectivos coeficientes de correlação.

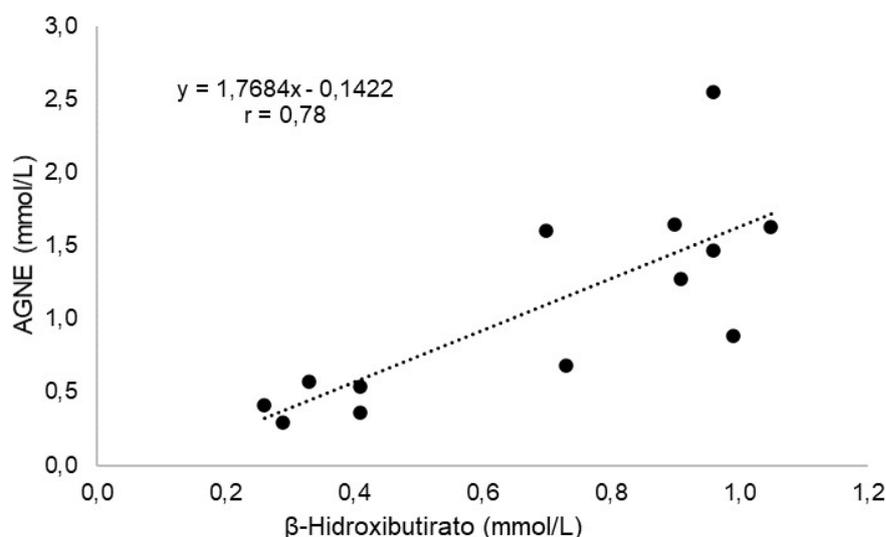


Figura 1 — Representação gráfica, equação de linearidade e coeficiente de correlação (r) da correlação entre a concentração plasmática de β -Hidroxibutirato (mmol/L) e AGNE (mmol/L) em vacas no momento do parto

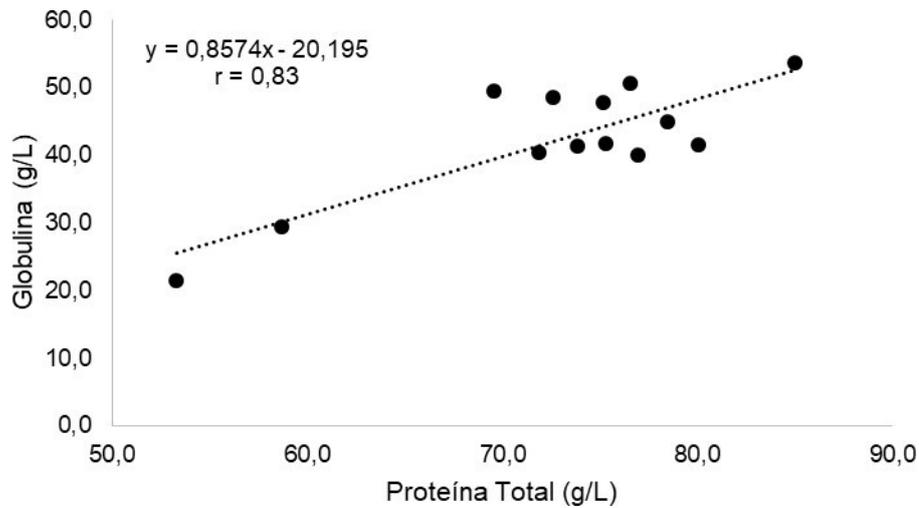


Figura 2 — Representação gráfica, equação de linearidade e coeficiente de correlação (r) da correlação entre a concentração sérica de proteína total (g/L) e globulina (g/L) em vacas no momento do parto

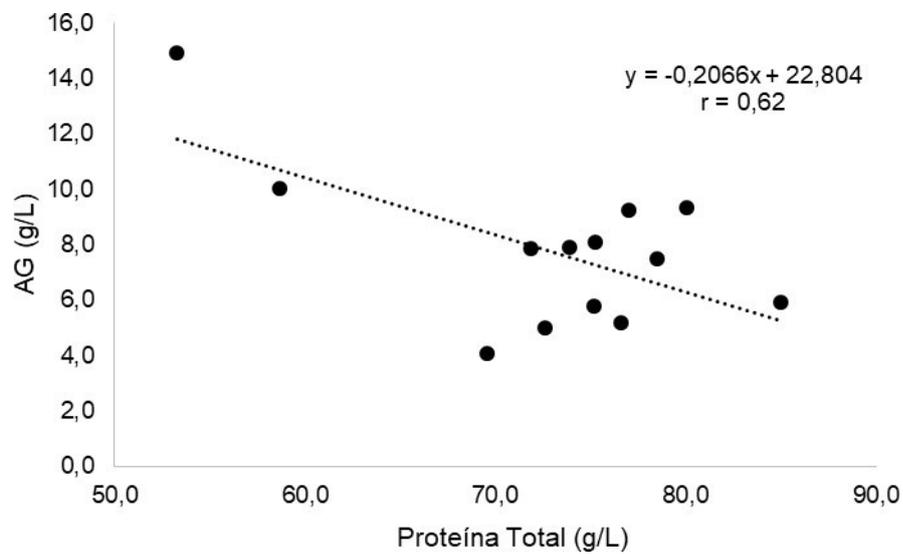


Figura 3 — Representação gráfica, equação de linearidade e coeficiente de correlação (r) da correlação entre a concentração sérica de proteína total (g/L) e A:G (g/L) em vacas no momento do parto

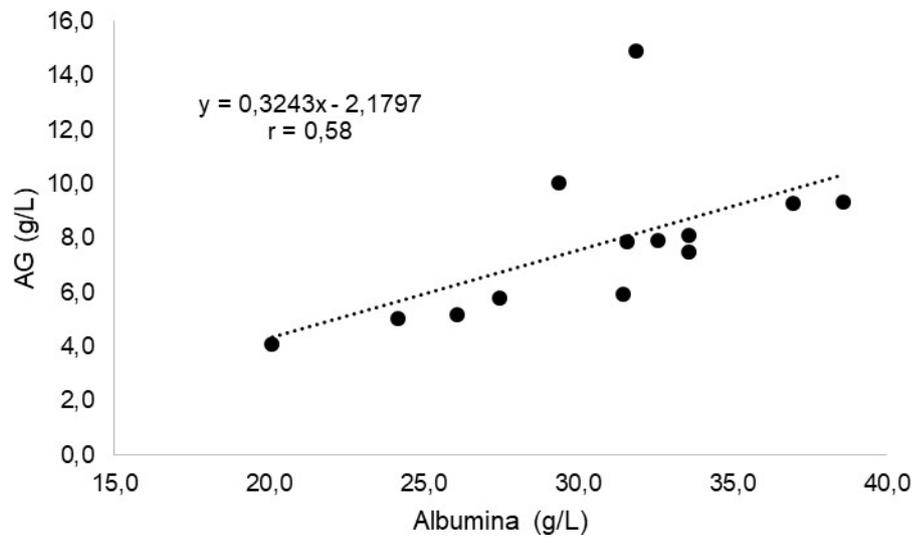


Figura 4 — Representação gráfica, equação de linearidade e coeficiente de correlação (r) da correlação entre a concentração sérica de albumina (g/L) e A:G (g/L) em vacas no momento do parto

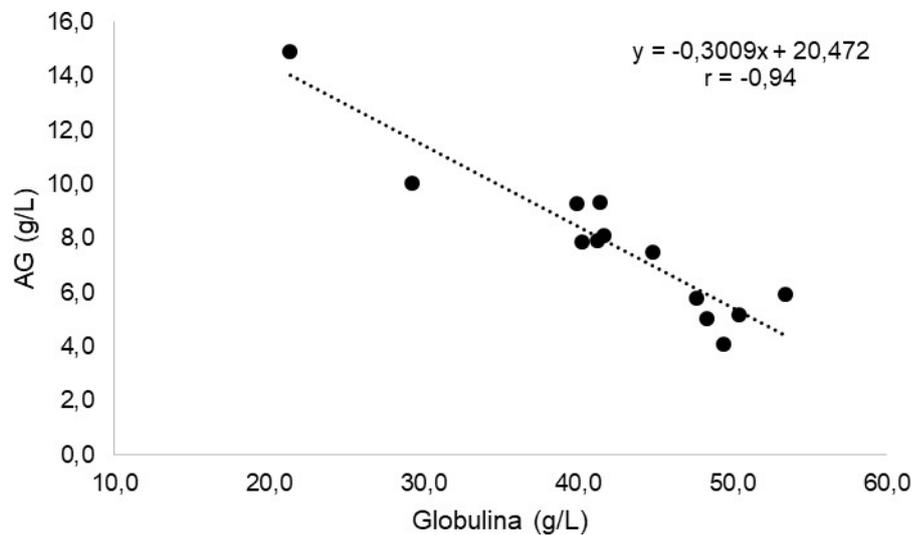


Figura 5 — Representação gráfica, equação de linearidade e coeficiente de correlação (r) da correlação entre a concentração sérica de globulina (g/L) e A:G (g/L) em vacas no momento do parto

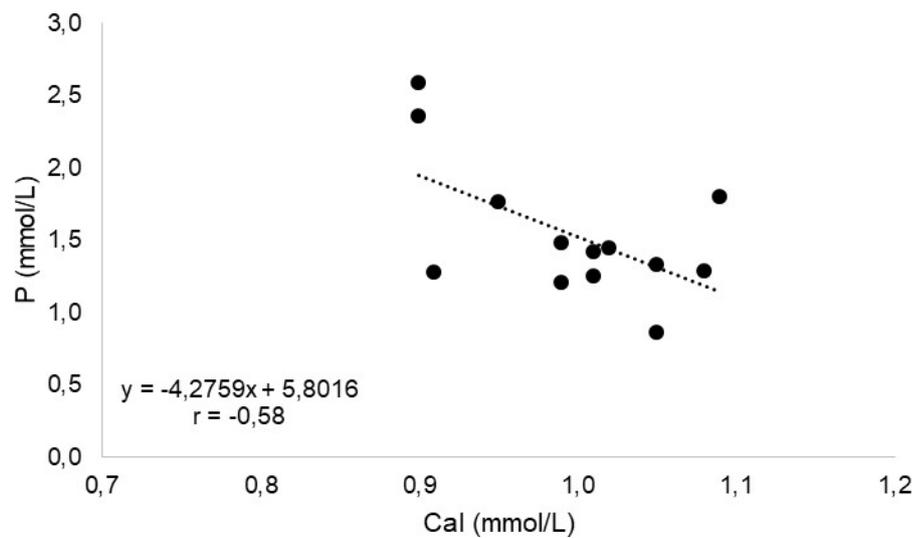


Figura 6 — Representação gráfica, equação de linearidade e coeficiente de correlação (r) da correlação entre a concentração sérica de Ca (mmol/L) e P (mmol/L) em vacas no momento do parto

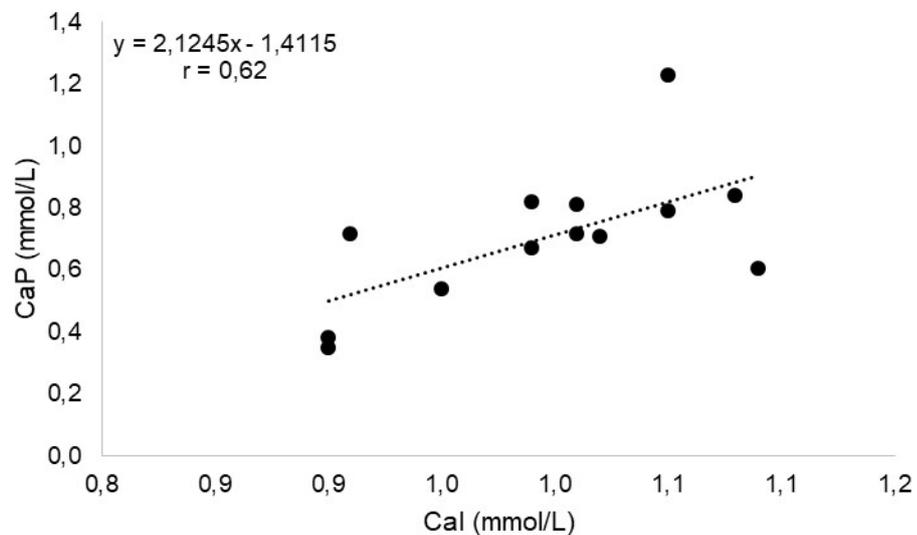


Figura 7 — Representação gráfica, equação de linearidade e coeficiente de correlação (r) da correlação entre a concentração sérica de Ca (mmol/L) e Ca:P (mmol/L) em vacas no momento do parto

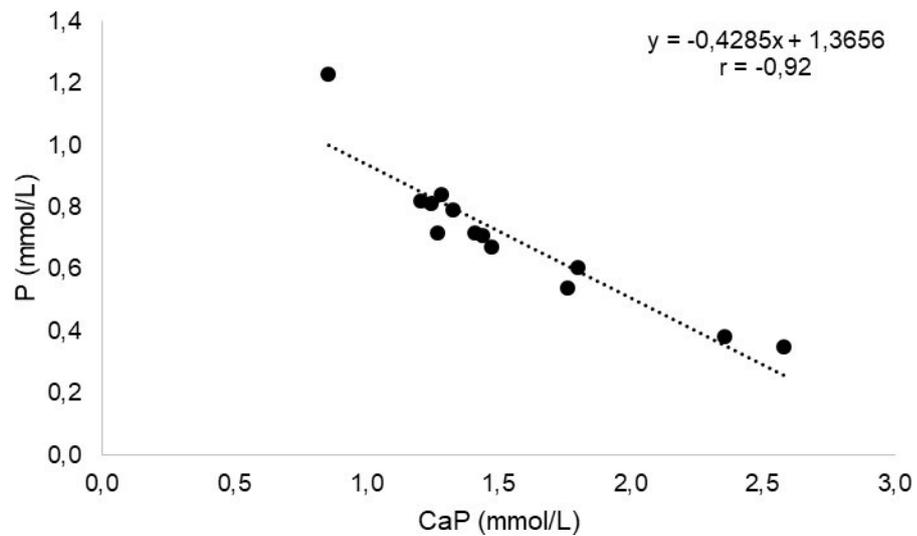


Figura 8 — Representação gráfica, equação de linearidade e coeficiente de correlação (r) da correlação entre a concentração sérica de CaP (mmol/L) e P (mmol/L) em vacas no momento do parto

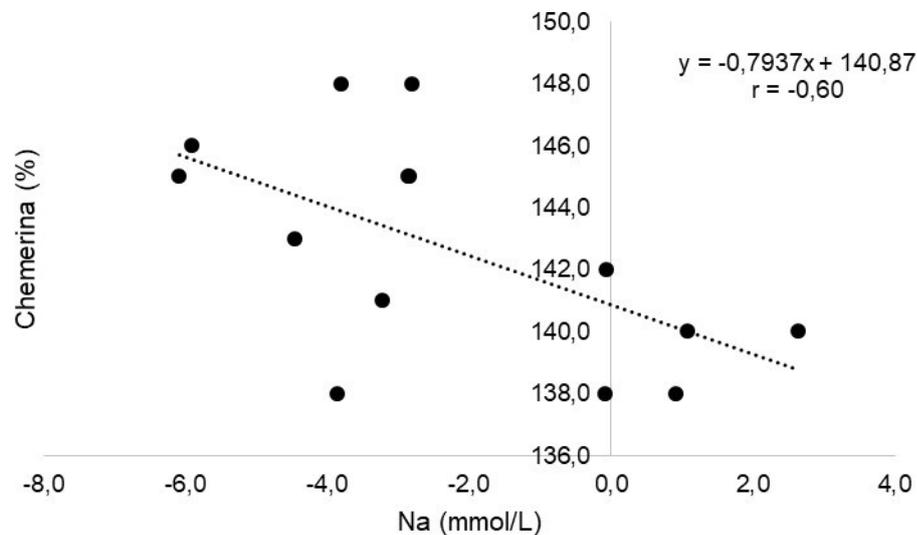


Figura 9 — Representação gráfica, equação de linearidade e coeficiente de correlação (r) da correlação entre a concentração sérica de Na (mmol/L) e chemerina (%) em vacas no momento do parto

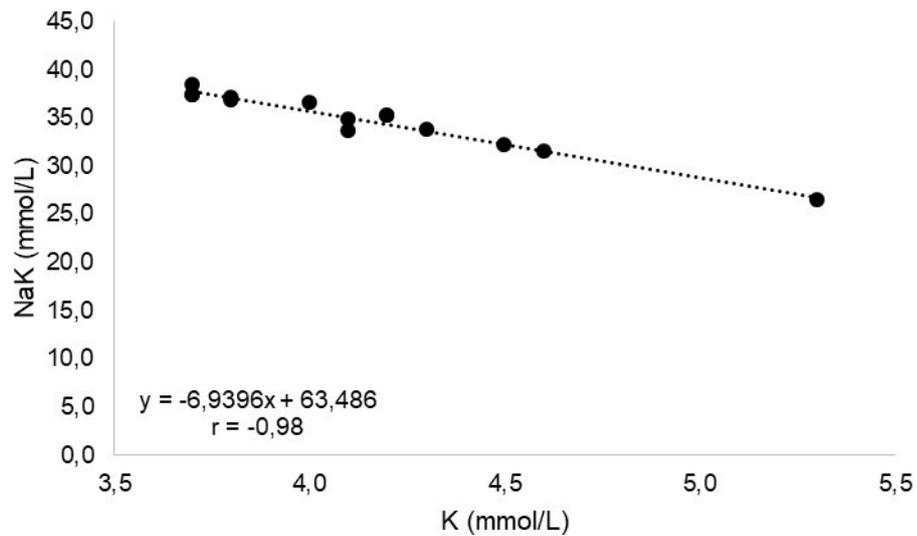


Figura 10 — Representação gráfica, equação de linearidade e coeficiente de correlação (r) da correlação entre a concentração sérica de K (mmol/L) e Na:K (mmol/L) em vacas no momento do parto

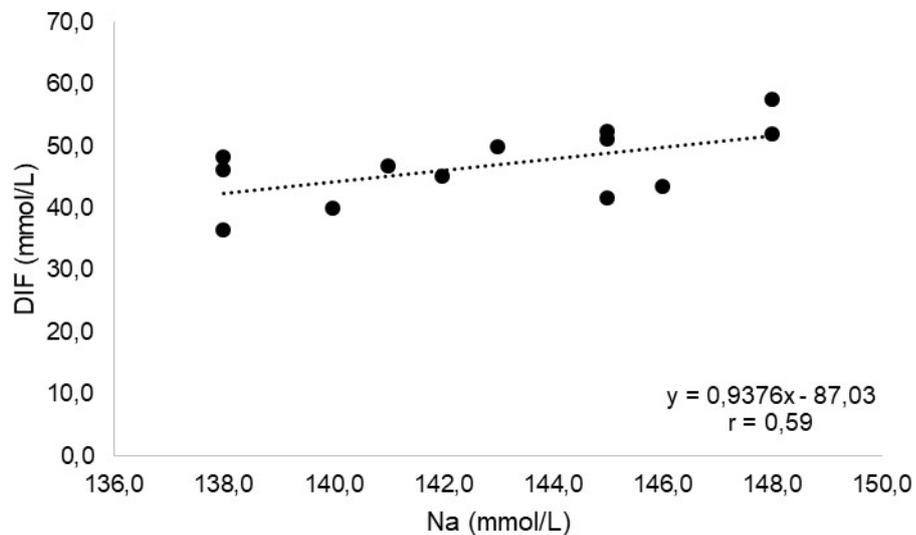


Figura 11 — Representação gráfica, equação de linearidade e coeficiente de correlação (r) da correlação entre a concentração sérica de Na (mmol/L) e DIF (mmol/L) em vacas no momento do parto

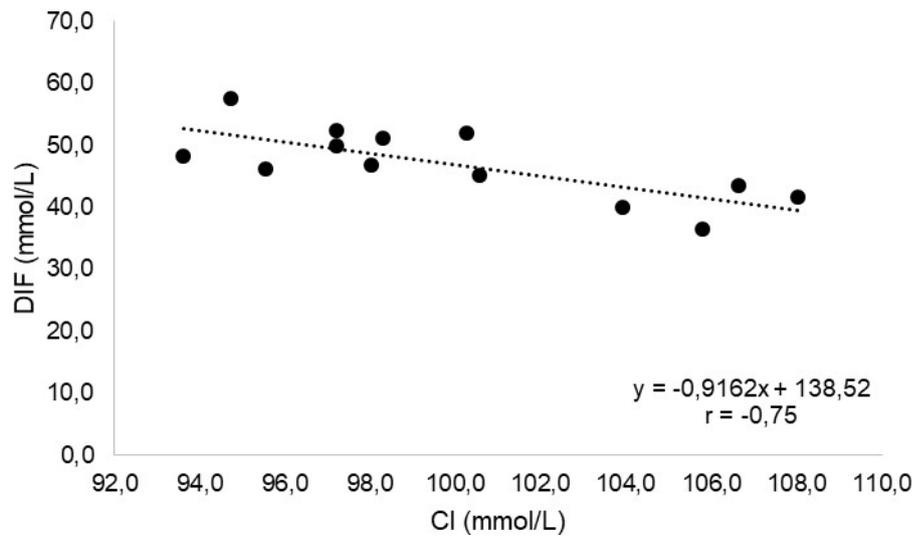


Figura 12 — Representação gráfica, equação de linearidade e coeficiente de correlação (r) da correlação entre a concentração sérica de Cl (mmol/L) e DIF (mmol/L) em vacas no momento do parto

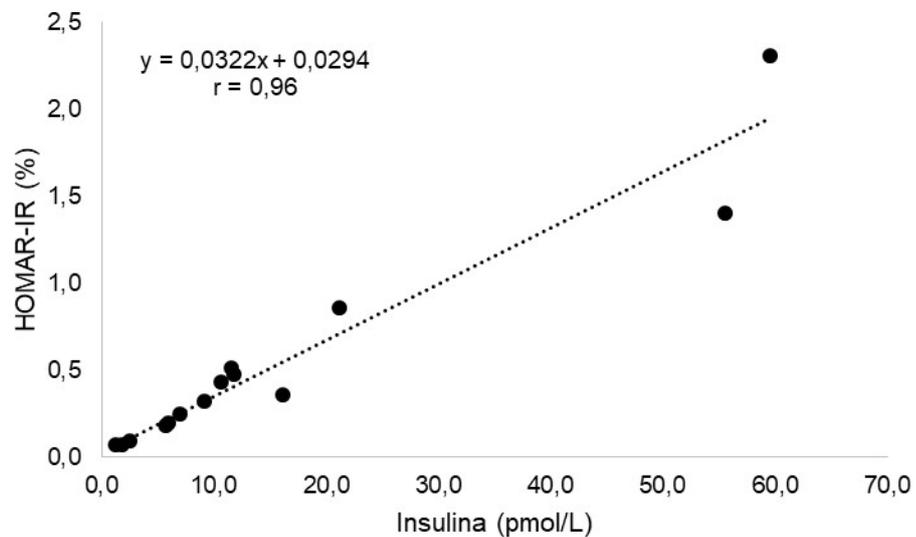


Figura 13 — Representação gráfica, equação de linearidade e coeficiente de correlação (r) da correlação entre a concentração sérica de insulina (pmol/L) e índice HOMAR-IR (%) em vacas no momento do parto

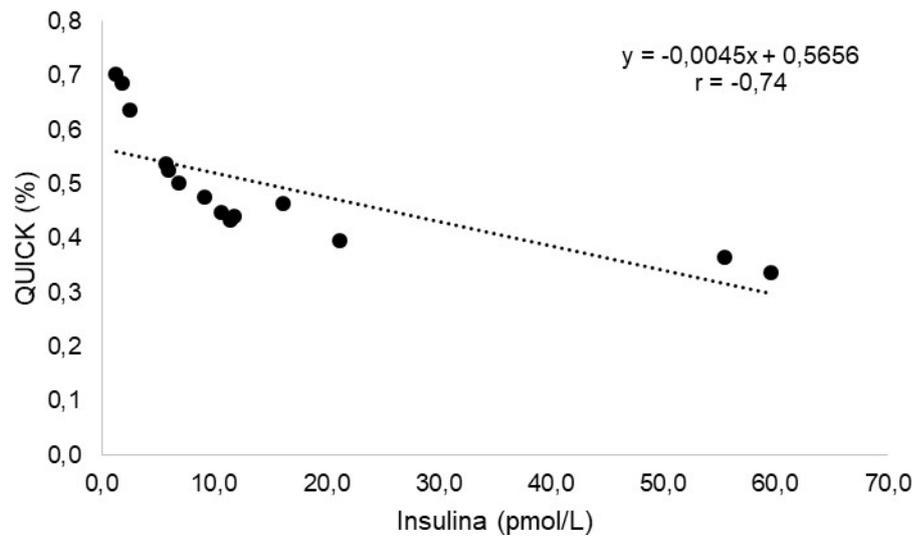


Figura 14 — Representação gráfica, equação de linearidade e coeficiente de correlação (r) da correlação entre a concentração sérica de insulina (pmol/L) e índice QUICK (%) em vacas no momento do parto

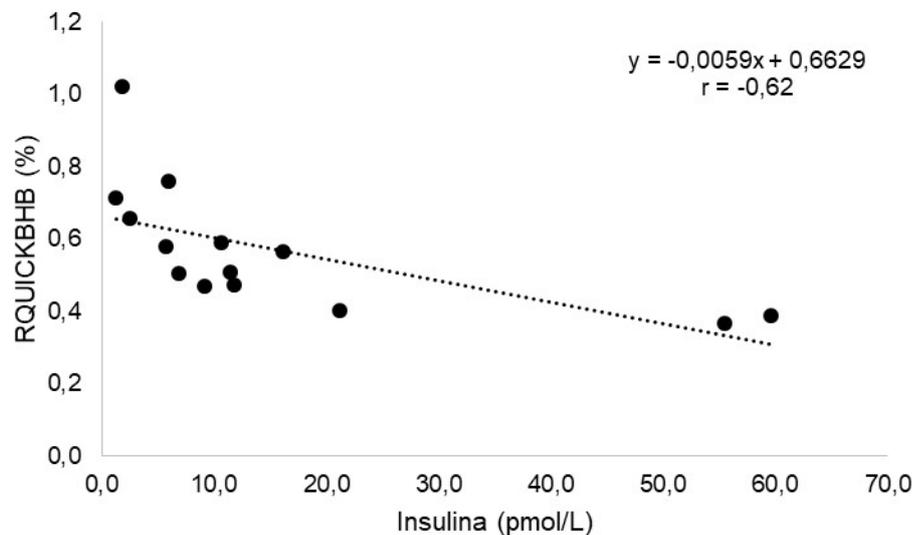


Figura 15 — Representação gráfica, equação de linearidade e coeficiente de correlação (r) da correlação entre a concentração sérica de insulina (pmol/L) e índice RQUICK_{βHB} (%) em vacas no momento do parto

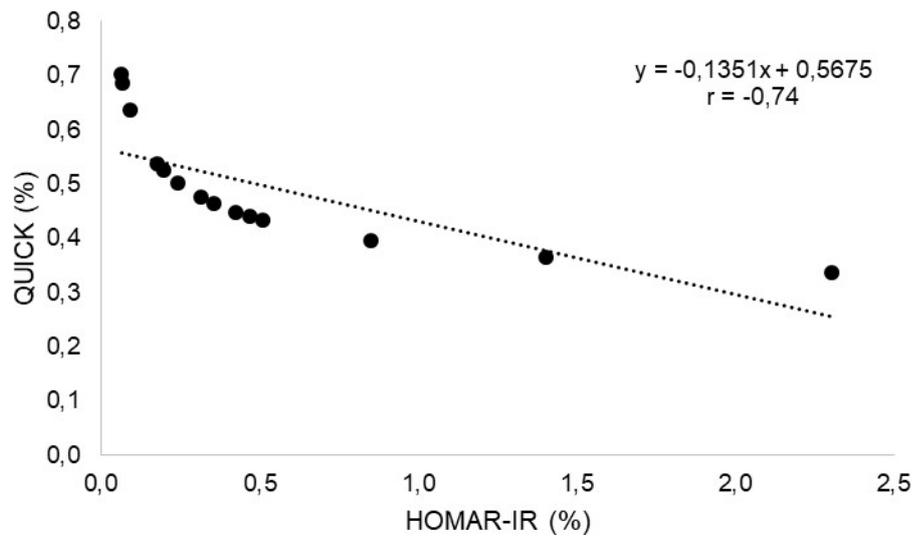


Figura 16 — Representação gráfica, equação de linearidade e coeficiente de correlação (r) da correlação entre o índice HOMAR-IR (%) e índice QUICK (%) em vacas no momento do parto

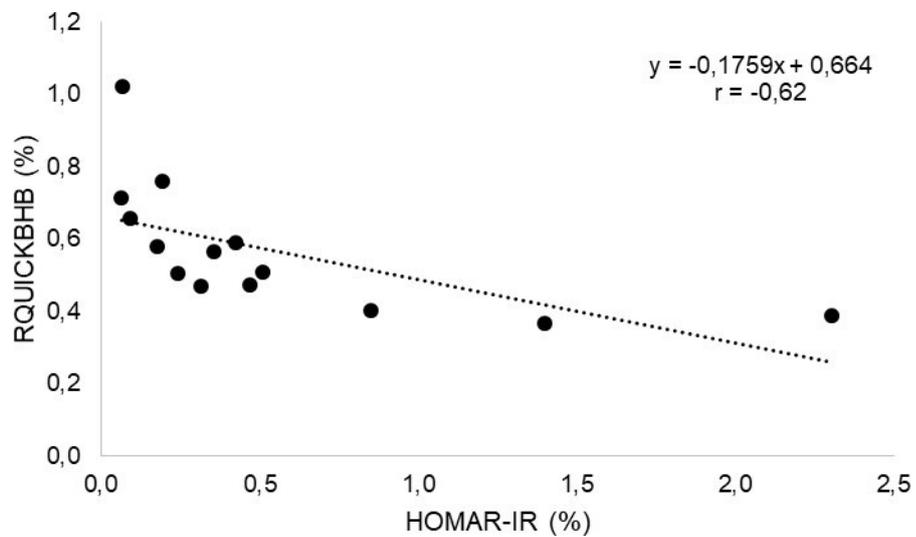


Figura 17 — Representação gráfica, equação de linearidade e coeficiente de correlação (r) da correlação entre o índice insulínica HOMAR-IR (%) e índice RQUICK β HB (%) em vacas no momento do parto

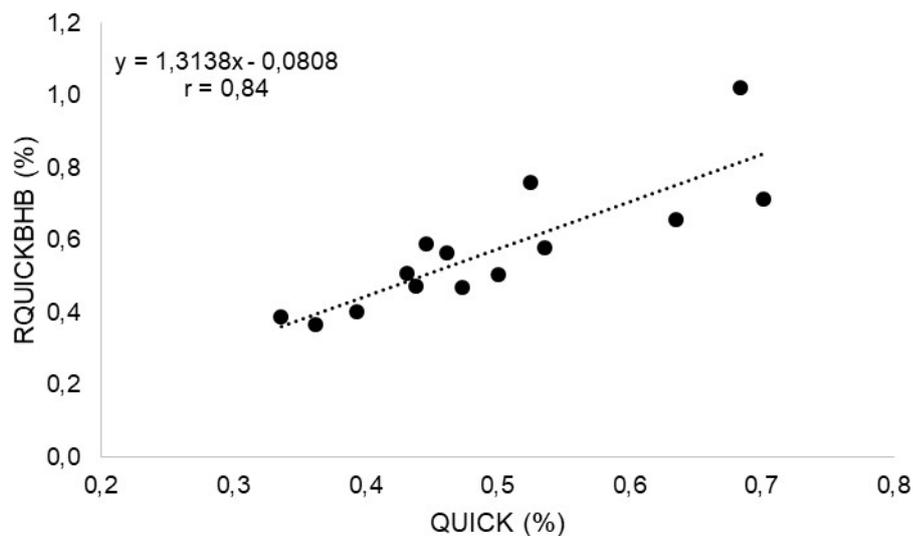


Figura 18 — Representação gráfica, equação de linearidade e coeficiente de correlação (r) da correlação entre o índice QUICK (%) e índice RQUICK_{βHB} (%) em vacas no momento do parto

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, investigamos a relação da expressão da chemerina no tecido placentário com diversos biomarcadores do perfil metabólico em vacas, no momento do parto, como: perfil de energético, proteico, de atividade enzimática, de eletrólitos, hormonal e índices de resistência insulínica.

Não observamos correlação direta significativa entre a expressão da chemerina e a maioria dos biomarcadores estudados ($p > 0,05$). Porém, houve uma moderada relação negativa entre chemerina e a concentração de sódio no soro (Na) ($r = -0,60$; $p = 0,0241$). Isso sugere que níveis mais altos de chemerina podem estar associados a níveis mais baixos de sódio no soro das vacas no momento do parto, apresentando um possível papel regulatório da chemerina no equilíbrio eletrolítico durante o parto. Não há relatos da literatura que possam corroborar com os dados encontrados no presente estudo sendo este o primeiro estudo a realizar este tipo de associação.

Outras correlações significativas envolvendo pares de variáveis metabólicas também foram encontradas neste estudo, como: uma alta correlação positiva entre

BHB e AGNE ($r=0,78$; $p=0,0016$); e entre proteína total (PT) e globulina ($r=0,83$; $p=0,0005$). Estes dados podem ser justificados, uma vez que durante o período de maior demanda energética, como no caso do parto, ocorre o aumento das concentrações de BHB e AGNE (GONZÁLEZ et al., 2011). Estas correlações sugerem interações importantes no perfil energético e protéico das vacas, refletindo o estado metabólico durante o parto.

Adicionalmente, houve uma série de correlações negativas significativas, como entre globulina e A:G ($r=-0,94$; $p<0,0001$), fósforo (P) e relação Ca:P ($r=-0,92$; $p<0,0001$), e potássio (K) e a razão Na:K ($r=-0,98$; $p<0,0001$). Contudo, este foi o primeiro estudo a mostrar este tipo de associação.

7. CONCLUSÃO

A chemerina está relacionada com os processos metabólicos e inflamatórios, entretanto há a carência de estudos quanto a sua expressão no tecido placentário durante o parto. No presente trabalho, a expressão da chemerina no tecido placentário não mostrou uma correlação significativa ampla para a maioria dos biomarcadores metabólicos analisados, exceto pela relação moderada negativa com o sódio. Com os dados obtidos, sugere-se que, embora a chemerina possa ter algum papel no equilíbrio eletrolítico, sua influência direta sobre outros aspectos do perfil metabólico em vacas, no momento do parto, pode ser limitada ou requer uma investigação mais aprofundada para ser elucidada.

8. PERSPECTIVAS

Para futuras pesquisas, é recomendado um foco mais detalhado na relação entre a chemerina e os biomarcadores específicos, além de estudos que possam elucidar os mecanismos pelos quais a chemerina pode influenciar o metabolismo e a homeostase durante o parto de vacas saudáveis em comparação com as vacas com cetose metabólica durante o parto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALKEDH, O.; PRIEFER, R. The Ketogenic Diet: Breath Acetone Sensing Technology. *Biosensors (Basel)*, v. 11, n. 1, p. 26, 2021. doi: 10.3390/bios11010026. PMID: 33478049; PMCID: PMC7835940.
- BALOGH, O.; et al. Interrelationships of growth hormone AluI polymorphism, insulin resistance, milk production and reproductive performance in Holstein-Friesian cows. *Veterinarni Medicina*, v.53, n.11, p.604-616, 2008.
- CONSTABLE, P. D.; STÄMPFLI, H. R. Experimental determination of net protein charge and A_{tot} and K_a of nonvolatile buffers in canine plasma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.19, p.507-514, 2005.
- COUPERUS, A. M.; SCHROEDER, F.; KLUKAS, R.; HUBER, J.; WITTEK, T.; PEHAM, J. R. Influence of Different Lactation Stages on Circadian Rhythmicity of Metabolic Biomarkers in Dairy Cows: A Pilot Study. *Animals (Basel)*, v. 11, n. 4, p. 1043, 2021. DOI: 10.3390/ani11041043. PMID: 33917264; PMCID: PMC8068053.
- DĄBEK, A.; WOJTALA, M.; PIROLA, L.; BALCERCZYK, A. Modulation of Cellular Biochemistry, Epigenetics and Metabolomics by Ketone Bodies. Implications of the Ketogenic Diet in the Physiology of the Organism and Pathological States. *Nutrients*, v. 12, n. 3, p. 788, 17 mar. 2020. doi: 10.3390/nu12030788. PMID: 32192146; PMCID: PMC7146425.
- DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H.; STÖBER, M. R. Exame Clínico dos Bovinos. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993.
- GONZÁLEZ, F. D.; MUIÑO, R.; PEREIRA, V.; CAMPOS, R.; BENEDITO, J. L. Relationship among blood indicators of lipomobilization and hepatic function during early lactation in high-yielding dairy cows. *Journal of Veterinary Science*, v. 12, n. 3, p. 251-255, 2011. DOI: 10.4142/jvs.2011.12.3.251.
- GORALSKI, K. B.; McCARTHY, T. C.; HANNIMAN, E. A.; et al. Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, v.282, n.38, p.28175-28188, set. 2007. DOI: 10.1074/jbc.M700793200. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M700793200>.
- GORDON, J. L.; LEBLANC, S. J.; DUFFIELD, T. F. Ketosis treatment in lactating dairy cattle. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, v.29, n.2, p.433-445, 2013. DOI: 10.1016/j.cvfa.2013.03.001. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2013.03.001>.

GULIŃSKI, P. Ketone bodies - causes and effects of their increased presence in cows' body fluids: A review. *Veterinary World*, v.14, n.6, p.1492-1503, jun. 2021. DOI: 10.14202/vetworld.2021.1492-1503. Disponível em: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.1492-1503>.

HOLTENIUS, P.; HOLTENIUS, K. A model to estimate insulin sensitivity in dairy cows. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.49, n.29, p.1-3, 2007.

HUBNER, A.; CANISSO, I. F.; PEIXOTO, P. M.; COELHO, W. M. Jr; RIBEIRO, L.; ALDRIDGE, B. M.; MENTA, P.; MACHADO, V. S.; LIMA, F. S. Characterization of metabolic profile, health, milk production, and reproductive outcomes of dairy cows diagnosed with concurrent hyperketonemia and hypoglycemia. *Journal of Dairy Science*, v. 105, n. 11, p. 9054-9069, 2022. DOI: 10.3168/jds.2021-21327.

INGLETSEN, K. L. Feeding- and management-related diseases in the transition cow: Physiological adaptations around calving and strategies to reduce feeding-related diseases. *Animal Feed Science and Technology*, v.126, n.3-4, p.175-213, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2010.02.007>.

ITLÉ, A. J.; HUZZEY, J. M.; WEARY, D. M.; von KEYSERLINGK, M. A. Clinical ketosis and standing behavior in transition cows. *Journal of Dairy Science*, v.98, n.1, p.128-134, jan. 2015. DOI: 10.3168/jds.2014-7932. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2014-7932>.

KANEMKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6th ed. San Diego: Academic Press, 2008, 916p.

KASIMANICKAM, R.; KASIMANICKAM, V.; KASTELIC, J. P.; RAMSEY, K. Metabolic biomarkers, body condition, uterine inflammation and response to superovulation in lactating Holstein cows. *Theriogenology*, v. 146, p. 71-79, 1 abr. 2020. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2020.02.006. Epub 6 fev. 2020. PMID: 32062150.

KOLB, H.; KEMPF, K.; RÖHLING, M.; LENZEN-SCHULTE, M.; SCHLOOT, N. C.; MARTIN, S. Ketone bodies: from enemy to friend and guardian angel. *BMC Med*, [S.l.], v. 19, n. 1, p. 313, 9 dez. 2021. DOI: 10.1186/s12916-021-02185-0. PMID: 34879839; PMCID: PMC8656040.

LITTLE, T. M.; HILLS, F. J. *Agricultural experimentation: design and analysis*. New York: John Wiley, 1978, 350p.

LOIKLUNG, C.; SUKON, P.; THAMRONGYOSWITTAYAKUL, C. Global prevalence of subclinical ketosis in dairy cows: A systematic review and meta-analysis. *Research in Veterinary Science*, v.144, p.66-76, 2022. DOI: 10.1016/j.rvsc.2022.01.003.

MASEVICIUS, F. D.; et al. Diferença de íons fortes na urina como determinante importante das alterações na concentração plasmática de cloreto em pacientes no pós-operatório. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, v.25, p.197-204, 2013. DOI: 10.5935/0103-507X.20130035.

McART, J. A. A.; et al. Elevated non-esterified fatty acids and β -hydroxybutyrate and their association with transition dairy cow performance. *The Veterinary Journal*, v.198, n.3, p.560-570, 2013. DOI: 10.1016/j.tvjl.2013.08.011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.08.011>.

McNAMARA, J. P.; HILLERS, J. K. Regulation of bovine adipose tissue metabolism during lactation. 2. Lipolysis response to milk production and energy intake. *Journal of Dairy Science*, v.69, n.12, p.3042-3050, dez. 1986. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(86)80767-6. Disponível em: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(86\)80767-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(86)80767-6).

MUNIYAPPA, R.; et al. Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v.294, p.15-26, 2008. DOI: 10.1152/ajpendo.00645.2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00645.2007>.

MUSA-VELOSO, K.; LIKHODII, S. S.; CUNNANE, S. C. Breath acetone is a reliable indicator of ketosis in adults consuming ketogenic meals. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 76, n. 1, p. 65-70, jul. 2002. doi: 10.1093/ajcn/76.1.65. PMID: 12081817.

NORTON, L.; SHANNON, C.; GASTALDELLI, A.; DEFRONZO, R. A. Insulin: The master regulator of glucose metabolism. *Metabolism*, v. 129, p. 155142, abr. 2022. doi: 10.1016/j.metabol.2022.155142. Epub 2022 Jan 20. PMID: 35066003.

PUPPEL, K.; KUCZYŃSKA, B. Metabolic profiles of cow's blood; a review. *Journal of Science and Food Agriculture*, v. 96, n. 13, p. 4321-4328, Oct. 2016. DOI: 10.1002/jsfa.7779. Epub 2016 May 31. PMID: 27129620.

QIU, S.; CAI, Y.; YAO, H.; LIN, C.; XIE, Y.; TANG, S.; ZHANG, A. Small molecule metabolites: discovery of biomarkers and therapeutic targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 8, n. 1, p. 132, 20 mar. 2023. DOI: 10.1038/s41392-023-01399-3. PMID: 36941259; PMCID: PMC10026263.

SUZUKI, Y.; HAGA, S.; KATOH, D.; SO, K. H.; CHOI, K. C.; JUNG, U. S.; LEE, H. G.; KATOH, K.; ROH, S. G. Chemerin is a novel regulator of lactogenesis in bovine mammary epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 466, n. 3, p. 283-288, 2015. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.08.105. Epub 2015 Sep 2. PMID: 26342800.

SUZUKI, Y.; HONG, Y. H.; SONG, S. H.; ARDIYANTI, A.; KATO, D.; SO, K. H.; KATOH, K.; ROH, S. G. The regulation of Chemerin and CMKLR1 genes expression by TNF- α , Adiponectin, and Chemerin Analog in Bovine Differentiated Adipocytes. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, v. 25, n. 9, p. 1316-1321, 2012. doi: 10.5713/ajas.2012.12083. PMID: 25049696; PMCID: PMC4092937.

TUFARELLI, V.; PUVAČA, N.; GLAMOČIĆ, D.; PUGLIESE, G.; COLONNA, M. A. The Most Important Metabolic Diseases in Dairy Cattle during the Transition Period. *Animals (Basel)*, v. 14, n. 5, p. 816, 2024. DOI: 10.3390/ani14050816. PMID: 38473200; PMCID: PMC10930595.

WALLESER, E.; MANDUJANO REYES, J. F.; ANKLAM, K.; HÖLTERSINKEN, M.; HERTEL-BOEHNKE, P.; DÖPFER, D. Developing a predictive model for beta-hydroxybutyrate and non-esterified fatty acids using milk fourier-transform infrared spectroscopy in dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 197, p. 105509, 2021. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2021.105509. Epub 2021 Oct 17. PMID: 34678645; PMCID: PMC8627475.

WATHES, D. C.; CHENG, Z.; SALAVATI, M.; BUGGIOTTI, L.; TAKEDA, H.; TANG, L.; BECKER, F.; INGVARTSEN, K. I.; FERRIS, C.; HOSTENS, M.; CROWE, M. A.; GPLUSE CONSORTIUM. Relationships between metabolic profiles and gene expression in liver and leukocytes of dairy cows in early lactation. *Journal of Dairy Science*, v. 104, n. 3, p. 3596-3616, Mar. 2021. DOI: 10.3168/jds.2020-19165. Epub 2021 Jan 15. Erratum in: *Journal of Dairy Science*, v. 104, n. 5, p. 6327, May 2021. DOI: 10.3168/jds.2021-104-5-6327. PMID: 33455774.

WITTAMER, V.; FRANSSEN, J. D.; VULCANO, M.; MIRJOLET, J. F.; LE POUL, E.; MIGEOTTE, I.; BRÉZILLON, S.; TYLDESLEY, R.; BLANPAIN, C.; DETHEUX, M.; MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; VASSART, G.; PARMENTIER, M.; COMMUNI, D. Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. *J Exp Med*, v. 198, n. 7, p. 977-985, 2003. doi: 10.1084/jem.20030382. PMID: 14530373; PMCID: PMC2194212.

YAMAUCHI, E.; SUZUKI, Y.; SO, K. H.; SUZUKI, K.; KATOH, K.; ROH, S. G. Single Nucleotide Polymorphism in the Coding Region of Bovine Chemerin Gene and Their Associations with Carcass Traits in Japanese Black Cattle. *Asian-Australas J Anim Sci*, v. 28, n. 8, p. 1084-1089, 2015. doi: 10.5713/ajas.14.0560. PMID: 26104515; PMCID: PMC4478475.