

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**SUPLEMENTAÇÃO COM BIOTINA NO CRESCIMENTO DO CASCO
E NO METABOLISMO ENERGÉTICO DE BEZERRAS**

Paulo José Bastos Queiroz
Orientador: Prof. Dr. Luiz Antônio Franco da Silva

GOIÂNIA
2017



TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

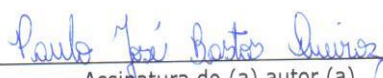
Nome completo do autor: Paulo José Bastos Queiroz

Título do trabalho: Suplementação com biotina no crescimento do casco e no metabolismo energético de bezerras

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do (a) autor (a)

Data: 18 / 05 / 2017

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

PAULO JOSÉ BASTOS QUEIROZ

SUPLEMENTAÇÃO COM BIOTINA NO CRESCIMENTO DO CASCO E NO METABOLISMO ENERGÉTICO DE BEZERRAS

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciência Animal junto à Escola de
Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de
Goiás

Área de Concentração:

Patologia, clínica e cirurgia

Linha de Pesquisa:

Alterações clínicas, metabólicas e toxêmicas dos
animais e meios auxiliares de diagnóstico

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Antônio Franco da Silva – EVZ/UFG

Comitê de Orientação:

Profa. Dra. Danieli Brolo Martins – EVZ/UFG

Profa. Dra. Marina Pacheco Miguel – IPTSP/UFG

GOIÂNIA

2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Queiroz, Paulo José Bastos

Suplementação com biotina no crescimento do casco e no metabolismo energético de bezerras [manuscrito] / Paulo José Bastos Queiroz. - 2017.

xvii, 83 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antônio Franco da Silva; co-orientadora Dra. Danieli Brolo Martins; co-orientador Dr. Marina Pacheco Miguel.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiânia, 2017.

Bibliografia. Anexos.

Inclui abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. bovino. 2. claudicação. 3. gliconeogênese. 4. lipidograma. 5. tecido córneo. I. Silva, Luiz Antônio Franco da, orient. II. Título.

CDU 639.09

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



1 ATA NÚMERO **459** DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DO PROGRAMA DE
2 PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
3 DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS. Às **09h00min** do dia **03/03/2017**, reuniu-se na sala
4 de defesas do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, a Comissão Julgadora infra
5 nomeada para proceder ao julgamento da Defesa de Dissertação de Mestrado apresentado (a) pelo
6 (a) Pós-Graduando (a) **Paulo José Bastos de Queiroz**, intitulada: *“Efeito da suplementação com*
7 *biotina no crescimento do casco e no metabolismo energético de bezerras*”, apresentado para
8 obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal, junto à Área de Concentração: **Patologia,**
9 **Clínica e Cirurgia Animal**, desta Universidade. O Presidente da Comissão Julgadora, **Prof. Dr.**
10 **Luiz Antônio Franco da Silva**, iniciando os trabalhos, concedeu a palavra ao (a) candidato (a)
11 **Paulo José Bastos de Queiroz** para exposição em **quarenta** minutos do seu trabalho. A seguir, o
12 senhor Presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos Examinadores, os quais
13 passaram a arguir o (a) candidato (a), durante o prazo máximo de **vinte** minutos, assegurando-se ao
14 mesmo igual prazo para responder aos Senhores Examinadores. Ultimada a arguição, que se
15 desenvolveu nos termos regimentais, a Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento,
16 considerando o (a) candidato (a) **Aprovado (a) ou Reprovado (a):**

17 Prof. Dr. Luiz Antônio Franco da Silva (Orientador (a))

18 Profa. Dra. Ozana de Fátima Zacaroni

19 Profa. Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti

20 Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o(a) candidato(a) **Paulo José Bastos**
21 **de Queiroz**, Habilitado [(Habilitado(a) ou não Habilitado(a))] pelo(s)
22 motivo(s) abaixo exposto(s):

23 _____

24 _____

25 _____

26 _____

27 _____

28 _____

29 _____

30 _____

31 _____

32 _____

33 _____

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



34 A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da dissertação:

35 suplementação com bixina no crescimento
36 do casco e no metabolismo energético
37 de bovinos.

38 _____

39 _____

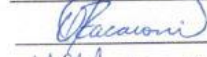
40 _____

41 Nada mais havendo a tratar, eu **Prof. Dr. Luiz Antônio Franco da Silva** lavrei a presente ata que,
42 após lida e achada conforme foi por todos assinada.

43 Prof. Dr. Luiz Antônio Franco da Silva

44 Profa. Dra. Ozana de Fátima Zacaroni

45 Profa. Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti


Dedico este trabalho aos meus pais, José
Rodrigues e Abilene, e aos meus
avós, Isaías e Maria Paula.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, meu Senhor e salvador, único digno de toda honra, glória e louvor, por ter me protegido e fortalecido durante toda a minha vida. Muito obrigado Deus pela oportunidade de cursar minha segunda pós-graduação, algo tão difícil para a maioria da população brasileira. Obrigado pelas oportunidades a mim concedidas e pelas portas que Tens aberto constantemente. Que Tua vontade sempre prevaleça em minha vida!

Agradeço aos meus pais, José Rodrigues de Queiroz e Abilene Antônia de Bastos Queiroz, pelo amor, dedicação e incentivo. Obrigado pelos ensinamentos, pelas orações e por nunca terem medido esforços para me proporcionarem uma educação de qualidade. Obrigado, pai, por ter me ensinado essa profissão tão linda que é a Medicina Veterinária. Obrigado, mãe, por ter sempre me encorajado a lutar por meus objetivos. Vocês têm minha admiração! Amo vocês!

Aos meus avós, Isaías Antônio de Bastos e Maria Paula de Bastos que sempre se lembraram de mim em suas orações. Obrigado pelo amor e carinho. Por terem me coberto com suas orações diárias. Este trabalho também é de vocês, que me ajudaram espiritualmente nos momentos de maior dificuldade. Ao meu irmão Isaías Rodrigues Bastos Queiroz, que esteve comigo durante todo o período da residência e do mestrado. Obrigado pelas comidas deliciosas e pela organização da casa nos momentos que não pude ajudar. Agradeço, também, a todos os familiares pelo apoio, preocupação e carinho dispensados a mim durante essa jornada. Muito Obrigado! Amo todos vocês!

À minha namorada Maevy Rocha que apoiou, aguentou e torceu por mim durante a residência e o mestrado. Sem você essa caminhada não seria a mesma. Obrigado pelo carinho e dedicação ao nosso relacionamento. Te amo muito!

Aos amigos Kaique, Marlo Jr., Diogo, Thiago (Tico), Douglas (Rato), José Américo (Juninho) e Kauê pelos momentos de alegria e descontração durante as férias e feriados em Alto Araguaia. Aos companheiros de mestrado Ana Carolina (Kaika), Paula, Evelyn e Luiza, que com muita alegria, companheirismo e descontração tornaram esse período mais leve e feliz. Vocês são ótimos!

Em especial, deixo meu agradecimento e admiração ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Antônio Franco da Silva. Obrigado por acreditar e confiar em mim. Agradeço pelos ensinamentos e orientação durante a graduação, residência e mestrado. Obrigado pelo tempo dedicado a execução deste trabalho e às inúmeras correções de projetos, seminários, artigos,

dissertação, etc. Obrigado por me ensinar que “sozinho podemos chegar mais rápido, mas juntos chegaremos mais longe”. Sem dúvidas, é um lema que pretendo levar por toda vida.

Aos meus co-orientadores, Daniele Brolo Martins e Marina Pacheco Miguel, agradeço pela paciência, atenção e contribuição científica para a execução das atividades deste projeto.

Agradeço aos companheiros do Grupo de Clínica e Cirurgia Animal, Adalberto, Amanda, Ana Paula, Daiane, Damilla, Danilo Conrado, Dionísio, Élcio, Heitor, João Felipe, Mariana, Matheus, Saulo, Vinícius e Wanessa, que me ajudaram imensamente no manejo dos animais, avaliações e colheitas realizadas durante o experimento. Sem vocês eu não chegaria até aqui. Agradeço, também, à Dona Vilda pela organização dos materiais e pelos almoços deliciosos realizados durante o experimento. Muito obrigado! “Tamo Junto!!”

Agradeço à Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) por ter me acolhido e me concedido a oportunidade de crescer profissionalmente. A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal pela contribuição com meu crescimento profissional e científico. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão do auxílio financeiro durante o curso.

A todos, meus sinceros agradecimentos.

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento,
mais evidente fica nossa ignorância”.

John F. Kennedy

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Morfologia do estojo córneo bovino	3
2.1.1. Anatomia e histologia do estojo córneo bovino	3
2.1.2. Camada córnea tubular	9
2.2. Queratinização do casco bovino	10
2.3. Nutrientes importantes para a queratinização do casco.....	12
2.3.1. Aminoácidos.....	12
2.3.2. Minerais.....	13
a) Cálcio.....	13
b) Zinco	13
c) Cobre	14
d) Selênio.....	14
2.3.3. Vitaminas.....	14
a) Vitamina A	14
b) Vitamina D	15
c) Vitamina E.....	15
d) Biotina	15
2.4. Funções metabólicas da biotina.....	16
2.5. Influência da suplementação com biotina na qualidade do casco bovino	16
2.5.1. Efeito da suplementação com biotina no crescimento e desgaste do casco	17
2.6. Efeito da suplementação com biotina em parâmetros bioquímicos de bovinos.....	18
REFERÊNCIAS	19
3. OBJETIVOS.....	25
3.1. Objetivo geral	25
3.2. Objetivos específicos.....	25
CAPÍTULO 3 - Crescimento do casco e ganho de peso de bezerras mestiças (Jersey x Holandês) suplementadas com biotina.....	26
CAPÍTULO 4 - A suplementação com biotina interfere no metabolismo da glicose e dos lipídios em bezerras?	41
CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
ANEXOS.....	55

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

FIGURA 1 – Estojo córneo dos dígitos principais e dígito rudimentares dos bovinos.....	4
FIGURA 2 – Corte sagital do dígito principal e rudimentar lateral do membro torácico bovino.	4
FIGURA 3 – Micrografia da região do bulbo do casco bovino. Derme solear (D) e as papilas dérmicas (setas amarelas) recobertas pelo estrato basal da epiderme, onde ocorre a proliferação das células epidérmicas (setas pretas). (E) Epiderme viva e (H) epiderme cornificada. Reação de ácido periódico-Schiff (PAS) com hematoxilina como contraste.....	6
FIGURA 4 – Segmentação do casco bovino e demonstração das camadas: tela subcutânea, derme e epiderme.....	7
FIGURA 5 – Derme coronariana (seta amarela) e parietal (seta vermelha) de um bovino após exungulação.	8
FIGURA 6 – Demonstração esquemática do desenvolvimento do tecido córneo tubular e intertubular sobre as papilas dérmicas.....	9
FIGURA 7 – Tecido córneo tubular e intertubular. (A) Secção transversal dos túbulos córneos do segmento coronário do casco bovino (setas). (B) Micrografia eletrônica de varredura mostrando a abertura da medula de um túbulo córneo. As papilas dérmicas encaixam-se nessas aberturas.	10
FIGURA 8 – Esquema demonstrando o processo de queratinização cutânea.....	12

Capítulo 2

FIGURA 1 - Representação da marcação e das medidas realizadas. A – Casco na primeira avaliação. B – Casco na avaliação subsequente após 30 dias. C – Representação da medida da altura do talão. Crescimento da muralha dorsal = $C2 - C1$. Desgaste da muralha dorsal = $D1 - D2$	30
FIGURA 2 - Taxa de crescimento líquido da muralha dorsal (mm/mês) dos dígitos laterais dos membros torácico (a) e pélvico direito (b) de bezerras mestiças (Jersey x Holandês) suplementadas ou não com 20 mg de biotina durante 120 dias. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras	

maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os momentos de avaliação pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). 33

FIGURA 3 - Crescimento do talão dos dígitos laterais dos membros torácico (A) e pélvico direito (B) de bezerras mestiças (Jersey x Holandês) suplementadas ou não com 20 mg de biotina durante 120 dias. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os momentos de avaliação pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). 33

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

TABELA 1 - Crescimento total, desgaste total e crescimento líquido total da muralha dorsal do casco lateral dos membros torácico e pélvico direito de bezerras mestiças (Jersey x Holandês) suplementadas ou não com 20 mg de biotina durante 120 dias.	31
TABELA 2 - Taxas mensais de crescimento, desgaste e crescimento líquido da muralha dorsal do casco do dígito lateral do membro torácico direito de bezerras mestiças (Jersey x Holandês), suplementadas ou não com 20 mg de biotina durante 120 dias.	32
TABELA 3 - Crescimento do talão dos dígitos laterais dos membros torácico e pélvico direito de bezerras mestiças (Jersey x Holandês) suplementadas ou não com 20 mg de biotina durante 120 dias.	33
TABELA 4 - Ganho de peso diário (Kg/dia) de bezerras mestiças (Jersey x Holandês) suplementadas ou não com 20 mg de biotina por dia durante 120 dias.	34

Capítulo 3

TABELA 1 - Efeito da suplementação com 20 mg/dia de biotina durante 120 dias na concentração de glicose, frutossamina, lactato, colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) de bezerras mestiças (Jersey x Holandês).	52
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ácidos Graxos Não Esterificados	-	AGNE
Acetil-CoA Carboxilase	-	ACC
Espécies Reativas do Oxigênio	-	EROs
Fator de Crescimento Epidérmico	-	FCE
Lipoproteína de alta densidade	-	HDL
Lipoproteína de baixa densidade	-	LDL
Lipoproteínas de densidade muito baixa	-	VLDL
β -metilcrotonil-CoA	-	MCC
Piruvato-Carboxilase	-	PC
Propionil-CoA Carboxilase	-	PCC
Proteínas Associadas à Queratina	-	KAPs
Substância Cementante Intercelular	-	SCI

RESUMO

Este estudo objetivou avaliar o efeito da suplementação com biotina no crescimento e desgaste da muralha dorsal do casco e no ganho de peso diário de bezerras mestiças. Objetivou-se também avaliar o efeito da suplementação dessa vitamina no lipidograma, na frutossamina sérica e na concentração plasmática de glicose e lactato desses mesmos animais. Foram utilizadas 12 bezerras, mestiças (Jersey X Holandês), seis meses de idade e peso médio de $124,08 \pm 16,57$. As bezerras foram divididas em Grupo Controle e Grupo Biotina, contendo seis animais em cada grupo. Os animais do Grupo Biotina receberam uma dose diária de 20 mg de biotina durante 120 dias. As medições do casco e as avaliações bioquímicas foram realizadas a cada 30 dias. O desgaste total da muralha dorsal no membro torácico do Grupo Controle foi maior ($p < 0,05$) do que o observado no Grupo Biotina para os 120 dias de avaliação. O crescimento líquido total da muralha dorsal do membro torácico foi maior ($p < 0,05$) no Grupo Biotina. No membro pélvico, não houve diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os grupos. Quanto aos parâmetros bioquímicos, observou-se que a suplementação com biotina não ocasionou diferença estatística em nenhum dos parâmetros avaliados. A suplementação diária com 20 mg de biotina durante 120 dias é capaz de promover redução da taxa de desgaste e, conseqüentemente, aumento do crescimento líquido da muralha dorsal do casco de bezerras mestiças (Jersey x Holandês). Entretanto, não interfere na concentração sanguínea de glicose, frutossamina, lactato e lipídios destes mesmos animais.

Palavras-chave: bovino, claudicação, gliconeogênese, lipidograma, tecido córneo, vitamina

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of biotin supplementation on dorsal hoof wall growth and wear, and on daily weight gain of crossbred heifers (Jersey x Holstein). In addition, the objective was to evaluate the effect of biotin supplementation on the lipidogram, serum fructosamine and plasma glucose and lactate concentration in these animals. Twelve crossbred heifers (Jersey x Holstein), six months old and weighted mean of 124.08 ± 16.57 were used. The heifers were divided into Control Group and Biotin Group, containing six animals in each group. Biotin group animals received a daily dose of 20 mg biotin for 120 days. Hoof and biochemical measurements were evaluated every 30 days. The total wear on the dorsal hoof wall in the thoracic limb of the Control Group was higher ($p < 0.05$) than the observed in the Biotin Group during the 120 days of evaluation. The total net growth of the dorsal hoof wall in the thoracic limb was greater ($p < 0.05$) in Biotin Group. In the pelvic limb, there were no statistical differences between the groups. In relation to biochemical parameters, it was observed that biotin supplementation did not cause statistical difference in any biochemical parameters evaluated. The daily supplementation with 20 mg of biotin for 120 days is capable of reducing the wear rate and, consequently, increasing the net growth of the dorsal hoof wall in crossbred heifers (Jersey x Holstein). However, it does not interfere with the blood glucose, fructosamine, lactate and lipids concentration on these animals.

Key words: bovine, gluconeogenesis, corneous tissue, lameness, lipidogram, vitamin

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. INTRODUÇÃO

As doenças digitais são um dos principais problemas da bovinocultura leiteira, ocasionando prejuízos relacionados a redução da produtividade, custos com tratamentos, descarte precoce de animais e redução da fertilidade¹. Além dos prejuízos econômicos, as doenças digitais são uma importante causa de redução das condições de bem-estar dos bovinos². O manejo intensivo de rebanhos leiteiros tem ocasionado aumento da incidência de tais doenças, em razão do maior número de fatores predisponentes, a saber dieta rica em carboidratos, maior umidade no ambiente, pisos abrasivos e alta concentração de animais¹. Esses fatores, isoladamente, ou associados podem comprometer a estrutura do casco e desencadear, principalmente, enfermidades infecciosas.

A estrutura do casco é formada pelo processo dinâmico de queratinização das células epidérmica, no qual ocorre uma diferenciação celular que transforma células epidérmicas vivas e funcionais, em células cornificadas denominadas queratinócitos³. O produto final da queratinização é o estrato córneo, camada mais externa da epiderme, formada por células repletas de filamentos de queratina⁴. A principal função da queratina é proteger os tecidos epiteliais contra agressões ambientais e desidratação⁵. Portanto, a estrutura e, conseqüentemente, a qualidade do tecido córneo que compõe o casco dependem de uma boa queratinização e esta, por sua vez, necessita de um adequado suprimento de aminoácidos, lipídios, vitaminas e minerais. Esses nutrientes são transferidos dos capilares sanguíneos da derme para os queratinócitos por meio de difusão⁶. Doenças podais como a laminite e deficiências nutricionais afetam a nutrição da epiderme, comprometendo a diferenciação das células epidérmicas e a produção de tecido córneo. Como consequência, ocorre síntese de tecido córneo de baixa qualidade que apresenta maior predisposição a danos químicos, físicos e microbianos¹.

A biotina é considerada um nutriente fundamental para o processo de queratinização⁵. Essa vitamina é necessária para a síntese de queratina e para a produção de ácidos graxos de cadeia longa que compõem a substância cementante intercelular (SCI)⁶. Além disso, participa como coenzima em vários processos metabólicos, dentre eles a gliconeogênese, o metabolismo do propionato, a síntese de ácidos graxos e a degradação do aminoácido leucina⁷. Diversos estudos demonstraram que a suplementação prolongada com biotina proporcionou efeitos positivos para o casco de bovinos⁸⁻¹¹, ovinos¹², equinos¹³⁻¹⁵ e suínos¹⁶.

O crescimento e o desgaste do casco podem ser influenciados por vários fatores, dentre eles idade, raça, estação do ano, nutrição e ambiente¹⁷. Pisos abrasivos e úmidos, associados a nutrição inadequada podem elevar a taxa de desgaste do casco acima da taxa de crescimento, situação que aumenta as chances de lesões¹⁸. A suplementação com biotina aumenta a taxa de crescimento do casco nas espécies bovina¹⁹ e equina^{15,20}, entretanto, em alguns estudos a vitamina não promoveu efeito positivo sobre esse parâmetro^{10,21}.

Existem relatos nos quais a suplementação com biotina promove a elevação da glicose plasmática em bovinos²², ratos²³ e ovelhas²⁴. Acredita-se que a elevação da glicose plasmática associada ao fornecimento dessa vitamina seja resultado do aumento da gliconeogênese e/ou glicogenólise²². No entanto, outras pesquisas realizadas em vacas leiteiras não encontraram nenhum efeito da suplementação com biotina na concentração plasmática de glicose^{25,26}. Como a biotina atua como cofator de enzimas envolvidas diretamente na gliconogênese e na síntese de ácidos graxos^{7,27} é possível que a suplementação dessa substância influencie no metabolismo da glicose e de lipídios. Entretanto, ainda que os efeitos da biotina tenham sido avaliados em vários estudos, percebe-se uma carência de informações quanto a influência dessa vitamina em bezerras pré-púberes, tanto em relação ao crescimento e desgaste do casco, quanto aos efeitos no perfil metabólico. Dessa forma, a busca por informações que auxiliem na elucidação dessas questões faz-se necessária.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Morfologia do estojo córneo bovino

2.1.1. Anatomia e histologia do estojo córneo bovino

Os ruminantes possuem dois dígitos principais, denominados dedos III e IV ou dígitos lateral e medial, que são recobertos em sua porção distal por dois cascos principais, separados pelo espaço interdigital. Na região palmar e plantar da quartela há dois dígitos rudimentares, dedos II e V, os quais são consideravelmente menores que os dígitos principais e formados apenas pelas falanges média e distal²⁸ (Figura 1). O casco ou estojo córneo é uma estrutura tegumentar modificada altamente queratinizada, que tem a função de transferir para o sistema musculoesquelético o impacto do membro ao apoiar no solo. Além disso, essa estrutura protege as camadas proliferativas da epiderme e o leito capilar da derme contra lesões²⁹. O casco atua também como amortecedor durante a locomoção, possibilitando a atenuação e a distribuição da tensão aplicada sobre os membros³⁰.

Os dígitos principais dos ruminantes são constituídos pela falange proximal, falange média, falange distal e pelo sesamóide distal, também conhecido como navicular. Há duas articulações em cada dígito, denominadas articulação interfalangeana proximal e interfalangeana distal³⁰. O casco circunda a porção distal da falange média, a articulação interfalangeana distal e a falange distal, juntamente com a inserção do tendão extensor digital comum no processo extensor e a inserção do tendão flexor digital profundo no tubérculo flexor, ambos na falange distal. Além dessas estruturas, o osso sesamóide distal também encontra-se no interior do casco e atua como uma tróclea para o tendão flexor digital profundo³¹ (Figura 2).

O estojo córneo é constituído por uma muralha que pode ser dividida em abaxial e axial. A muralha abaxial possui formato convexo e pode, ainda, ser subdividida em porções dorsal e lateral. A muralha axial é voltada para a região interdigital e apresenta formato côncavo^{28,30}. A sola e o bulbo completam a estrutura anatômica externa do estojo córneo³¹ (Figura 1). A sola do casco é relativamente plana e apresenta uma área côncava na face axial, a qual não entra em contato com o solo²⁸. A conexão entre a sola e a muralha do casco é realizada pela linha branca, estrutura formada por tecido córneo macio que possibilita uma junção flexível entre a muralha e a sola³⁰ (Figura 1). Em animais com o dígito saudável, o peso é sustentado principalmente pelos bulbos e pela muralha abaxial do casco³².

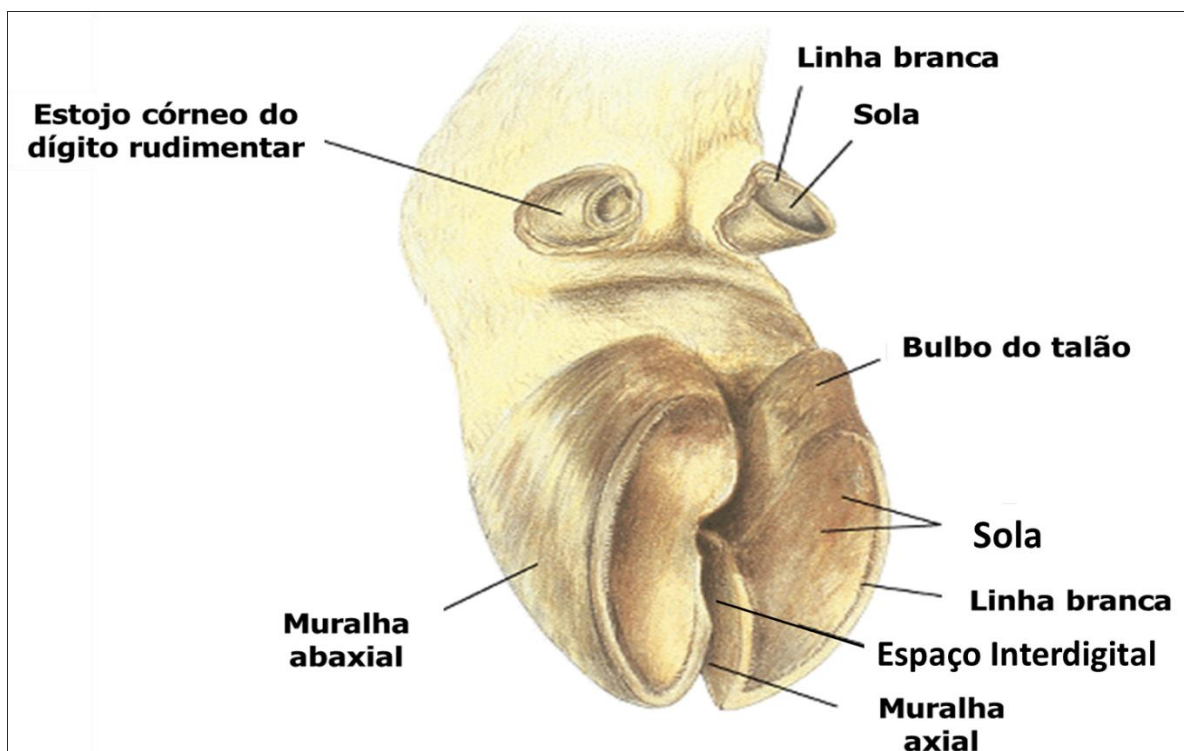


FIGURA 1 – Estojo córneo dos dígitos principais e dígito rudimentares dos bovinos.
Fonte: Greenough³³.

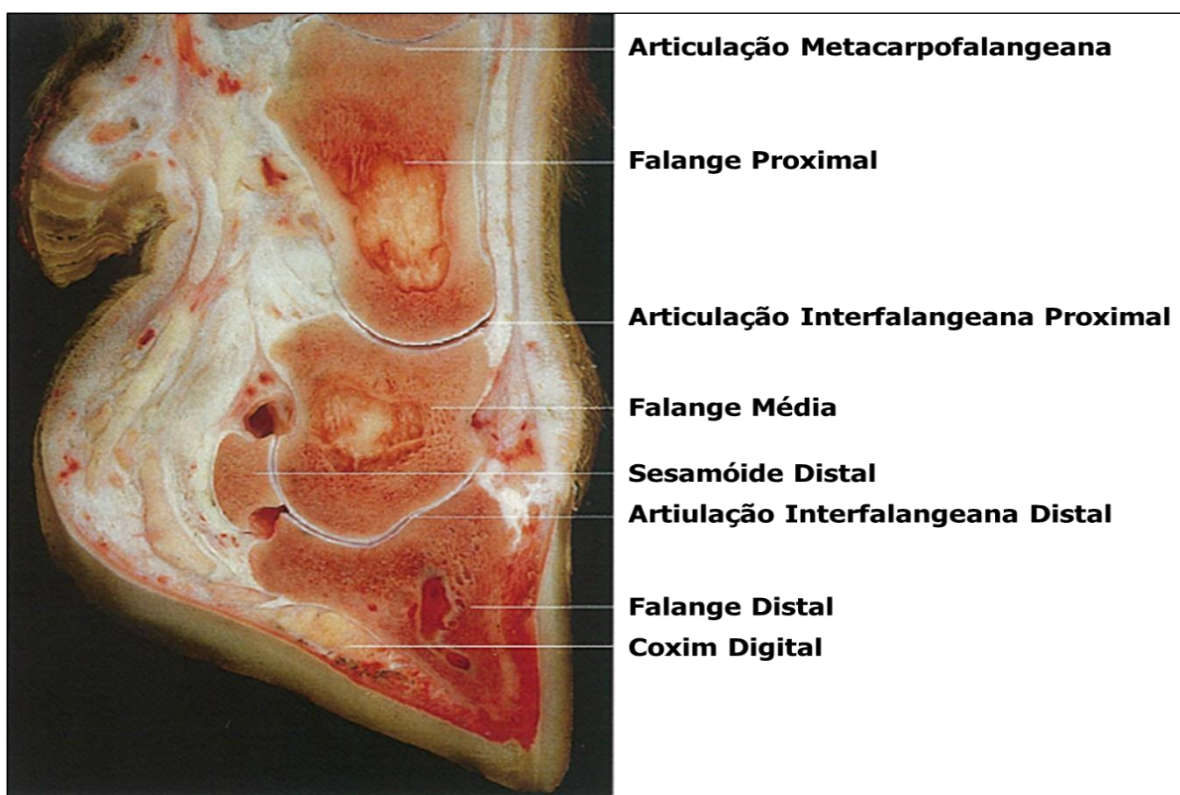


FIGURA 2 – Corte sagital do dígito principal e rudimentar lateral do membro torácico bovino.
Fonte: adaptado de Köning e Liebich²⁸.

O estojo córneo bovino apresenta espessura de aproximadamente 10 mm e 5 mm nas faces dorsal e axial, respectivamente. A proliferação da epiderme no perioplo empurra o tecido queratinizado distalmente e, assim, promove uma taxa de crescimento de aproximadamente 5 mm por mês. Observa-se que o crescimento do tecido córneo é mais intenso em bovinos jovens do que em adultos e que no membro pélvico esse crescimento é maior em relação ao membro torácico³¹. O ângulo formado entre a muralha dorsal do casco e a sola é de 50 a 55° e de 45 a 50°, nos membros torácicos e pélvicos respectivamente^{28,30}.

O casco é uma modificação das camadas que compõem a pele, sendo essas a tela subcutânea, a derme e a epiderme. A tela subcutânea ou tecido subcutâneo não está presente na parede e na sola do casco, pois nessas regiões há uma união mecânica estável entre a derme e a falange distal. Abaixo do perioplo, coroa e bulbo do casco, a tela subcutânea forma “almofadas” (*pulvinus*), constituídas por uma rede de fibras colágenas e elásticas intercaladas por tecido adiposo e ilhotas cartilaginosas²⁸. Essas estruturas são responsáveis pela absorção dos impactos durante a locomoção³¹.

A derme, também denominada de cório ou pododerma, é formada por tecido conjuntivo altamente vascularizado e innervado, que nutre e dá suporte ao estrato basal da epiderme^{5,34}. Em todos os segmentos do casco, com exceção da parede, a derme forma papilas, que são projeções da derme em direção a epiderme, formando saliências que aumentam a área de contato entre essas duas camadas³⁵ (Figura 3). Na parede do casco, a superfície dérmica apresenta lamelas paralelas, nomeadas de lamelas dérmicas, as quais se prolongam distalmente e se interdigitam com as lamelas epidérmicas^{28,35}, formando uma estrutura de projeções que se intercalam entre si¹. As lâminas dérmicas localizam-se abaixo da membrana basal e contêm o leito vascular que nutre a epiderme¹. A epiderme é avascular e recebe nutrientes por meio dos capilares da derme por difusão³⁶. Essa camada pode ser dividida em uma parte delgada formada por células vivas e uma parte mais espessa constituída por células cornificadas. A epiderme viva é composta pelo estrato basal, estrato espinhoso e estrato granuloso, enquanto que a epiderme cornificada é composta somente pela estrato córneo²⁸.

O casco pode ser dividido em cinco segmentos distintos, perióplico, seguimento coronário, seguimento parietal, seguimento solear e seguimento bulbar²⁸. O segmento perióplico (Figura 4) encontra-se entre a pele da quartela e o segmento coronário, onde forma uma faixa de aproximadamente 1 cm que se alarga na região posterior, transforma-se gradativamente no bulbo e une-se ao perioplo do outro casco. O perioplo fica parcialmente coberto por pelos e apresenta consistência intermediária entre a epiderme da pele e a muralha do casco³⁷. A tela subcutânea do perioplo torna-se mais espessa e forma o coxim do perioplo²⁸.

A derme perióplica é contínua com a derme da pele proximalmente, é altamente vascularizada e forma papilas dérmicas^{35,38}. A epiderme do perioplo é composta por tecido córneo tubular macio, o qual se estende distalmente sobre o segmento coronário²⁸.

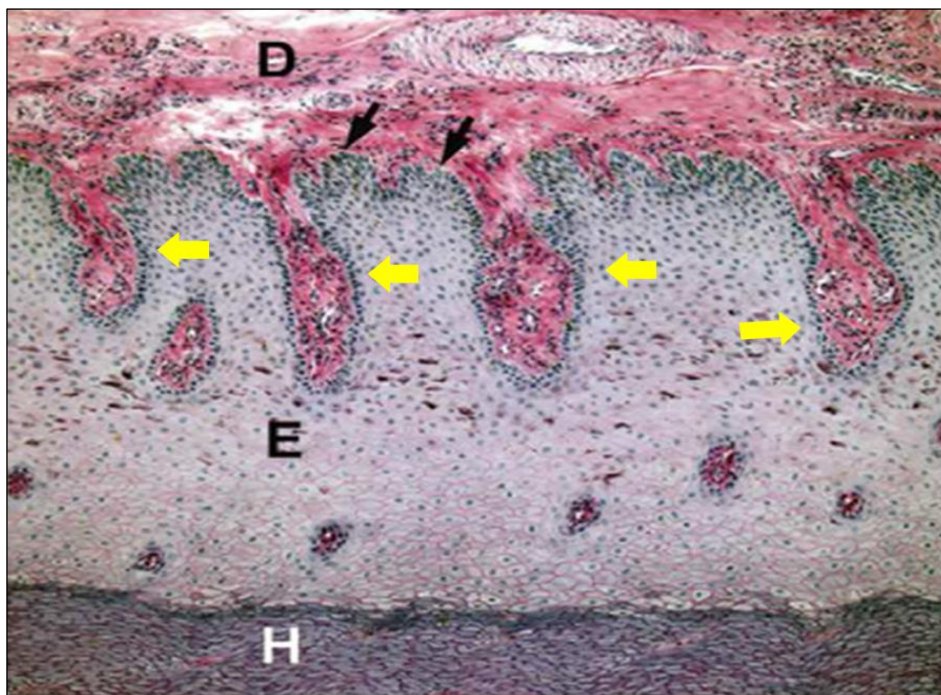


FIGURA 3 – Micrografia da região do bulbo do casco bovino. Derme solear (D) e as papilas dérmicas (setas amarelas) recobertas pelo estrato basal da epiderme, onde ocorre a proliferação das células epidérmicas (setas pretas). (E) Epiderme viva e (H) epiderme cornificada. Reação de ácido periódico-Schiff (PAS) com hematoxilina como contraste.

Fonte: adaptado de Greenough¹.

O segmento coronário constitui o segmento proximal do casco e apresenta formato de cinta em torno do estojo córneo. Situa-se distalmente ao perioplo, estendendo-se até o ponto médio da muralha do casco (Figura 4 e 5). A epiderme coronária consiste proximalmente de uma delgada camada de células proliferativas, seguida por uma camada de células cornificadas que formam o estrato médio da muralha do casco (lâmina córnea)³⁵. A camada cornificada é composta por túbulos córneos, que se distribuem na forma de queratina tubular e intertubular, formando a camada mais espessa e resistente da muralha do casco^{1,38}. A derme coronária emite papilas dérmicas espessas na base que se projetam e se encaixam nas depressões cônicas da epiderme coronária^{35,36}. A tela subcutânea coronária também é modificada, resultando na formação do coxim coronário²⁸ (Figura 4).

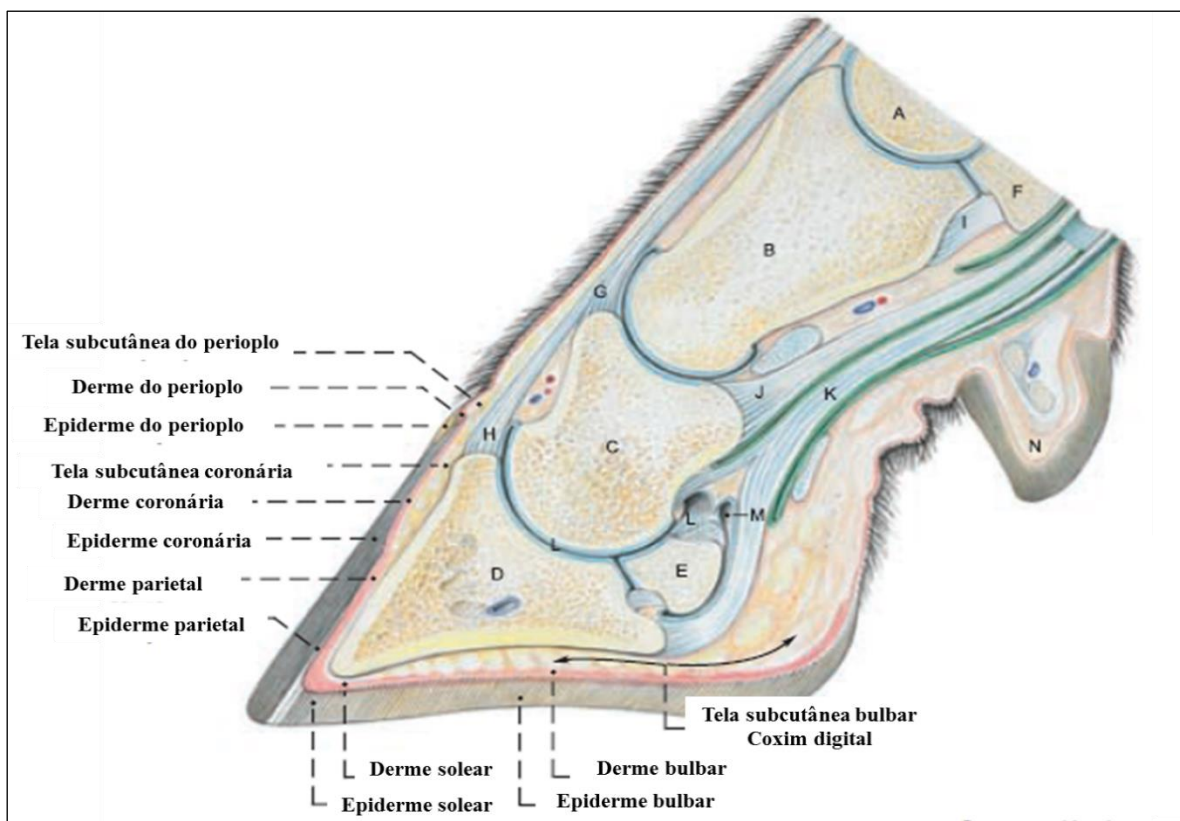


FIGURA 4 – Segmentação do casco bovino e demonstração das camadas: tela subcutânea, derme e epiderme.

Fonte: adaptado de Mulling e Budras³¹.

O segmento parietal localiza-se distalmente ao segmento coronário^{1, 36} (Figura 4 e 5). Este seguimento é coberto por uma espessa camada de tecido córneo, que é delimitada pelo segmento coronário na face proximal e estende-se distalmente até a sola¹. Não há tela subcutânea no segmento parietal, dessa forma a derme adere-se diretamente ao periósteo da falange distal. A derme do segmento parietal possui uma estrutura laminar, que se interdigita com as lâminas formadas pela epiderme parietal (Figura 5). As interdigitações entre as lâminas dérmicas e epidérmicas proporcionam uma união altamente resistente entre o estojo córneo e a falange distal²⁸. A estrutura laminar que une a derme e a epiderme parietal aumenta a área da superfície de conexão do aparato suspensório. Essa maior superfície de conexão apresenta duas funções: maior suprimento nutricional e melhor estabilidade mecânica à junção dermo-epidérmica¹.

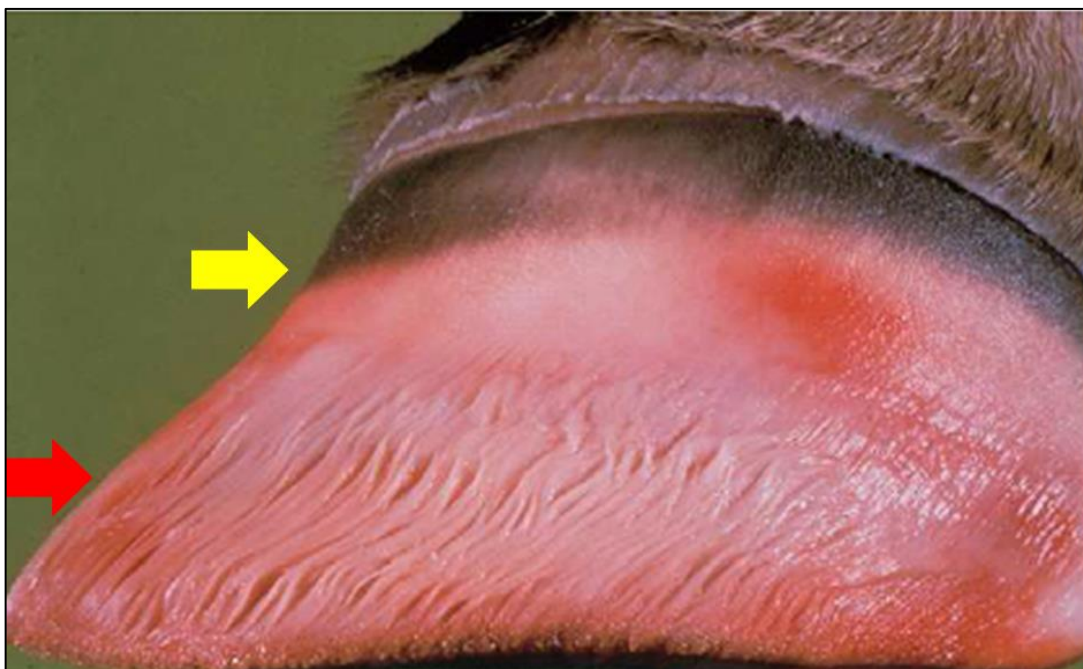


FIGURA 5 – Derme coronariana (seta amarela) e parietal (seta vermelha) de um bovino após exungulação.
Fonte: adaptado de Greenough¹.

O segmento solear é delimitado pela linha branca axial, abaxial e pelo segmento bulbar na região palpar/plantar³⁶ (Figura 1). Este segmento é constituído por uma superfície plana, que contribui para a adequada distribuição do peso no casco. Na epiderme solear cornificada formam-se túbulos de tecido córneo, que são menos densos do que os túbulos córneos do segmento parietal^{1,39}. Assim como o segmento parietal, a sola não possui tela subcutânea²⁸. A sola é unida à muralha do casco pela linha branca, a qual é constituída por tecido córneo macio e constitui a área de maior fragilidade do casco, o que a torna uma região bastante vulnerável à lesões^{1,39}.

O segmento bulbar é a região mais caudal do casco e, junto com o segmento solear e a muralha, compõe a superfície de contato do casco com o solo²⁸ (Figura 1 e 4). É a principal região de absorção de impacto do casco bovino³⁷, a pois a tela subcutânea bulbar forma uma “almofada” digital bem desenvolvida, conhecida como coxim digital (Figura 4). O coxim digital é composto por uma mistura de fibras colágenas e elásticas entremeadas por tecido adiposo⁴⁰. A epiderme bulbar é formada por uma fina camada de células proliferativas recobertas por uma camada de células corfinicadas, que formam tecido córneo tubular³⁵.

2.1.2. Camada córnea tubular

Nos segmentos do casco em que a derme forma papilas dérmicas, o estrato córneo da epiderme organiza-se em estruturas tubulares denominadas túbulos córneos, os quais são rodeados por tecido córneo intertubular^{4,28}. Os túbulos córneos são formados por uma região central denominada medula, a qual é constituída por tecido um córneo macio e frágil. Externamente à medula, encontra-se o córtex, estrutura formada por tecido córneo rígido¹. O córtex é constituído pela epiderme peripapilar situada nas laterais das papilas dérmicas, enquanto a medula é formada pela epiderme suprapapilar na extremidade das papilas dérmicas (Figura 6). No córtex, os queratinócitos diferenciam-se sob circunstâncias nutricionais ótimas, pois sua posição peripapilar proporciona maior aporte de nutrientes. Enquanto que os queratinócitos situados na medula recebem menor aporte nutricional e, consequentemente, apresentam uma queratinização de baixa qualidade e, com o tempo, desintegram-se, deixando o lúmen do túbulo córneo vazio²⁸ (Figura 7, A e B).

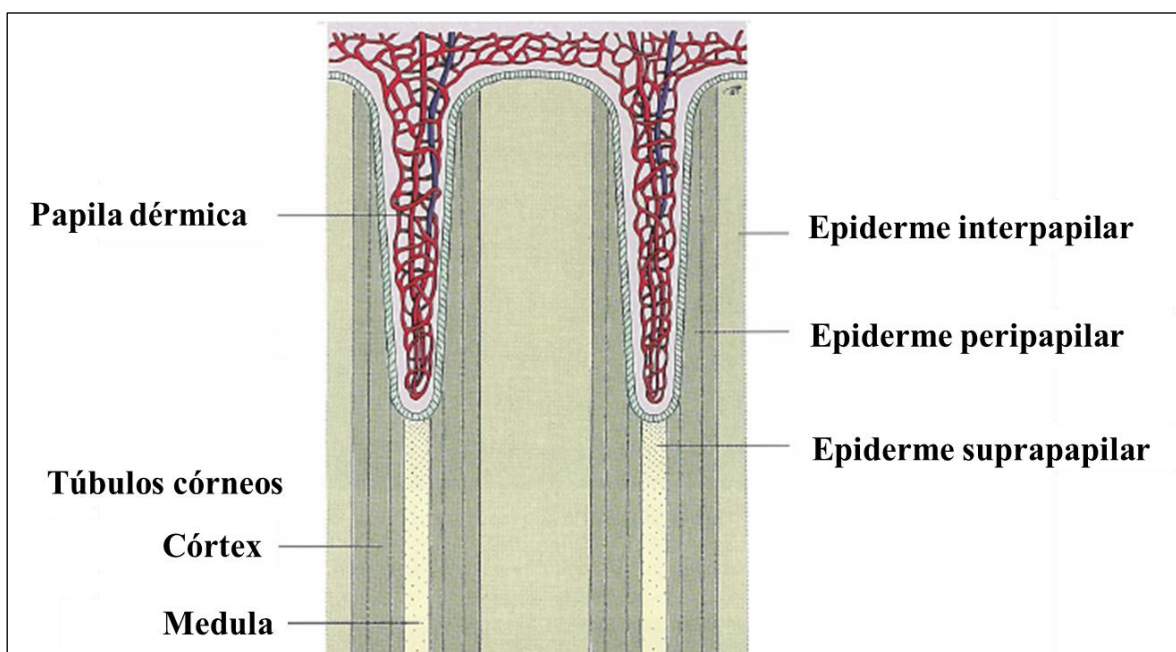


FIGURA 6 – Demonstração esquemática do desenvolvimento do tecido córneo tubular e intertubular sobre as papilas dérmicas.

Fonte: adaptado de Köning e Liebich²⁸.

No interior dos túbulos córneos, os queratinócitos estão organizados em uma espiral íngreme em torno do seu próprio eixo central. Os túbulos diferem de tamanho, número e formato nos diferentes segmentos do casco. Na muralha, existem aproximadamente 80 túbulos/mm², enquanto que na sola e no bulbo encontra-se em média 20 túbulos/mm². O tecido

córneo intertubular é formado por camadas de queratinócitos poligonais dispostos em paralelo com a superfície de apoio³⁹.

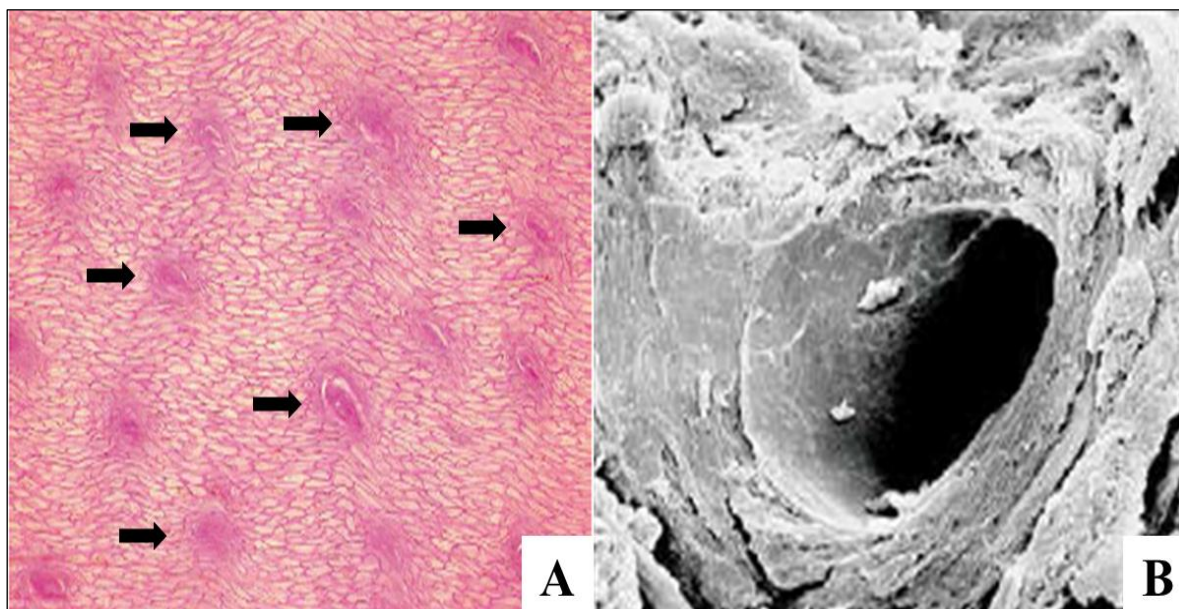


FIGURA 7 – Tecido córneo tubular e intertubular. (A) Secção transversal dos túbulos córneos do segmento coronário do casco bovino (setas). (B) Micrografia eletrônica de varredura mostrando a abertura da medula de um túbulo córneo. As papilas dérmicas encaixam-se nessas aberturas.

Fonte: adaptado de Greenough¹.

A qualidade e a resistência do tecido córneo estão diretamente relacionadas ao número de túbulos córneos e com a relação de diâmetro entre a medula e o córtex desses túbulos^{1,6}. O diâmetro dos túbulos córneos pode ser influenciado pela característica do piso em que os bovinos são manejados. Pisos duros ocasionam aumento do diâmetro da medula e consequente aumento do diâmetro dos túbulos córneos. Assim, como a camada medular é mais frágil, há diminuição da qualidade do tecido córneo, maior desgaste e vulnerabilidade à lesões^{1,41}.

2.2. Queratinização do casco bovino

A queratinização é uma forma de diferenciação celular terminal e morte celular programada, que culmina com a formação dos queratinócitos ou corneócitos⁴². O processo de diferenciação celular tem início com a migração das células situadas no estrato basal da epiderme e termina com a formação do estrato córneo. A proliferação, diferenciação e morte dos queratinócitos ocorrem de forma sequencial e cada etapa é caracterizada pela expressão de

proteínas específicas⁴³. Durante a queratinização, as células epidérmicas sofrem uma série de alterações que gradualmente conduzem à sua morte²⁸.

A membrana basal localiza-se na junção dermo-epidérmica e é formada por uma rede complexa de colágeno e glicoproteínas. Ela é fundamental para a formação do citoesqueleto dos queratinócitos. Além disso, fornece ancoragem e orientação para os queratinócitos no estrato basal, de forma que danos à membrana basal podem ocasionar alterações da arquitetura epidérmica³⁹. A proliferação celular na epiderme é ativada por estímulos mecânicos e bioquímicos, como o fator de crescimento epidérmico (FCE) e citocinas¹. Outros reguladores do processo de queratinização são o hormônio relaxina, que inibe o FCE, a prolactina e a hidro cortisona, os quais reduzem a síntese proteica no casco, principalmente durante a lactação³⁹.

O estrato basal é camada mais profunda da epiderme e nele ocorre intensa divisão mitótica, que produz os queratinócitos que formarão as camadas superiores da epiderme⁴⁴ (Figuras 8). A proliferação celular no estrato basal empurra as células das camadas superiores da epiderme, promovendo a movimentação e a contínua renovação celular²⁸. No estrato basal, inicia-se a formação do citoesqueleto de queratina, que é constituído por uma rede flexível e interligada de filamentos intermediários desta proteína⁴⁵. Estes formam os tonofilamentos que se conectam aos desmossomos, possibilitando assim, forte união entre as células epidérmicas e a ancoragem dessas à membrana basal⁴⁶.

O estrato espinhoso caracteriza-se por ser a camada mais espessa da epiderme⁵ (Figura 8). Nele, os queratinócitos apresentam formato poliédrico e, geralmente, têm núcleos centrais, com nucléolos e citoplasma, que sintetizam ativamente filamentos de queratina⁴⁴. No estrato espinhoso, inicia-se a síntese e deposição das Proteínas Associadas à Queratina (KAPs), que são um grupo diversificado de pequenas proteínas, cuja função é dar suporte estrutural aos filamentos de queratina durante a formação do citoesqueleto. As KAPs atuam aumentando a resistência do citoesqueleto de queratina, por meio da união dos componentes estruturais dos queratinócitos⁴⁵. Paralelamente a síntese de KAPs, proteínas, ácidos nucléicos e organelas, que não serão mais utilizadas são gradativamente destruídas⁴⁷.

A terceira camada da epiderme, o estrato granuloso (Figura 8), está presente apenas nas regiões de tecido córneo macio, como no bulbo e no perioplo^{1,36}. Nessa camada, o processo de queratinização encontra-se na fase final. O estrato granuloso é composto por várias camadas de queratinócitos nucleados, achatados e com grânulos de querato-hialina⁴⁶. Durante a fase final de queratinização, os grânulos de querato-hialina dissolvem-se e, em seguida, unem-se aos tonofilamentos de queratina, formando uma estrutura homogênea que preenche o citoplasma

dos queratinócitos⁵. Os filamentos de queratina formam pontes dissulfeto entre si, e dão origem a uma rede proteica que garante estabilidade física e química ao tecido córneo¹.

O estrato córneo, camada mais externa da epiderme, é constituído por várias camadas de queratinócitos anucleados e que apresentam o citoplasma repleto de agregados de filamentos de queratina⁴⁶. Assim, assumem um formato achatado, que é característico dos queratinócitos do estrato córneo⁴³ (Figura 8). A etapa final do processo de queratinização é denominada cornificação terminal. Nesta, o queratinócito apresenta-se como uma célula achatada, rígida, repleta de proteína, rodeada por um envoltório resistente e imerso em uma matriz extracelular de lipídios⁴⁵. O estrato córneo representa uma estrutura semelhante a um muro, onde os queratinócitos são os tijolos e a SCI, a argamassa que os une^{5,6}.

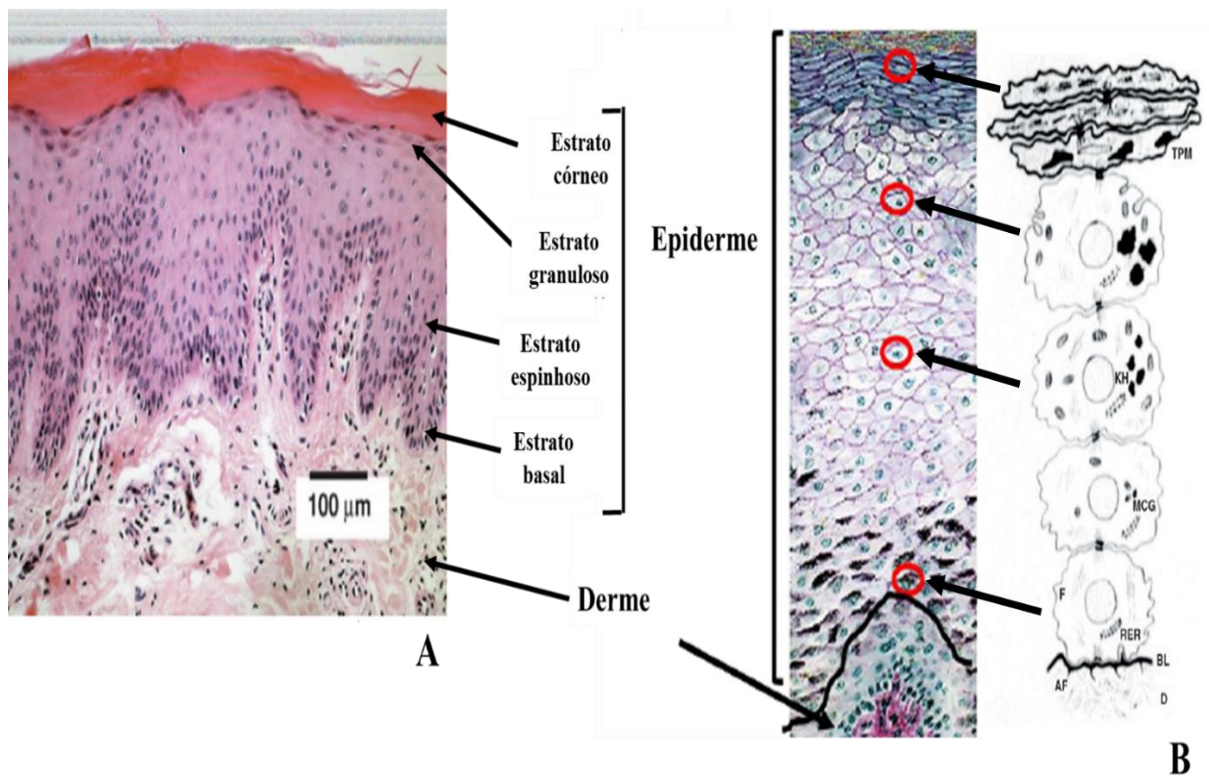


FIGURA 8 – Esquema demonstrando o processo de queratinização cutânea.
Fonte: adaptado de Tomlinson et al.⁵ e Wang et al.⁴⁸.

2.3. Nutrientes importantes para a queratinização do casco

2.3.1. Aminoácidos

Os aminoácidos alanina, glicina, metionina e cisteína são importantes constituintes do estojo córneo⁴⁹⁻⁵¹. A cisteína e a metionina são aminoácidos sulfurados, que estão presentes

em alta concentração na estrutura das queratinas, formando pontes dissulfeto, as quais apresentam importância singular para a resistência da cadeia polipeptídica dessa proteína^{7,52}.

2.3.2. Minerais

a) Cálcio

O cálcio atua em várias vias de sinalização envolvidas na diferenciação dos queratinócitos, incluindo a formação dos desmossomos. Esse mineral é responsável pela ativação das transglutaminases epidérmicas, as quais atuam na formação dos tonofilamentos de queratina, bem como na deposição do envelope celular dos queratinócitos^{6,53,54}. A hipocalcemia subclínica observada, principalmente, em vacas no início de lactação é um dos fatores que contribuem para a síntese de tecido córneo de baixa qualidade durante o pós-parto. Ainda, a baixa concentração de cálcio nos queratinócitos durante este período está relacionada à formação de sulcos semicirculares na muralha de vacas recém-paridas^{1,6}.

b) Zinco

O zinco é um micromineral essencial para a síntese de queratina e para a manutenção da integridade do estojo córneo⁵⁵. Esse nutriente é importante para a queratinização, pois participa dos processos de divisão celular e do crescimento e regeneração tecidual^{56,57}. A união do zinco com os aminoácidos cisteína e histidina, forma domínios denominados “dedos de zinco” (*fingers-Zn*), que consistem em coordenações tetraédricas envolvidas na transcrição e replicação celular⁷. Baixas concentrações de zinco no bulbo e na sola do casco de vacas foram associadas à produção de tecido córneo de baixa qualidade⁵⁸.

O zinco atua também no controle da calmodulina, proteína-cinase C e na síntese de fosfato de inositol⁵⁹. A calmodulina é uma proteína que, quando ativada, liga-se ao cálcio e o transporta para o meio intracelular. A entrada de cálcio no citosol dos queratinócitos é importante para a ativação das transglutaminases epidérmicas durante a etapa final da queratinização⁵. A proteína-cinase C é responsável pela fosforilação de proteínas, que ativam uma cascata de sinalização, dentre elas a mobilização de glicose⁷, fornecendo assim, energia disponível para o processo de diferenciação. Por fim, o fosfato de inositol promove aumento da concentração de Cálcio no citosol, por meio da mobilização das reservas desse nutriente no retículo endoplasmático⁵.

c) Cobre

O cobre é fundamental para a respiração celular, queratinização e pigmentação dos tecidos. A pigmentação dos cascos é influenciada pelo cobre, pois este é responsável pela ativação da enzima tirosinase, a qual transforma a tirosina (aminoácido não essencial) em melanina⁶⁰. Algumas enzimas dependentes de cobre aumentam a estabilidade estrutural dos filamentos de queratina que compõem o tecido córneo do casco¹. A sulfidril oxidase, uma metaloproteinase dependente de cobre, é fundamental para a oxidação do aminoácido cisteína⁶¹. A oxidação da cisteína é um processo importante para a formação das pontes dissulfeto (S-S)^{5,62}. Quando há deficiência de cobre, observa-se menor atividade da sulfidril oxidase, ocasionando excesso de radicais sulfidril (-SH), quando deveria haver um excesso de radicais dissulfeto (S-S) durante a síntese de queratina⁶⁰. Baixas concentrações de cobre no bulbo e na sola do casco de vacas, também, foram relacionadas à ocorrência de tecido córneo de baixa qualidade⁵⁸.

d) Selênio

O selênio contribui para a proteção e manutenção da SCI⁶³. Esse micronutriente atua como cofator da enzima glutathione peroxidase, que tem como principal função proteger as células da oxidação⁶⁰. Na epiderme, a glutathione peroxidase atua na proteção contra agentes oxidativos das membranas lipídicas intra e extracelulares, contribuindo para a manutenção da composição da SCI, que contém alta concentração de lipídios⁵. A suplementação excessiva de selênio pode ocasionar danos ao tecido córneo, em razão da redução das ligações químicas entre os filamentos de queratina, levando à produção de tecido córneo de baixa qualidade⁶³. Quando há excesso de selênio na alimentação, o selênio substitui o enxofre presente nos aminoácidos cisteína e metionina, ocasionando enfraquecimento das pontes dissulfeto⁶⁴.

2.3.3. Vitaminas

a) Vitamina A

A vitamina A, também conhecida como retinol, atua na regulação da diferenciação celular e está envolvida na formação dos tecidos epiteliais⁶⁵. A função da vitamina A no processo de queratinização está associado, principalmente, à sua importância na proliferação e

diferenciação celular⁵⁹. Estudos demonstraram que o ácido retinóico, um metabólito da vitamina A, está relacionado à ativação e aumento da atividade das transglutaminases, enzimas que catalisam a ligação dos filamentos de queratina com as KAP durante a formação do envoltório celular⁶⁶⁻⁶⁸.

b) Vitamina D

A vitamina D atua no controle da homeostase do cálcio, juntamente com os hormônios calcitonina e paratormônio. A principal função da vitamina D é aumentar a absorção ativa de cálcio no intestino delgado e promover maior mineralização óssea⁶⁹. Assim, a ausência de concentrações séricas ideais desse nutriente pode comprometer o metabolismo do cálcio e comprometer o processo de queratinização⁵.

c) Vitamina E

A vitamina E apresenta atividade antioxidante e, dessa forma, é fundamental para a proteção das células contra os danos ocasionados pelas espécies reativas do oxigênio (EROs)⁶⁹. As EROs ocasionam danos celulares, por meio da peroxidação dos lipídios da membrana citoplasmática, prejudicando a proliferação celular. A atividade antioxidante da vitamina E é capaz de remover as EROs, estimulando assim, o crescimento e proliferação celular⁷⁰. Logo, a vitamina E é importante para a manutenção do processo de proliferação e diferenciação dos queratinócitos, bem como para a manutenção da integridade da SCI, que possui alta concentração de lipídios⁶.

d) Biotina

A biotina está envolvida na síntese de ácidos graxos de cadeia longa e na gliconeogênese, atuando no transporte do dióxido de carbono de reações enzimáticas⁷¹. Essa vitamina é um cofator importante no desenvolvimento de tecidos cornificados, pois está envolvida na diferenciação dos queratinócitos, formação dos pontos dissulfeto e na produção da SCI⁶. A deficiência de biotina ocasiona comprometimento quantitativo e qualitativo na produção de queratina e, também, síntese de SCI de baixa qualidade⁶.

Em dois estudos com vacas leiteiras, observou-se que a suplementação de 20 mg/dia de biotina durante cinco e dez meses, respectivamente, promoveu aumento na quantidade de

lipídios do casco^{72,73}. Acredita-se que esse resultado esteja relacionado ao efeito positivo da biotina sobre a lipogênese, pois esta atua como coenzima da acetil-CoA carboxilase, primeira enzima do processo de biossíntese dos ácidos graxos⁷. Vários trabalhos demonstraram que a suplementação com biotina em bovinos, tanto de aptidão leiteira quanto de produção de carne, promoveu melhora na qualidade do casco e redução das afecções podais^{8,10,11}.

2.4. Funções metabólicas da biotina

A biotina é uma vitamina do complexo B, também conhecida como vitamina H ou B7, que é de grande importância para a lipogênese, a gliconeogênese e para o catabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada. A principal função metabólica dessa vitamina é o transporte e fixação de moléculas de dióxido de carbono (CO₂)⁷¹. A biotina atua como cofator nas reações de transporte e fixação de dióxido de carbono realizadas pelas enzimas piruvato-carboxilase (PC), propionil-CoA carboxilase (PCC), acetil-CoA carboxilase (ACC) e β-metilcrotonil-CoA (MCC)^{7,27}. A PC catalisa a primeira reação da via da gliconeogênese, que consiste na conversão do piruvato em oxaloacetato^{52,74}. Além disso, o oxaloacetato sintetizado pela PC pode ser utilizado também como um intermediário do ciclo do ácido cítrico (Ciclo de Krebs)⁷.

A PCC é uma enzima importante para o metabolismo do propionato, pois realiza a carboxilação do propionil-CoA em (D)-metilmalonil-CoA, que é posteriormente transformado em succinil-CoA para adentrar o ciclo do ácido cítrico (Ciclo de Krebs)⁵². Essa reação apresenta uma importância ainda maior para os ruminantes, pois nestes animais o propionato é o principal precursor de glicose e, portanto, importante fonte de energia⁷⁵. A ACC é a enzima responsável pela conversão do acetil-CoA em malonil-CoA, primeira reação para a biossíntese de ácidos graxos de cadeia longa⁷. Por fim, a biotina também é cofator da MCC, a qual realiza a conversão do β-metilcrotonil-CoA em β-metilglutaconil-CoA, reação que ocorre durante o catabolismo do aminoácido leucina²⁷.

2.5. Influência da suplementação com biotina na qualidade do casco bovino

A biotina é um micronutriente importante para a queratinização. A indução de deficiência dessa vitamina em bezerros promoveu alterações quantitativas e qualitativas na estrutura do estojo córneo, como síntese de queratina e de SCI de baixa qualidade⁶. O tratamento de queratinócitos cultivados *in vitro* promoveu maior produção de citoqueratinas em

relação aos queratinócitos não tratados. Porém, não houve diferença quanto a taxa de proliferação dos queratinócitos⁷⁶.

Vacas leiteiras suplementadas com 20 mg/dia de biotina durante 10 meses, apresentaram sola mais resistente e com menor teor de umidade. Observou-se, também, que os bovinos que receberam biotina apresentaram maior concentração de lipídios na sola. Resultados que indicam que a suplementação dessa vitamina promove alterações nas características físicas e químicas da sola⁷³. Em outro estudo observou-se aumento da concentração de lipídios na sola de vacas suplementadas com biotina durante 5 meses. Associado a isso, ocorreu, nos animais suplementados, redução significativa de erosão de talão, avulsão de sola, fissuras da linha branca e sola dupla⁷².

A suplementação diária com 20 mg de biotina para vacas leiteiras durante 13 meses ocasionou melhora do escore de locomoção e redução do uso de antibióticos⁸. Em outros dois estudos, observou-se redução da incidência de doença da linha branca em vacas suplementadas com biotina^{9,11}. O fornecimento diário de 20 mg de biotina durante 14 meses para vacas em lactação promoveu redução da incidência de hemorragia de sola, no entanto não houve diferença quanto a incidência de erosão de talão, sola dupla e fissuras na muralha¹⁰. Em outra pesquisa, vacas de corte apresentaram redução da incidência de fissuras verticais na muralha do casco, após 24 meses de fornecimento de 10 mg/dia de biotina⁷⁷. Além disso, um estudo demonstrou que a suplementação de vacas com 40 mg/dia de biotina durante 50 dias ocasionou aumento da qualidade do tecido córneo cicatricial de úlceras de sola⁷⁸.

2.5.1. Efeito da suplementação com biotina no crescimento e desgaste do casco

A suplementação com 20 mg/dia de biotina a novilhos da raça Girolando manejados extensivamente resultou em aumento do ângulo e comprimento da muralha dorsal do casco, aumento do comprimento da sola e menor desgaste do casco. Entretanto, nesse estudo, o suplemento fornecido continha também outros nutrientes importantes para o estojo córneo, como metionina, lisina e zinco, os quais podem ter contribuído para os resultados observados¹⁹.

Em outro estudo, forneceu-se 22 mg/dia de biotina para vacas leiteiras (Holandês-Friesian), iniciando a suplementação 25 dias antes da data prevista de parto e mantendo-a até 160 pós-parto. Observou-se que não houve diferença significativa quanto ao crescimento, desgaste e crescimento líquido da muralha do casco²¹. A suplementação com biotina na dose de 20 mg/dia para vacas em lactação durante sete meses, também, não promoveu efeito quanto ao crescimento e desgaste da muralha do casco¹⁰. Semelhantemente, o fornecimento de 20

mg/dia dessa vitamina durante 120 dias não ocasionou diferença significativa quanto a relação crescimento e desgaste da muralha dorsal do casco em novilhos confinados⁷⁹.

Novilhos cruzados (Wagyu x Black Angus) mantidos em regime de confinamento durante 430 dias e suplementados com 10 mg/dia de biotina apresentaram redução do crescimento e do desgaste da muralha do casco, associado a um maior crescimento líquido dessa estrutura. No entanto, a dosagem de 20 mg/dia dessa vitamina demonstrou efeito negativo sobre a integridade do casco, o que sugere que a necessidade de biotina para novilhos confinados pode ser inferior a de bovinos adultos⁸⁰.

2.6. Efeito da suplementação com biotina em parâmetros bioquímicos de bovinos

Vacas leiteiras suplementadas com 0, 10 ou 20 mg/dia de biotina por 14 dias pré-parto e 100 dias pós-parto, não apresentaram diferença significativa quanto a concentração plasmática de glicose, insulina ou ácidos graxos não esterificados (AGNE)²⁵. Ganjkanlou et al.⁸¹ suplementaram biotina para vacas em lactação nas mesmas dosagens citadas anteriormente e, também, não houve nenhum efeito sobre as concentrações plasmáticas de glicose e insulina. De forma semelhante, a suplementação dessa substância para vacas em lactação durante 70 dias, nas doses de 0, 20 ou 40 mg/dia, não influenciou as concentrações plasmática de glicose, triglicerídios e AGNE²⁶. Majee et al.⁸² forneceram 20 mg/dia de biotina para vacas de alta produção leiteira (acima de 40 kg/dia) durante 28 dias. Estes autores também não encontram alterações significativas nas concentrações plasmáticas de glicose, AGNE e beta-hidroxibutirato.

Ronsendo et al.²² observaram que vacas que receberam 20 mg/dia de biotina por 16 dias pré-parto e, em seguida, 30 mg/dia durante 70 dias pós-parto, apresentaram aumento da concentração plasmática de glicose. Estes autores atribuíram esse resultado ao aumento da gliconeogênese e ao aumento da produção de proprionato no rúmen dos animais que receberam biotina. Nessa mesma pesquisa, as vacas que receberam biotina apresentaram menor concentração plasmática de AGNE, em relação a vacas que não receberam. Possivelmente, a redução na concentração dos AGNE ocorreu em razão da redução da lipólise, diante da maior concentração plasmática de glicose.

REFERÊNCIAS

1. Greenough P. Bovine laminitis and lameness: a hands on approach. St. Louis: Saunders Elsevier; 2007. 311 p.
2. Whay HR, Waterman AE, Webster AJ, O'Brien JK. The influence of lesion type on the duration of hyperalgesia associated with hindlimb lameness in dairy cattle. *Vet J*. 1998;156(1):23-9.
3. Mulling CK. Three-dimensional appearance of bovine epidermal keratinocytes in different stages of differentiation revealed by cell maceration and scanning electron microscopic investigation. *Folia Morphol (Warsz)*. 2000;59(4):239-46.
4. Eurell J, Frappier B. Dellmann's textbook of veterinary histology. 6th ed. Iowa: Blackwell Publishing; 2006. 405 p.
5. Tomlinson DJ, Mülling CH, Fakler TM. Invited review: formation of keratins in the bovine claw: Roles of hormones, minerals, and vitamins in functional claw integrity. *J Dairy Sci*. 2004;87(4):797-809.
6. Mulling CK, Bragulla HH, Reese S, Budras KD, Steinberg W. How structures in bovine hoof epidermis are influenced by nutritional factors. *Anat Histol Embryol*. 1999;28(2):103-8.
7. Voet D, Voet JG. Biochemistry. 4th ed. New York: John Wiley & Sons; 2011. 1428 p.
8. Fitzgerald T, Norton BW, Elliott R, Podlich H, Svendsen OL. The influence of long-term supplementation with biotin on the prevention of lameness in pasture fed dairy cows. *J Dairy Sci*. 2000;83(2):338-44.
9. Hedges J, Blowey RW, Packington AJ, O'Callaghan CJ, Green LE. A longitudinal field trial of the effect of biotin on lameness in dairy cows. *J Dairy Sci*. 2001;84(9):1969-75.
10. Bergsten C, Greenough PR, Gay JM, Seymour WM, Gay CC. Effects of biotin supplementation on performance and claw lesions on a commercial dairy farm. *J Dairy Sci*. 2003;86(12):3953-62.
11. Potzsch CJ, Hedges VJ, Blowey RW, Packington AJ, Green LE. The impact of parity and duration of biotin supplementation on white line disease lameness in dairy cattle. *J Dairy Sci*. 2003;86(8):2577-82.
12. Bampidis VA, Lymberopoulos AG, Christodoulou V, Belibasaki S. Impacts of supplemental dietary biotin on lameness in sheep. *Anim Feed Sci Technol*. 2007;134(1-2):162-9.
13. Josseck H, Zenker W, Geyer H. Hoof horn abnormalities in Lipizzaner horses and the effect of dietary biotin on macroscopic aspects of hoof horn quality. *Equine Vet J*. 1995;27(3):175-82.

14. Zenker W, Josseck H, Geyer H. Histological and physical assessment of poor hoof horn quality in Lipizzaner horses and a therapeutic trial with biotin and a placebo. *Equine Vet J.* 1995;27(3):183-91.
15. Buffa EA, Van Den Berg SS, Verstraete FJ, Swart NG. Effect of dietary biotin supplement on equine hoof horn growth rate and hardness. *Equine Vet J.* 1992;24(6):472-4.
16. Bryant KL, Kornegay ET, Knight JW, K.E. WJ, Not DR. Supplemental biotin for swine. I. Influence on feedlot performance, plasma biotin and toe lesions in developing gilts. *J Anim Sci.* 1985;60(1):136-44.
17. Vermunt JJ, Greenough PR. Structural characteristics of the bovine claw: horn growth and wear, horn hardness and claw conformation. *Br Vet J.* 1995;151(2):157-80.
18. Livesey CT, Laven RA. The effect of housing and methionine intake on hoof horn hemorrhages in primiparous lactating Holandês cows. *Vet Rec.* 2007;87(4):1015-23.
19. Silva LAF, Franco LG, Atayde IB, da Cunha PHJ, de Moura MI, Goulart DS. Effect of biotin supplementation on claw horn growth in young, clinically healthy cattle. *Can Vet J.* 512010. p. 607-10.
20. Reilly JD, Cottrell DF, Martin RJ, Cuddeford DJ. Effect of supplementary dietary biotin on hoof growth and hoof growth rate in ponies: a controlled trial. *Equine Vet J Suppl.* 1998(26):51-7.
21. Winkler B. Mechanical properties of hoof horn, sole haemorrhage and lameness in dairy cattle. [Tese]. Plymouth, Inglaterra: University of Plymouth, Faculty of Science; 2005.
22. Rosendo O, Staples CR, McDowell LR, McMahon R, Badinga L, Martin FG, Shearer JF, Seymour WM, Wilkinson NS. Effects of biotin supplementation on peripartum performance and metabolites of Holandês cows. *J Dairy Sci.* 2004;87(8):2535-45.
23. Marshall MW, Ziyad J, Matusik E. Effects on biotin, fat type and sodium nitrite on organ size, plasma constituents and liver fatty acid composition in rats. *Nutr Res.* 1985;5(8):863-78.
24. Kempton TJ, Balnave D, Leng RA. The effects of biotin administration on glucose synthesis rates in starved pregnant sheep. *Aust Vet J.* 1978;54(6):319-20.
25. Zimmerly CA, Weiss WP. Effects of supplemental dietary biotin on performance of Holandês cows during early lactation. *J Dairy Sci.* 2001;84(2):498-506.
26. Chen B, Wang C, Liu J. Effects of dietary biotin supplementation on performance and hoof quality of Chinese Holandês dairy cows. *Livest Sci.* 2012;148(1-2):168-73.
27. Mock D. Biotin. In: Zempleni J, Rucker RB, McCormick DB, Suttie JW, editors. *Handbook of vitamins.* 4th ed. Boca Raton, USA: CRC Press; 2007. p.361-84.
28. Köning HE, Liebich HG. *Veterinary anatomy of domestic mammals.* Stuttgart: Schattauer GmbH; 2004. 681 p.

29. Zhang D, Arola D, Reprogel R, Zheng W, Tasch U, Dyer R. A method for characterizing the mechanical behaviour of hoof horn. *J Mater Sci.* 2007;42(4):1108-15.
30. Shearer J, Van Amstel S, Gonzalez A. *Manual of foot care in cattle.* Fort Atkinson: Hoards & Sons Company; 2005. 71 p.
31. Mulling C, Budras KD. The hoof. In: Budras KD, Habel RE, editors. *Bovine anatomy.* Hannover: Schlutersche GmbH; 2011. p. 26-7.
32. Ashdown RR, Done SH, Baines EA. *Color atlas of veterinary anatomy: the ruminants.* 2nd ed. St Louis: Mosby Elsevier; 2010. 260 p.
33. Greenough PR. Physical examination of a lame cow (Lameness in cattle). *Merck and the Merck Veterinary Manual*; 2016. Apresenta textos sobre clínica veterinária de pequenos e grandes animais. [acesso 4 fev 2017]. Disponível em: <http://www.merckvetmanual.com/musculoskeletal-system/lameness-in-cattle/physical-examination-of-a-lame-cow>.
34. Sisson S. Tegumento comum. In: Getty R, editor. *Sisson & Grossman: anatomia dos animais domésticos.* 5a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1986. p. 681-8.
35. Schaller O, Constantinescu GM, Habel RE, Sack WO, Semoens O, Vos NR. *Nomenclatura anatômica veterinária ilustrada.* São Paulo: Manole; 1999. 613 p.
36. Eurides D, Borges NC, Ferreira DR, Souza LA, Bertão ACS. Aspectos estruturais do dígito bovino. In: Silva LAF, Eurides D, Noronha Filho ADF, editores. *Complexo acidose ruminal e laminite.* Goiânia: Kelps; 2012. p. 65-74.
37. Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG. *Tratado de anatomia veterinária.* 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. 663 p.
38. Banks W. *Histologia veterinária aplicada.* 2a ed. São Paulo: Manole; 1991. 629 p.
39. Van Amstel S, Shearer J. *Manual for treatment and control of lameness in cattle.* Ames: Wiley-Blackwell; 2006. 212 p.
40. Räber M, Lischer CJ, Geyer H, Ossent P. The bovine digital cushion: a descriptive anatomical study. *Vet J.* 2004;167(3):258-64.
41. Lendner G, Mülling C, Nebel U, Bergsten C, Magnusson C. Effect of flooring systems on microarchitecture of the bovine hoof horn. *Anat Histol Embryol.* 2005;34:29-30.
42. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nunez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon HU, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 2012;19(1):107-20.
43. Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(4):328-40.

44. Mescher A. Junqueira's basic histology: text and atlas. 13th ed. New York: McGraw-Hill Education; 2013. 480 p.
45. Hood DM. Cornification of the hoof capsule. *J Equine Vet Sci.* 2013;33(10):856-7.
46. Kierszenbaum AL. *Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia.* 2a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. 677 p.
47. Reichert U, Michel S, Schmidt R. The cornified envelope: a key structure of terminally differentiating keratinocytes. In: Darmon M, Blumenberg M, editors. *Molecular biology of the skin: the keratinocyte.* San Diego: Academic Press; 1993. p. 107-40.
48. Wang B, Yang W, McKittrick J, Meyers MA. Keratin: structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. *Prog. Mater. Sci.* 2016;76:290-318
49. Ekfalck A, Funkquist B, Jones B, Obel N. Incorporation of 35S-Cystine in Tissue Fragments from the Matrix of the Bovine Claw and Effect on Incorporation Rate of Adding Blood Serum and Some Serum Fractions. *Zentralbl. Veterinärmed. B.* 1985;32(1-10):785-92.
50. Ekfalck A. Amino acids in different layers of the matrix of the normal equine hoof. Possible importance of the amino acid pattern for research on laminitis. *Zentralbl Veterinärmed B.* 1990;37(1):1-8.
51. Clark AK, Rakes AH. Effect of methionine hydroxy analog supplementation on dairy cattle hoof growth and composition. *J Dairy Sci.* 1982;65(8):1493-502.
52. Nelson D, Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry.* 5th ed. New York: Freeman and Company; 2008. 1294 p.
53. Eckert RL, Sturniolo MT, Broome A-M, Ruse M, Rorke EA. Transglutaminase function in epidermis. *J Invest Dermatol.* 2005;124(3):481-92.
54. Rice RH, Green H. Presence in human epidermal cells of a soluble protein precursor of the cross-linked envelope: activation of the cross-linking by calcium ions. *Cell.* 1979;18(3):681-94.
55. Nicoletti JLM. *Manual de podologia bovina.* Barueri: Manole; 2004. 126 p.
56. Hostynek JJ, Hinz RS, Lorence CR, Price M, Guy RH. Metals and the skin. *Crit Rev Toxicol.* 1993;23(2):171-235.
57. Lansdown AB. Physiological and toxicological changes in the skin resulting from the action and interaction of metal ions. *Crit Rev Toxicol.* 1995;25(5):397-462.
58. Baggott DG, Bunch KJ, Gill KR. Variations in some inorganic components and physical properties of claw keratin associated with claw disease in the British Friesian cow. *Br Vet J.* 1988;144(6):534-42.
59. National Research Council. *Nutrient requirements of dairy cattle.* 7th ed. rev. Washington DC: National Academy of Sciences; 2001. 381 p.

60. Carvalho FAN, Barbosa FA, McDowell LR. Nutrição de bovinos a pasto. Belo Horizonte: Papelform; 2003. 438 p.
61. Winterbourn CC, Peskin AV, Parsons-Mair HN. Thiol oxidase activity of copper, zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 2002;277(3):1906-11.
62. Hashimoto Y, Suga Y, Matsuba S, Mizoguchi M, Takamori K, Seitz J, Ogawa H. Inquiry into the role of skin sulfhydryl oxidase in epidermal disulfide bond formation: implications of the localization and regulation of skin SOx as revealed by TPA, retinoic acid, and UVB radiation. *J. Invest. Dermatol.* 2001;117(3):752-54.
63. Mulling CKW. Nutritional influences on horn quality and hoof health. *Adv. Dairy Tech* [on line]. 2009; 21:283-91. [acesso em 4 fev 2017]. Disponível em: <http://www.wcds.ca/proc/2009/Manuscripts/NutritionalInfluences.pdf>
64. O'Toole D, Raisbeck MF. Pathology of experimentally induced chronic selenosis (alkali disease) in yearling cattle. *J Vet Diagn Invest.* 1995;7(3):364-73.
65. McDonald P ER, Greenhalgh JFD, Morgan CA, Sinclair LA, Wilkinson RG. *Animal Nutrition*. 7th ed. New York, USA: Pearson; 2010. p. 692.
66. Griffiths CE, Rosenthal DS, Reddy AP, Elder JT, Astrom A, Leach K, Wang TS, Finkel LJ, Yuspa SH, Voorhees JJ, et al. Short-term retinoic acid treatment increases in vivo, but decreases in vitro, epidermal transglutaminase-K enzyme activity and immunoreactivity. *J. Invest. Dermatol.* 1992;99(3):283-8.
67. Yan ZH, Noonan S, Nagy L, Davies PJ, Stein JP. Retinoic acid induction of the tissue transglutaminase promoter is mediated by a novel response element. *Mol Cell Endocrinol.* 1996;120(2):203-12.
68. Michel S, Reichert U, Isnard JL, Shroot B, Schmidt R. Retinoic acid controls expression of epidermal transglutaminase at the pre-translational level. *FEBS Lett.* 1989;258(1):35-8.
69. Zempleni J, Rucker RB, McCormick DB, Suttie JW. *Handbook of vitamins*. 4th ed. Boca Raton: CRC Press; 2007. 593 p.
70. Meydani M. Vitamin E. *Lancet.* 1995;345(8943):170-5.
71. McMahon RJ. Biotin in metabolism and molecular biology. *Annu. Rev. Nutr.* 2002;22:221-39.
72. Randhawa SS, Dua K, Randhawa CS, Munshi SK. Effect of biotin supplementation on hoof health and ceramide composition in dairy cattle. *Vet Res Commun.* 2008;32(8):599-608.
73. Higuchi H, Maeda T, Nakamura M, Kuwano A, Kawai K, Kasamatsu M, Nagahata H. Effects of biotin supplementation on serum biotin levels and physical properties of samples of solar horn of Holandês cows. *Can J Vet Res.* 2004;68(2):93-97.
74. Jitrapakdee S, Wallace JC. Structure, function and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem J.* 1999;340(1):1-16.

75. Murray RK BD, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. Harper's illustrated biochemistry. 29th ed. São Francisco: McGraw-Hill Medical; 2012. 693 p.
76. Higuchi H, Kasamatu M, Nagahata H. Primary culture of bovine hoof keratinocytes: effect of biotin treatment on cell growth and cytokeratin synthesis. 12th International Symposium on Lameness in Ruminants; 2002; Orlando, FL, USA. Orlando: Proceedings of the 12th International Symposium on Lameness in Ruminants; 2002. 220-222.
77. Campbell JR, Greenough PR, Petrie L. The effects of dietary biotin supplementation on vertical fissures of the claw wall in beef cattle. Can Vet J. 2000;41(9):690-4.
78. Lischer Ch J, Koller U, Geyer H, Mulling C, Schulze J, Ossent P. Effect of therapeutic dietary biotin on the healing of uncomplicated sole ulcers in dairy cattle: a double blinded controlled study. Vet J. 2002;163(1):51-60.
79. Campos SBS, Freitas SLR, Abreu MP, Dambros CE, Helou JB, Silva LAF. Ganho em peso e avaliação do crescimento e desgaste do casco de bovinos jovens mestiços (*Bos indicus* x *Bos taurus*) suplementados com biotina. IX Congresso Brasileiro de Buiatria; 2011; Goiânia, Brasil. Botucatu: Vet. Zootec. 2011;18(4):1257-61.
80. Lawrence R, Elliott R, Norton B, Thoenner M, Loxton I, Hueffner M. Influence of biotin supplementation on hoof chemical composition and rates of wear and growth in long fed F1 Wagyu/Black Angus steers. 13th International Symposium and 5th Conference on Lameness in Ruminants; 2004; Maribor, Slovenija: Proceedings of the 13th International Symposium and 5th Conference on Lameness in Ruminants; 2004.
81. Ganjkhanlou M, Salimi M, Nikkhah A, Zali A. Effects of supplemental dietary biotin performance of Holandês dairy cows. Pak J Biol Sci. 2007;10(17):2960-63.
82. Majee DN, Schwab EC, Bertics SJ, Seymour WM, Shaver RD. Lactation performance by dairy cows fed supplemental biotin and a B-vitamin blend. J Dairy Sci. 2003;86(6):2106-12.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Colaborar com informações adicionais que auxiliem no esclarecimento de várias questões sobre o efeito da biotina no crescimento e desgaste do casco de bezerras mestiças (Jersey x Holandês). Além disso, objetivou-se também avaliar a influência da suplementação com essa vitamina sobre a concentração plasmática de glicose, lactato e frutossamina e sobre o lipidograma desses animais.

3.2. Objetivos específicos

Realizar uma revisão de literatura sobre a anatomia do estojo córneo bovino, as fases do processo de queratinização, discorrer sobre as principais funções metabólicas da biotina e abordar sobre os principais efeitos da suplementação de bovinos com essa vitamina.

Avaliar o efeito da suplementação com biotina sobre o crescimento e o desgaste da muralha dorsal do casco, do talão e sobre o ganho em peso de bezerras mestiças (Jersey x Holandês) manejadas em baias com piso de concreto.

Determinar o efeito da suplementação com biotina no lipidograma, na frutossamina sérica e na concentração plasmática de glicose e lactato em bezerras mestiças (Jersey x Holandês) desmamadas e confinadas.

CAPÍTULO 3

Crescimento do casco e ganho de peso de bezerras mestiças (Jersey x Holandês) suplementadas com biotina

Paulo José Bastos Queiroz¹, Bruno Moraes de Assis², Danilo Conrado Silva², Saulo Humberto de Ávila Filho¹, Rogério Elias Rabelo², Luiz Antônio Franco da Silva¹

¹ Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil

² Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí, Jataí, Goiás Brasil

Autor para correspondência: paulojose.vet@hotmail.com, +55 (62) 3521-1572, ORCID: 0000-0002-4453-7016

Resumo

Com o presente trabalho objetivou-se avaliar o efeito da suplementação com biotina sobre o crescimento e o desgaste da muralha dorsal do casco, do bulbo do talão e sobre o ganho de peso diário de bezerras mestiças (Jersey x Holandês). Foram utilizadas 12 bezerras, mestiças (Jersey x Holandês), saudáveis, com idade de seis meses e peso médio de $124,08 \pm 16,57$. As bezerras foram divididas em tratamento controle e tratamento biotina, contendo seis animais em cada tratamento. Os animais do tratamento biotina foram suplementados com uma dose diária de 20 mg de biotina durante 120 dias, enquanto os animais do tratamento controle não foram suplementados. O desgaste total da muralha dorsal no membro torácico do tratamento biotina foi menor ($p < 0,05$) do que o observado no tratamento controle para os 120 dias de avaliação. Isso contribuiu para que o crescimento líquido total da muralha dorsal do membro torácico fosse maior ($p < 0,05$) no tratamento biotina. No membro pélvico, não houve diferenças entre os tratamentos. As taxas mensais de crescimento, desgaste e crescimento líquido da muralha dorsal do casco não apresentaram diferença entre os tratamentos, tanto no membro torácico, quanto no membro pélvico. A taxa de crescimento do talão e o ganho de peso diário também não apresentaram diferença entre os tratamentos. Os resultados do presente estudo indicam que a suplementação com biotina promoveu redução da taxa de desgaste e, consequentemente, aumento do crescimento líquido da muralha dorsal do casco de bezerras.

Palavras-chave: bovino, claudicação, estojo córneo, suplementação, vitamina

Introdução

As afecções digitais dos bovinos são uma das principais causas de redução do bem-estar e produtividade, sobretudo em vacas de aptidão leiteira (Huxley, 2013). Dentre os principais fatores predisponentes ao desenvolvimento das doenças digitais estão a contínua abrasão dos cascos promovida pelo piso de concreto e a presença de matéria orgânica no ambiente (Haskell *et al.*, 2006; Cook and Nordlund, 2009). Sabe-se que a nutrição adequada é fundamental para a formação do estojo córneo saudável e resistente, capaz de suportar os desafios ambientais (Al-Qudah and Ismail, 2012). Dessa forma, o fornecimento de aminoácidos, minerais e vitaminas importantes no processo de queratinização é uma ferramenta para a prevenção das doenças do casco (Tomlinson *et al.*, 2004; Greenough, 2007).

Dentre os nutrientes que contribuem para a qualidade do estojo córneo, a biotina é citada como a vitamina de maior importância para a queratinização (Tomlinson *et al.*, 2004). Essa vitamina participa como coenzima de vários processos metabólicos, dentre eles a gliconeogênese, o metabolismo do propionato, a síntese de ácidos graxos e a degradação de aminoácidos (Lombard and Moreira, 2011). Ela também é necessária para a síntese de queratina e para a produção da substância cementante intercelular, matriz orgânica que une os queratinócitos, formando uma barreira semipermeável no estrato córneo (Mülling *et al.*, 1999; Tomlinson *et al.*, 2004). Embora a deficiência dessa vitamina em ruminantes seja rara, está demonstrado que a suplementação de bovinos com biotina promove efeitos benéficos na qualidade dos cascos (Hedges *et al.*, 2001; Bergsten *et al.*, 2003; Potzsch *et al.*, 2003). Igualmente, a suplementação prolongada com biotina também promove melhora da qualidade do casco de equinos (Zenker *et al.*, 1995), ovinos (Bampidis *et al.*, 2007) e suínos (Bryant *et al.*, 1985).

O crescimento e o desgaste do casco podem ser influenciados por vários fatores, tais como idade, raça, estação do ano, nutrição e ambiente (Vermunt and Greenough, 1995). Anormalidades na taxa de crescimento e desgaste do casco estão, geralmente, associadas ao surgimento de doenças digitais. Em excesso, tanto o crescimento quanto o desgaste do casco são apontados como fatores promotores ou predisponentes ao desenvolvimento de lesões (Livesey and Laven, 2007). Silva *et al.* (2010) observaram maior crescimento do casco de bezerros mestiços (Gir X Holandês) criados a pasto e suplementados diariamente com uma associação de biotina, metionina, lisina e zinco. Entretanto, há poucas informações disponíveis sobre o efeito da suplementação com biotina na relação crescimento e desgaste do casco de bovinos manejados em pisos abrasivos (Bergsten *et al.*, 2003; Winkler, 2005). Além disso, não

se sabe o efeito dessa vitamina no ganho de peso de bezerras desmamadas. Como ainda existem inúmeros questionamentos sobre os benefícios proporcionados pela biotina na qualidade do casco e, tendo-se em vista a crescente utilização de cruzamentos entre as raças leiteiras Jersey e Holandês a fim de obter-se maior teor de sólidos no leite e melhores índices reprodutivos (Freyer et al., 2008), torna-se importante pesquisar o efeito da suplementação com biotina nesses animais.

Com o presente trabalho objetivou-se avaliar o efeito da suplementação com biotina sobre o crescimento e o desgaste da muralha dorsal do casco, do talão e sobre o ganho de peso diário de bezerras mestiças (Jersey x Holandês) manejadas em baias com piso de concreto.

Materiais e métodos

O estudo foi desenvolvido no Galpão Experimental de Grandes Animais da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás (UFG), localizado no município de Goiânia, estado de Goiás, Brasil, sob as coordenadas 16°40'43'' latitude e 49°15'14'' longitude. O experimento ocorreu entre os meses de outubro de 2015 e março de 2016. Todos os procedimentos envolvendo os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Goiás (CEUA/UFG), processo número 089/2015. Foram utilizadas 12 bezerras, mestiças (Jersey x Holandês), saudáveis, desmamadas, com idade inicial de seis meses e peso médio de $124,08 \pm 16,57$, provenientes do Setor de Bovinocultura Leiteira da EVZ/UFG. Antes do início do período experimental, os animais foram adaptados às condições experimentais por um período de 15 dias, a fim de se evitar que o estresse ocasionado pela mudança de ambiente alterasse o consumo e o desempenho. Nesse período foram vermifugados e vacinados contra clostridioses.

Durante o período experimental, as bezerras foram alojadas em um galpão coberto e distribuídas em seis baias, contendo duas bezerras em cada baia. O piso era de concreto, mas foi coberto por uma camada de cerca de 10 cm de “cama” de maravalha. Os animais tiveram acesso contínuo a água e a um cocho contendo sal mineral (Gado Gordo 80 Cria[®], Gado Gordo Nutrição Animal, Comércio e Indústria Ltda, Itapuranga, GO, Brasil). A dieta foi composta por silagem de milho e concentrado farelado (Ração Gado Gordo Bezerro II[®], Gado Gordo Nutrição Animal, Comércio e Indústria Ltda, Itapuranga, GO, Brasil), a base de farelo de soja e milho integral moído. A silagem de milho apresentava a seguinte composição bromatológica: proteína bruta 7,61%, fibra detergente neutro 56,77%, fibra detergente ácido 38,64%, matéria mineral 4,68% e extrato etéreo 2,05%. A dieta foi calculada de acordo com as recomendações

nutricionais do NRC (2001). Os animais foram pesados mensalmente e a quantidade de concentrado ajustada caso ocorresse aumento ou redução de peso. A alimentação foi fornecida duas vezes ao dia, às oito e 16 horas, em um cocho de alvenaria.

O experimento seguiu um delineamento em blocos casualizados em parcelas subdivididas no tempo. Os animais foram blocados com base no peso inicial e distribuídos aleatoriamente em seis baias, formando assim um total de seis blocos de dois bovinos cada. Os animais foram submetidos a dois tratamentos: tratamento controle (sem adição de biotina) e tratamento biotina, que consistiu na suplementação individual e diária com 20 mg de biotina fornecida em papelotes, por via oral, durante 120 dias. Em cada baia, uma bezerra foi submetida ao tratamento controle e a outra ao tratamento com biotina. A dose diária de biotina foi pesada em balança de precisão, a fim de assegurar a correta padronização da dose fornecida.

No início do período de adaptação, todas as bezerras foram submetidas ao casqueamento preventivo, realizado com lixadeira elétrica adaptada para esse serviço. O ajuste nas medidas do casco teve a finalidade de assegurar o apoio adequado das estruturas sobre o solo, evitando-se desgastes e crescimentos compensatórios. As taxas de crescimento, desgaste e crescimento líquido da muralha dorsal do casco foram avaliadas conforme técnica descrita por Livesey and Rave (2007). Realizou-se uma marcação com lixadeira elétrica na muralha dorsal do casco, 0,5 cm abaixo da banda coronária dos dígitos laterais dos membros torácico e pélvico direito. Logo em seguida, as distâncias entre a banda coronária e a marcação e entre a marcação e o limite inferior da muralha dorsal foram mensuradas, correspondendo ao dia 0 (T0). As demais avaliações foram realizadas a cada 30 dias, correspondendo aos seguintes momentos: dia 30 (T1), dia 60 (T2), dia 90 (T3) e dia 120 (T4).

A taxa de crescimento mensal correspondeu à variação da distância entre a banda coronária e a marcação realizada, avaliada a cada 30 dias. A taxa mensal de desgaste foi obtida pela variação da distância entre a marcação e o limite inferior da muralha dorsal, mensurada a cada 30 dias (Figura 1 a e b). A taxa de crescimento líquido foi calculada pela diferença entre a taxa crescimento e a taxa de desgaste. A taxa de crescimento do talão correspondeu à diferença entre a altura do talão observada em uma determinada avaliação e a altura observada na avaliação anterior (T1-T0, T2-T1, T3-T2, T4-T3) (Figura 1 c).

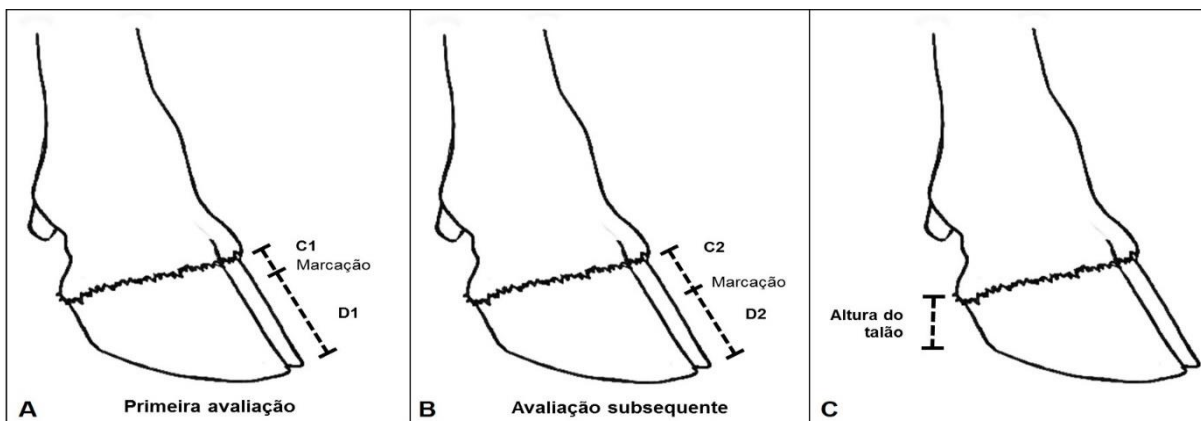


Fig. 1 Representação da marcação e das medidas realizadas. A – Casco na primeira avaliação. B – Casco na avaliação subsequente após 30 dias. C – Representação da medida da altura do talão. Crescimento da muralha dorsal = $C2 - C1$. Desgaste da muralha dorsal = $D1 - D2$

Todas as medidas foram realizadas utilizando-se um paquímetro, que foi manipulado sempre pelo mesmo avaliador. Para a realização das mensurações, os animais foram contidos em tronco de contenção apropriado para bovinos. Em seguida, um auxiliar realizou a imobilização do membro a ser avaliado e, então, procedeu-se a limpeza dos cascos e as medições. Nos mesmos momentos em que se realizou as mensurações no casco, após jejum alimentar e hídrico de 12 horas, procedeu-se a pesagem dos animais para avaliação do ganho de peso diário médio utilizando-se balança mecânica. O ganho de peso diário foi calculado pela inclinação da reta (Coeficiente de regressão), descrevendo a mudança linear no peso vivo a cada 30 dias, durante os 120 dias de avaliação (Lasmar et al., 2011).

A análise estatística dos parâmetros avaliados foi realizada inicialmente de forma quantitativa, calculando a média e desvio padrão. Posteriormente, as variáveis avaliadas foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e ao Teste de Tukey. As diferenças estatísticas foram consideradas quando o valor de probabilidade foi menor que 0,05 ($p < 0,05$) na tabela ANOVA. Para a análise dos dados utilizou-se o programa estatístico R (Versão 3.3.1 – 2016 – The R Foundation for Statistical Computing).

Resultados

O desgaste total da muralha dorsal do membro torácico no tratamento controle foi maior ($p < 0,05$) do que o observado no tratamento biotina. Isso resultou em maior ($p < 0,05$) crescimento líquido total da muralha dorsal do membro torácico no tratamento biotina em relação ao controle. No membro pélvico, não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos em nenhum dos parâmetros avaliados (Tabela 1).

Não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos, quanto as taxas mensais de crescimento, desgaste e crescimento líquido da muralha dorsal do casco em nenhum dos momentos de avaliação, tanto no membro torácico, quanto no pélvico (Tabela 2). Entretanto, houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tempos de avaliação dentro de cada tratamento, quanto a taxa mensal de desgaste da muralha dorsal do casco dos membros torácico e pélvico. Nos dois tratamentos realizados, o desgaste da muralha dorsal do casco do membro torácico foi maior em T1 (Tabela 2).

Tabela 1 Crescimento total, desgaste total e crescimento líquido total da muralha dorsal do casco lateral dos membros torácico e pélvico direito de bezerras mestiças (Jersey x Holandês) suplementadas ou não com 20 mg de biotina durante 120 dias.

Membro	Parâmetro (mm/120 dias)	Tratamento Controle	Tratamento Biotina
Torácico	Crescimento total	$28,83 \pm 1,47^a$	$29,16 \pm 4,12^a$
	Desgaste total	$19,83 \pm 2,32^a$	$16,0 \pm 1,67^b$
	Crescimento líquido total	$9,0 \pm 2,44^b$	$13,16 \pm 3,06^a$
Pélvico	Crescimento total	$36,50 \pm 4,32^a$	$35,83 \pm 4,07^a$
	Desgaste total	$23,16 \pm 2,48^a$	$23,33 \pm 2,16^a$
	Crescimento líquido total	$13,33 \pm 0,24^a$	$12,50 \pm 3,45^a$

Valores seguidos de letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

No membro pélvico, observou-se maior taxa de desgaste da muralha dorsal do casco, em ambos os tratamentos, em T1 e T3 (Tabela 2). Avaliando-se a taxa de crescimento líquido da muralha dorsal no membro pélvico do tratamento controle, observou-se que esta foi negativa em T1 e apresentou a menor média ($p < 0,05$) em relação aos demais tempos. Porém, em T2, observou-se um crescimento líquido compensatório, que foi maior ($p < 0,05$) do que o observado nos demais momentos no tratamento controle. No tratamento biotina, o crescimento líquido da muralha dorsal no membro pélvico foi maior no momento T4 ($p < 0,05$), em relação aos demais momentos (Tabela 2 e Figura 2). No membro torácico, tanto no tratamento biotina, quanto no tratamento controle, não houve diferença significativa entre os tempos de avaliação (Tabela 2 e Figura 2).

Comparando-se o crescimento total do talão observado durante os 120 dias de avaliação, identificou-se que não houve diferença estatística entre os tratamentos, tanto no membro torácico, quanto no membro pélvico (Tabela 3). Não houve diferença estatística entre os tratamentos quanto à taxa de crescimento mensal do talão em nenhum dos momentos avaliados. Em ambos os tratamentos, a taxa de crescimento mensal do talão apresentou comportamento semelhante, observando-se que em T1 ocorreu valores de crescimento negativo, os quais

diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) dos valores observados nos demais momentos de avaliação (Figura 3). Não houve diferença estatística entre os tratamentos quanto ganho de peso diário médio dos animais avaliados (Tabela 4).

Tabela 2 Taxas mensais de crescimento, desgaste e crescimento líquido da muralha dorsal do casco do dígito lateral do membro torácico direito de bezerras mestiças (Jersey x Holandês), suplementadas ou não com 20 mg de biotina durante 120 dias.

Membro	Parâmetro	Tratamento Controle	Tratamento Biotina
Torácico	Taxa de crescimento (mm/mês)		
	T1	$8,0 \pm 1,26^{aA}$	$7,33 \pm 1,80^{aA}$
	T2	$6,0 \pm 2,10^{aA}$	$6,0 \pm 2,31^{aA}$
	T3	$8,16 \pm 2,14^{aA}$	$8,16 \pm 2,03^{aA}$
	T4	$6,66 \pm 2,58^{aA}$	$7,66 \pm 2,13^{aA}$
	Taxa de desgaste (mm/mês)		
	T1	$7,33 \pm 2,25^{aA}$	$6,16 \pm 2,80^{aA}$
	T2	$3,0 \pm 2,31^{aB}$	$2,83 \pm 4,44^{aB}$
	T3	$5,50 \pm 2,78^{aAB}$	$3,83 \pm 4,60^{aAB}$
	T4	$4,0 \pm 2,48^{aB}$	$3,16 \pm 2,75^{aB}$
	Taxa de Crescimento líquido (mm/mês)		
	T1	$0,66 \pm 2,87^{aA}$	$1,16 \pm 1,83^{aA}$
	T2	$3,0 \pm 2,19^{aA}$	$3,16 \pm 1,47^{aA}$
	T3	$2,66 \pm 3,26^{aA}$	$4,33 \pm 2,33^{aA}$
	T4	$2,66 \pm 4,27^{aA}$	$4,50 \pm 1,87^{aA}$
Pélvico	Taxa de crescimento (mm/mês)		
	T1	$8,16 \pm 1,72^{aA}$	$10,83 \pm 2,85^{aA}$
	T2	$10,50 \pm 2,07^{aA}$	$7,66 \pm 2,73^{aA}$
	T3	$8,33 \pm 1,75^{aA}$	$7,66 \pm 3,14^{aA}$
	T4	$9,50 \pm 3,01^{aA}$	$9,66 \pm 2,80^{aA}$
	Taxa de desgaste (mm/mês)		
	T1	$8,66 \pm 1,50^{aA}$	$8,16 \pm 1,47^{aA}$
	T2	$3,66 \pm 1,86^{aC}$	$4,83 \pm 2,31^{aBC}$
	T3	$6,50 \pm 1,37^{aAB}$	$6,66 \pm 2,42^{aAB}$
	T4	$4,33 \pm 1,36^{aBC}$	$3,66 \pm 1,03^{aC}$
	Taxa de crescimento líquido (mm/mês)		
	T1	$-0,50 \pm 0,050^{aC}$	$2,66 \pm 0,079^{aAB}$
	T2	$6,83 \pm 0,083^{aA}$	$2,83 \pm 0,159^{aAB}$
	T3	$1,83 \pm 0,100^{aBC}$	$1,0 \pm 0,146^{aB}$
	T4	$5,16 \pm 0,078^{aAB}$	$6,0 \pm 0,086^{aA}$

Valores seguidos de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). Valores seguidos de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e na mesma variável diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

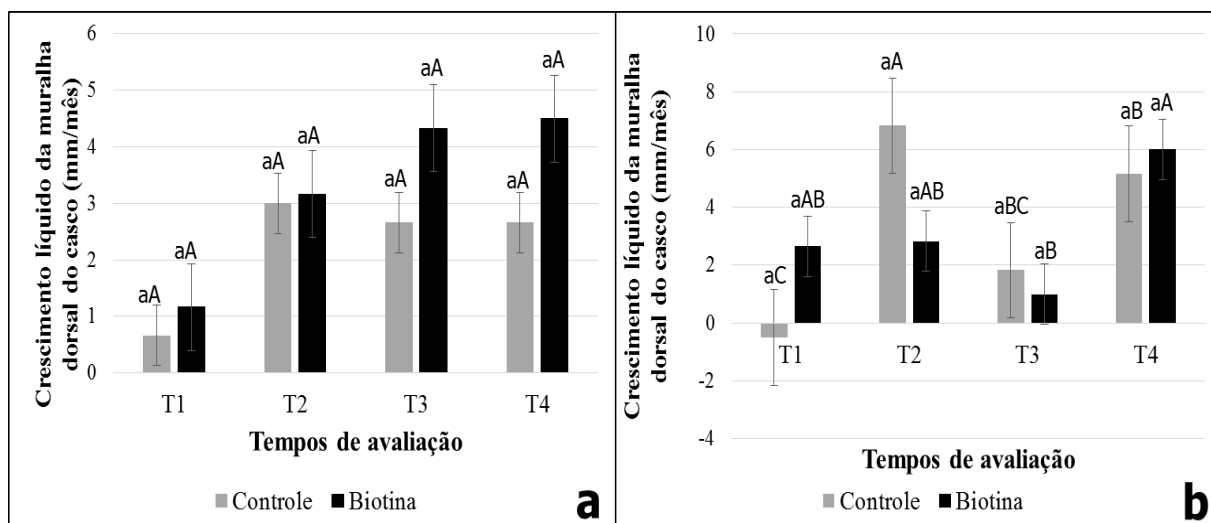


Fig. 2 Taxa de crescimento líquido da muralha dorsal (mm/mês) dos dígitos laterais dos membros torácico (a) e pélvico direito (b) de bezerras mestiças (Jersey x Holandês) suplementadas ou não com 20 mg de biotina durante 120 dias. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os momentos de avaliação pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

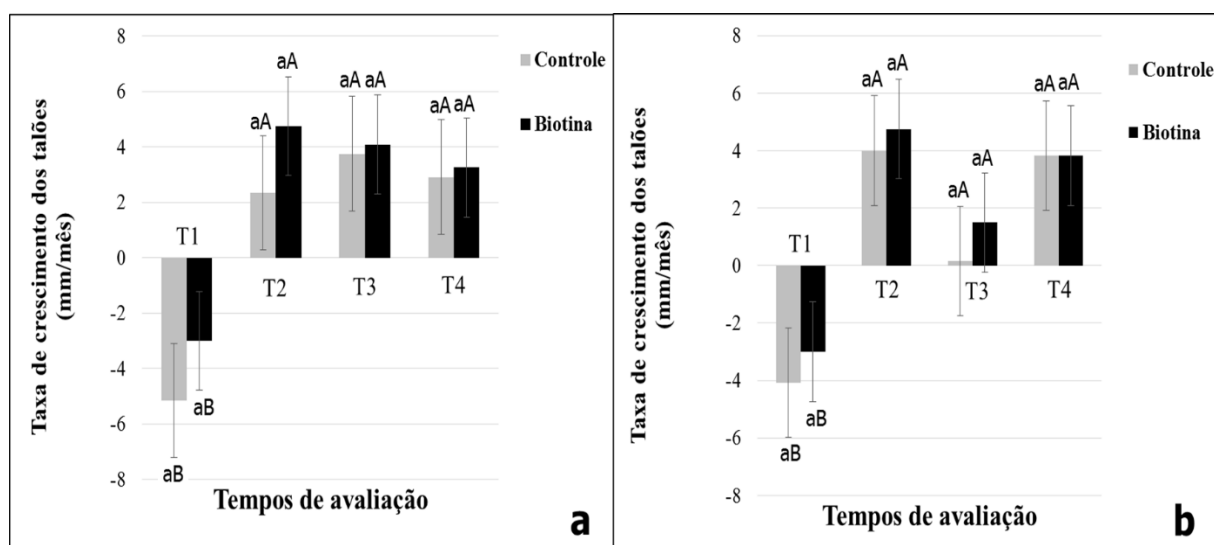


Fig. 3 Crescimento do talão dos dígitos laterais dos membros torácico (A) e pélvico direito (B) de bezerras mestiças (Jersey x Holandês) suplementadas ou não com 20 mg de biotina durante 120 dias. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os momentos de avaliação pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 3 Crescimento do talão dos dígitos laterais dos membros torácico e pélvico direito de bezerras mestiças (Jersey x Holandês) suplementadas ou não com 20 mg de biotina durante 120 dias.

Membro	Parâmetro	Tratamento Controle	Tratamento biotina
Torácico	Crescimento do talão (mm)	5,83 ± 3,60 ^a	10,33 ± 5,78 ^a
Pélvico	Crescimento do talão (mm)	5,16 ± 2,99 ^a	6,50 ± 4,08 ^a

Valores seguidos de letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 4 Ganho de peso diário (Kg/dia) de bezerras mestiças (Jersey x Holandês) suplementadas ou não com 20 mg de biotina por dia durante 120 dias.

Parâmetro	Tratamento Controle	Tratamento biotina
Ganho de peso diário médio (Kg/dia)		
T1	1,08 ± 0,37 ^{aA}	1,05 ± 0,24 ^{aA}
T2	1,02 ± 0,22 ^{aA}	0,99 ± 0,25 ^{aA}
T3	0,93 ± 0,31 ^{aA}	1,07 ± 0,30 ^{aA}
T4	1,03 ± 0,31 ^{aA}	1,01 ± 0,18 ^{aA}

Valores seguidos de letras minúsculas diferentes, na mesma linha e no mesmo momento diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). Valores seguidos de letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna e mesmo tratamento diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Discussão

O menor desgaste e maior crescimento líquido da muralha dorsal do casco, observado no membro torácico dos animais tratados com biotina, pode ser justificado pela maior resistência do estojo córneo das bezerras suplementadas, conforme observaram Campbell et al. (2000). A biotina é um nutriente importante para o processo de queratinização e sua deficiência promove síntese de tecido córneo de baixa qualidade (Mülling et al., 1999). Segundo Bergsten et al. (2003), o fornecimento de biotina está associado a maior resistência da epiderme queratinizada do estojo córneo e da pele.

O menor desgaste da muralha do casco de bovinos suplementados com biotina está, possivelmente, relacionado aos efeitos que essa vitamina exerce sobre a síntese de citoqueratinas. Um estudo *in vitro* demonstrou que o tratamento com biotina promoveu maior produção de citoqueratinas em cultivo celular de queratinócitos (Higuchi et al., 2002). A maior concentração de citoqueratinas no interior das células confere maior resistência a epiderme queratinizada e, conseqüentemente, pode promover menor desgaste da muralha do casco, como observado no membro torácico dos animais tratados com biotina. Entretanto, não ficaram claras as razões para a ausência de efeito positivo no membro pélvico dos animais tratados com biotina.

O aumento da qualidade da substância cementante intercelular que compõe o estrato córneo é outro fator que pode ter contribuído para o menor desgaste da muralha do casco no membro torácico. A síntese de lipídios que compõem a substância cementante intercelular é diretamente influenciada pela biotina, pois esta atua como cofator da enzima acetil-CoA carboxilase, que está envolvida na síntese de ácidos graxos de cadeia longa (Voet and Voet, 2011). Higuchi et al. (2004) observaram que vacas suplementas com biotina apresentaram

maior concentração de lipídios, menor umidade e maior dureza na epiderme queratinizada da sola. Resultados que dão respaldo aos achados do presente estudo.

As taxas de crescimento da muralha dorsal observadas no presente estudo foram semelhantes as citadas por Lawrence (2004) e Silva et al. (2010) e superiores as observadas por Winkler (2005). A semelhança nos resultados pode estar relacionada a idade dos animais, pois nos trabalhos citados também foram utilizados animais jovens. As taxas de crescimento líquido da muralha dorsal do casco observada no presente estudo foram semelhantes às observadas por Winkler (2005) e inferiores as encontradas por Bergsten et al. (2003). Essas variações entre os estudos podem ser justificadas pelas diferenças do ambiente de criação, idade dos animais, tipo de produção e época do ano.

A ausência de diferença estatística nas taxas de crescimento e desgaste da muralha dorsal do casco também foi relatada por Winkler (2005). Este autor não encontrou diferença na taxa de crescimento, desgaste e crescimento líquido da muralha do casco de vacas leiteiras, suplementadas diariamente com 22 mg de biotina. Em outro estudo, Silva et al. (2010) observaram que a suplementação com biotina, durante 40 dias, ocasionou maior crescimento da muralha dorsal do casco em bovinos jovens manejados extensivamente. Entretanto, na pesquisa supracitada, foi fornecido um suplemento comercial que, além da biotina, continham outros nutrientes importantes para a queratinização, como metionina, lisina, zinco e enxofre. Dessa forma, esse resultado foi influenciado pela suplementação de vários nutrientes que estimulam a queratinização do estojo córneo, justificando o efeito em apenas 40 dias de suplementação.

O crescimento do talão dos animais que receberam biotina não foi influenciado pela suplementação dessa vitamina, resultado também observado por Silva et al. (2010). O tipo de piso utilizado no presente estudo pode ter sido um dos fatores que contribuíram para a ineficácia da biotina no aumento do crescimento do talão. As bezerras foram alojadas em baias com piso de concreto recoberto por cerca de 10 cm de maravalha. Embora a cobertura com maravalha diminua a abrasividade do piso de concreto, possivelmente, a espessura da cobertura de maravalha utilizada, associada a alta umidade da “cama” devido ao alojamento de duas bezerras por baia, foram fatores que contribuíram para aumentar a abrasividade do piso. Além disso, O excesso de matéria orgânica no solo contribui para a redução da qualidade do tecido córneo, visto que a ureia destrói os filamentos de queratina (Köning and Liebich, 2004). Segundo Lawrence et al. (2004), a alta umidade do ambiente promove maior desgaste do que crescimento do casco. Diante disso, a abrasividade do piso e a alta umidade podem ter comprometido a qualidade do casco e, conseqüentemente, reduzido o efeito da biotina no talão.

O maior desgaste observado em relação ao crescimento no talão e na muralha dorsal do membro pélvico em T1, em ambos os tratamentos, pode ser explicado pelas lesões realizadas nos membros contralaterais em um experimento paralelo. Devido aos ferimentos nos membros torácico e pélvico esquerdo, os animais sustentaram a maior parte do seu peso corporal nos membros torácico e pélvico direito, onde foram realizadas as mensurações do presente estudo. Como consequência do sobrepeso, estes apresentaram maior desgaste até a cicatrização das feridas, que ocorreu por volta de 15 dias após os procedimentos. Nos demais momentos de avaliação, o crescimento superou o desgaste nos dois tratamentos. Pesquisadores como Silva et al (2010), Lawrence et al. (2004), Winkler (2005) não mencionaram em seus estudos essa possibilidade.

Não houve diferença estatística quanto ao ganho de peso diário médio dos animais tratados e não tratados com biotina. Um fator que deve ser considerado para a ausência de efeito da biotina para o ganho de peso é o tipo de dieta utilizada. A relação concentrado e volumoso da dieta exerce influência sobre a capacidade de síntese de biotina pela microbiota ruminal. Dietas que contêm alto teor de amido e baixo teor de volumoso promovem acidificação do ambiente ruminal e, conseqüentemente, redução das bactérias que sintetizam biotina (Abel et al., 2006). No presente estudo, a dieta foi composta principalmente por volumoso a base de silagem de milho. Forneceu-se pouco concentrado aos animais, pois estes não necessitavam de uma dieta altamente energética. Assim, acredita-se que a microbiota ruminal foi capaz de sintetizar quantidades suficientes de biotina nos dois tratamentos avaliados. Logo, a suplementação pode não ter exercido efeito sobre o ganho de peso, pois a quantidade de biotina sintetizada pela microbiota ruminal foi suficiente para atender as exigências nutricionais em ambos os tratamentos. Embora a biotina tenha importância para o metabolismo energético (Tomlinson *et al.*, 2004; Voet and Voet, 2011) e a suplementação dessa vitamina tenha promovido aumento de produção leiteira em algumas pesquisas (Zimmerly and Weiss, 2001; Ferreira *et al.*, 2007; Enjalbert *et al.*, 2008), aparentemente, a biotina não exerce influência sobre o ganho de peso de bovinos.

Os resultados do presente estudos indicam que a suplementação diária com 20 mg de biotina durante 120 dias é capaz de promover redução da taxa de desgaste e, conseqüentemente, aumento do crescimento líquido da muralha dorsal do casco de bezerras mestiças (Jersey x Holandês). Em avaliações mensais, não há efeito positivo da suplementação com biotina nas taxas de crescimento, desgaste e crescimento líquido da muralha dorsal do casco, crescimento do talão e ganho de peso diário médio.

Agradecimentos: Os autores deste estudo agradecem à Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás (UFG), à Gado Gordo Nutrição Animal e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Este trabalho teve o apoio do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da EVZ da UFG e do Hospital Veterinário da EVZ da UFG.

Declaração dos direitos dos animais: Todos os procedimentos deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Goiás (CEUA/UFG), processo número 089/2015.

Conflito de interesse: os autores declaram que não têm nenhum conflito de interesses.

Referências

- Abel, H., Schröder, B., Lebzien, P. and Flachowsky, G., 2006. Effects of defaunation on fermentation characteristics and biotin balance in an artificial rumen-simulation system (RUSITEC) receiving diets with different amounts and types of cereal, *British Journal of Nutrition*, 95, 1, 99--104.
- Al-Qudah, K.M. and Ismail, Z.B., 2012. The relationship between serum biotin and oxidant/antioxidant activities in bovine lameness. *Research in Veterinary Science*, 92, 1, 138--141.
- Bampidis, V.A., Lymberopoulos, A.G., Christodoulou, V. and Belibasaki, 2007. Impacts of supplemental dietary biotin on lameness in sheep, *Animal Feed Science and Technology*, 134, 1--2, 162--169.
- Bergsten, C., Greenough, P.R., Gay, J.M., Seymour, W.M. and Gay, C.C., 2003. Effects of biotin supplementation on performance and claw lesions on a commercial dairy farm, *Journal of Dairy Science*, 86, 12, 3953--3962.
- Bryant, K.L., Kornegay, E.T., Knight, J.W., Webb Jr, K.E. and Notter DR., 1985. Supplemental biotin for swine. I. Influence on feedlot performance, plasma biotin and toe lesions in developing gilts, *Journal of Animal Science*, 60, 1, 136-144.
- Campbell, J.R., Greenough, P.R. and Petrie, L., 2000. The effects of dietary biotin supplementation on vertical fissures of the claw wall in beef cattle, *Canadian Veterinary Journal*, 41, 9, 690--694.

- Cook, N.B. and Nordlund, K.V., 2009. The influence of the environment on dairy cow behavior, claw health and herd lameness dynamics, *Veterinary Journal*, 179, 3, 360-369.
- Enjalbert, F., Nicot, M.C. and Packington, A.J., 2008. Effects of peripartum biotin supplementation of dairy cows on milk production and milk composition with emphasis on fatty acids profile, *Livestock Science*, 114, 2–3, 287--295.
- Ferreira, G., Weiss, W.P. and Willett, L.B., 2007. Changes in measures of biotin status do not reflect milk yield responses when dairy cows are fed supplemental biotin, *Journal of Dairy Science*, 90, 3, 1452--1459.
- Fitzgerald, T., Norton, B.W., Elliott, R., Podlich, H. and Svendsen, O.L., 2000. The influence of long-term supplementation with biotin on the prevention of lameness in pasture fed dairy cows, *Journal of Dairy Science*, 83, 2, 338--44.
- Freyer, G., Köning S., Fischer B., Bergfeld, U. and Cassel, B.G. Invited review: crossbreeding in dairy cattle from a German perspective of the past and today, *Journal of Dairy Science*, 91,10,3725--43.
- Greenough, P., 2007. Bovine laminitis and lameness: a hands on approach, (Saunders Elsevier, St. Louis).
- Haskell, M.J., Rennie, L.J., Howell, V.A., Bell, M.J. and Lawrence, A.B., 2006. Housing system, milk production, and zero-grazing effects on lameness and leg injury in dairy cows, *Journal of Dairy Science*, 89, 11, 4259--4266.
- Hedges, J., Blowey, R.W., Packington, A.J., O'Callaghan, C.J. and Green, L.E., 2001. A longitudinal field trial of the effect of biotin on lameness in dairy cows, *Journal of Dairy Science*, 84, 9, 1969--1975.
- Higuchi, H., Kasamatsu, M. and Nagahata, H., 2002. Primary culture of bovine hoof keratinocytes: effect of biotin treatment on cell growth and cytokeratin synthesis. In: *Proceedings of the 12th International Symposium on Lameness in Ruminants*, Orlando, 2002, (Session 1: Hoof Biology/Anatomy/Hoof), 220--222.
- Higuchi, H., Maeda, T., Nakamura, M., Kuwano, A., Kawai, K., Kasamatsu, M. and Nagahata, H., 2004. Effects of biotin supplementation on serum biotin levels and physical properties of samples of solar horn of Holstein cows, *Canadian Journal of Veterinary Research*, 68, 2, 93--97.
- Huxley, J.N., 2013. Impact of lameness and claw lesions in cows on health and production, *Livestock Science*, 156, 1–3, 64--70.
- Lasmar, P.Z., Melo, R.C.M., Bitencourt, L.L., Siécola Júnior, S., Silva, J.R.M. and Pereira, M.N. 2011 Desempenho de bezerros pós-desmama em dieta de grão de milho inteiro.

Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia, 5, 23, 1--10.
<http://www.pubvet.com.br/uploads/faa909b91672215fb952201c885d234a.pdf>.

Accessed 12 abr 2017.

- Lawrence, R.J., Elliott, R., Norton, B.W., Thoenen, M.B. Loxton, I. and Hueffner, M., 2004. Influence of biotin supplementation on hoof chemical composition and rates of wear and growth in long fd F1 Wagyu/Black Angus steers. In: Proceedings of the 13th International Symposium and 5th Conference on Lameness in Ruminants, Maribor, 2004, (Session 8 - Nutrition and Claw Health).
- Livesey, C.T. and Laven, R.A., 2007. The effect of housing and intake of methionine on the growth and wear of hoof horn and the conformation of the hooves of first lactation Holstein heifers. *Veterinary Record*, 160, 14, 470--476.
- Lombard, J. and Moreira D., 2011. Early evolution of the biotin-dependent carboxylase family. *BMC Evolutionary Biology*, 11, 232, 1--22.
- Mülling, C.K., Bragulla, H.H., Reese, S., Budras, K.D. and Steinberg, W., 1999. How structures in bovine hoof epidermis are influenced by nutritional factors, *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 28, 2, 103--108.
- Potzsch, C.J., Hedges, V.J., Blowey, R.W., Packington, A.J. and Green, L.E., 2003. The impact of parity and duration of biotin supplementation on white line disease lameness in dairy cattle, *Journal of Dairy Science*, 86, 8, 2577--3582.
- Silva, L.A.F., Franco, L.G., Atayde I.B., Cunha, P.H.J., Moura, M.I. and Goulart D.S., 2010. Effect of biotin supplementation on claw horn growth in young, clinically healthy cattle, *Canadian Veterinary Journal*, 51, 6, 607--610.
- Tomlinson, D.J., Mülling, C.H. and Fakler, T.M. Invited review: formation of keratins in the bovine claw: roles of hormones, minerals, and vitamins in functional claw integrity, *Journal of Dairy Science*, 87, 4, 797--809.
- Vermunt, J.J., Greenough, P.R., 1995. Structural characteristics of the bovine claw: horn growth and wear, horn hardness and claw conformation, *British Veterinary Journal*, 151, 2, 157--180.
- Voet, D. and Voet, J.G., 2011. *Biochemistry*, (4th, John Wiley & Sons, New York).
- Winkler, B., 2005. Mechanical properties of hoof horn, sole haemorrhage and lameness in dairy cattle, (Thesis, Faculty of Science, University of Plymouth).
- Zenker, W., Josseck, H. and Geyer, H., 1995. Histological and physical assessment of poor hoof horn quality in Lipizzaner horses and a therapeutic trial with biotin and a placebo, *Equine Veterinary Journal*, 27, 3, 183--191.

Zimmerly, C.A. and Weiss, W.P., 2001. Effects of supplemental dietary biotin on performance of Holstein cows during early lactation, *Journal of Dairy Science*, 84, 2, 498--506.

CAPÍTULO 4

General Scientific Articles

A suplementação com biotina interfere no metabolismo da glicose e dos lipídios em bezerras?

PJB Queiroz^{*§}, E Oliveira^{*}, DB Martins^{*}, BM Assis[†], RE Rabelo^{*} e LAF Silva^{*}

^{*} Departamento de Medicina Veterinária, Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Avenida Esperança, s/n, Campus Samambaia, Goiânia, Goiás, Brasil.

[†] Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí, Campus Cidade Universitária, BR 364, Km 195, nº 3800, Jataí, Goiás, Brasil

[§] Autor para correspondência: paulojose.vet@hotmail.com

Resumo

OBJETIVO: Com o presente estudo objetivou-se a avaliar o efeito da suplementação com biotina no lipidograma, na frutossamina sérica e na concentração plasmática de glicose e lactato em bezerras mestiças (Jersey x Holandês) desmamadas.

MÉTODOS: Foram utilizadas 12 bezerras, mestiças (Jersey x Holandês), desmamadas, saudáveis com idade inicial de seis meses e peso médio de $124,08 \pm 16,57$. As bezerras foram divididas em tratamento controle e tratamento biotina, contendo seis animais em cada tratamento. Em cada baia foi alojada uma bezerra de cada tratamento. Os animais tratados com biotina receberam uma dose individual e diária de 20 mg de biotina fornecida em papélotes, por via oral, durante 120 dias. A avaliação laboratorial foi realizada em três momentos distintos: um dia antes do início do fornecimento de biotina (T0), no dia 60 (T1) e no dia 120 (T2) do período experimental. As amostras de sangue foram colhidas por punção da jugular, utilizando-se agulhas de calibre 25 x 0,7 mm e colhidas a vácuo. Os parâmetros laboratoriais avaliados foram as concentrações plasmáticas de glicose, lactato, frutossamina, triglicerídeos, colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL).

RESULTADOS: A suplementação com biotina não tem efeito nas variáveis bioquímicas avaliadas ($p < 0,05$).

CONCLUSÃO: Conclui-se que a biotina fornecida por 120 dias na dose de 20 mg não interfere no metabolismo da glicose e dos lipídios de bezerras mestiças (Jersey x Holandês) desmamadas.

ABB	Abreviação
ACC	Acetil-CoA carboxilase
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HDL	Lipoproteína de alta densidade
MCC	β -metilcrotonil-CoA
PC	Piruvato-carboxilase
PCC	Propionil-CoA carboxilase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
VLDL	Lipoproteínas de densidade muito baixa

Introdução

A biotina é uma vitamina do complexo B que atua como cofator nas reações de transporte de dióxido de carbono, realizadas pelas enzimas piruvato-carboxilase (PC), propionil-CoA carboxilase (PCC), acetil-CoA carboxilase (ACC) e β -metilcrotonil-CoA (MCC) (Mock, 2007; 2011). Uma das funções da biotina no organismo é o controle da expressão de genes importantes na regulação do metabolismo intermediário. Estudos em ratos tem demonstrado que a biotina estimula mecanismos que favorecem a hipoglicemia, como o aumento da secreção de insulina e a maior expressão e atividade da enzima glucoquinase (Chauhan e Dakshinamurti, 1991; Romero-Navarro *et al.*, 1999). Por outro lado, foi demonstrado que a biotina diminui a expressão hepática de enzima fosfoenolpiruvato carboxinase, a qual estimula a síntese de glicose pelo fígado (Dakshinamurti e Li, 1994). Além disso, a suplementação com biotina promove redução da concentração plasmática de lipídios em ratos (Larrieta *et al.*, 2010) e humanos (Revilla-Monsalve *et al.*, 2006).

Vários estudos demonstraram os efeitos positivos que a suplementação de bovinos com biotina proporciona para a qualidade dos cascos (Fitzgerald *et al.*, 2000; Hedges *et al.*, 2001; Lischer Ch *et al.*, 2002; Bergsten *et al.*, 2003; Potzsch *et al.*, 2003; Higuchi *et al.*, 2004; Randhawa *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2012). Outras pesquisas avaliaram os efeitos da suplementação com essa vitamina no desempenho produtivo de vacas leiteiras (Zimmerly e Weiss, 2001; Rosendo *et al.*, 2004; Ferreira e Weiss, 2007; Ferreira *et al.*, 2007; Enjalbert *et al.*, 2008; Lean e Rabiee, 2011) e em parâmetros bioquímicos (Zimmerly e Weiss, 2001; Rosendo *et al.*, 2004; Enjalbert *et al.*, 2008).

A biotina é importante para o metabolismo energético dos ruminantes, pois é cofator da enzima PC, que catalisa a conversão do piruvato em oxaloacetato, primeira reação

enzimática da via da gliconeogênese. Essa vitamina atua também na via metabólica de transformação do propionato em glicose (Aschenbach *et al.*, 2010), que nos ruminantes representa aproximadamente 70% da glicose proveniente da gliconeogênese (Reynolds *et al.*, 2003; McDonald *et al.*, 2010). No que se refere às concentrações plasmáticas deste carboidrato em bovinos, há divergências sobre o efeito da biotina, uma vez que em um estudo observou-se elevação da glicose (Rosendo *et al.*, 2004), enquanto em outros estudos (Zimmerly e Weiss, 2001; Reynolds *et al.*, 2007; Enjalbert *et al.*, 2008), a glicose permaneceu inalterada.

Embora a suplementação com biotina em ruminantes seja um tema de constante interesse científico, muitas questões sobre a atuação dessa vitamina no metabolismo energético ainda não foram plenamente elucidadas. Acrescente-se a isso, a escassez de estudos quanto à influência dessa vitamina na síntese de lipídios e na concentração plasmática de outros metabólitos envolvidos no metabolismo energético, como o lactato e a frutossamina. Além disso, não há informações sobre a relevância da biotina nas vias de produção de energia em bezerras desmamadas. Por isso, com o presente estudo objetivou-se determinar o efeito da suplementação com biotina no lipidograma, na frutossamina sérica e na concentração plasmática de glicose e lactato em bezerras mestiças (Jersey x Holandês) desmamadas.

Material e métodos

Animais, alojamento e alimentação

O estudo foi desenvolvido no Galpão Experimental de Grandes Animais da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás (UFG), localizado no município de Goiânia, estado de Goiás, Brasil, sob as coordenadas 16°40'43'' latitude e 49°15'14'' longitude. O experimento ocorreu entre outubro de 2015 e março de 2016. Todos os procedimentos envolvendo os animais deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Goiás (CEUA/UFG), processo número 089/2015.

Foram utilizadas 12 bezerras, mestiças (Jersey x Holandês), saudáveis, desmamadas, com idade inicial de seis meses e peso médio de $124,08 \pm 16,57$, provenientes do Setor de Bovinocultura Leiteira da EVZ/UFG. Antes do início do período experimental, os animais foram adaptados às condições experimentais por um período de 15 dias, a fim de se evitar que o estresse ocasionado pela mudança de ambiente alterasse o consumo e o desempenho. Nesse período foram vermifugados (Dectomax[®], Zoetis, Ltda, Campinas, SP, Brasil), vacinados contra febre aftosa (Bovicel[®], Vallée S/A, Montes Claros, MG, Brasil) e contra clostridioses (Poli-Star[®], Vallée S/A, Montes Claros, MG, Brasil).

Durante o período experimental, as bezerras foram alojadas em um galpão coberto e distribuídas em seis baias, contendo duas bezerras em cada baia. O piso era de concreto, mas foi coberto por uma camada de cerca de 10 cm de “cama” de maravalha. Os animais tiveram acesso contínuo a água e a um cocho contendo sal mineral (Gado Gordo 80 Cria[®], Gado Gordo Nutrição Animal, Comércio e Indústria Ltda, Itapuranga, GO, Brasil). A dieta foi composta por silagem de milho e concentrado farelado (Ração Gado Gordo Bezerra II[®], Gado Gordo Nutrição Animal, Comércio e Indústria Ltda, Itapuranga, GO, Brasil), a base de farelo de soja e milho integral moído. A silagem de milho apresentava a seguinte composição bromatológica: proteína bruta 7,61%, fibra detergente neutro 56,77%, fibra detergente ácido 38,64%, matéria mineral 4,68% e extrato etéreo 2,05%. A dieta foi calculada de acordo com as recomendações nutricionais do NRC (2001). Os animais foram pesados mensalmente e a quantidade de concentrado ajustada caso ocorresse aumento ou redução de peso. A alimentação foi fornecida duas vezes ao dia às oito e 16 horas, em um coxo de alvenaria.

O experimento seguiu um delineamento em blocos casualizados em esquema de parcelas subdivididas no tempo. Os animais foram blocados com base no peso inicial e distribuídos aleatoriamente em seis baias, formando assim um total de seis blocos de dois animais cada. Os animais foram submetidos a dois tratamentos: tratamento controle (sem adição de biotina) e tratamento biotina, que consistiu na suplementação individual e diária de 20 mg de biotina fornecida em papelotes, por via oral, durante 120 dias. Em cada baia, uma bezerra foi submetida ao tratamento controle e a outra ao tratamento com biotina. Escolheu-se a dose de 20 mg, pois foi a mesma utilizada em outro estudo, no qual as unidades experimentais foram vacas adultas, que apresentaram aumento de glicose plasmática (Rosendo *et al.*, 2004).

Colheita das amostras

A avaliação laboratorial de ambos os tratamentos foi realizada em três momentos distintos, pré-estabelecidos: um dia antes do início do fornecimento de biotina (T0), no dia 60 (T1) e no dia 120 (T2) do período experimental. Realizou-se hemograma dos animais nos momentos de avaliação, a fim de assegurar que estivessem plenamente saudáveis. Os parâmetros laboratoriais avaliados foram as concentrações plasmáticas de glicose, lactato e frutossamina. Avaliou-se também os constituintes do lipidograma: triglicerídeos, colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL).

Para as colheitas sanguíneas, as bezerras foram contidas em brete de contenção apropriado para bovinos. Realizou-se colheita em todos os momentos de avaliação, 30 minutos antes do fornecimento da alimentação. As amostras de sangue foram colhidas por punção da jugular esquerda, utilizando-se agulhas de calibre 25 x 0,7 mm (BD Vacutainer®, Becton Dickinson, São Paulo, Brasil) e tubos a vácuo. Foram utilizados tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para a realização do hemograma, tubos com gel separador e ativador de coágulo para as dosagens bioquímicas e tubos contendo fluoreto de sódio para a mensuração de glicose e lactato. As amostras foram devidamente homogeneizadas, identificadas e, imediatamente, encaminhadas para o Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário da instituição (LabClin Vet/HV/UFG), onde foi realizada as avaliações laboratoriais.

Técnica laboratorial

Para a obtenção do soro e do plasma, as amostras foram centrifugadas por cinco minutos à rotação de 2318G. As análises bioquímicas foram efetuadas logo em seguida em duplicata. Para isso, foram utilizados reagentes comerciais Labtest® (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Minas Gerais), com metodologia cinética e colorimétrica, em temperatura de 37°C, com leitura realizada em analisador bioquímico automático CM 250® (Wiener Lab Group, Rosário, Argentina). O colesterol total, a glicose, o lactato e os triglicerídeos foram mensurados pelo método enzimático Trinder, com leitura em ponto final, catalisados pelas enzimas esterase oxidase, glicose oxidase, lactato oxidase e peroxidase, respectivamente. O HDL pela reação de ponto final, utilizando o método precipitação com ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio. Já a frutossamina, foi dosada por reação cinética, segundo a metodologia de redução do azul de nitrotetrazólio (NBT). O LDL e VLDL foram determinados pela equação de Friedewald, realizada por cálculos indiretos.

Análise estatística

A análise estatística dos parâmetros laboratoriais avaliados foi realizada inicialmente de forma quantitativa pela a média e desvio padrão. Posteriormente, as variáveis foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e ao Teste de Tukey. As diferenças estatísticas foram consideradas quando o valor de probabilidade foi menor que 0,05 ($p < 0,05$) na tabela ANOVA. Para a análise dos dados utilizou-se o programa estatístico R (Versão 3.3.1 – 2016 – The R Foundation for Statistical Computing).

Resultados

Avaliações laboratoriais

O tratamento com biotina não ocasionou efeito em nenhuma das variáveis bioquímicas avaliadas (Tabela 1). Ao comparar-se as médias dos tratamentos entre os momentos de avaliação, notou-se que os parâmetros glicose, lactato, triglicerídeos, LDL e VLDL não apresentaram diferença estatística. As variáveis colesterol total e HDL apresentaram valores menores em M0 em ambos os tratamentos, em seguida, houve aumento significativo na concentração desses analitos nos momentos M1 e M2.

Quanto a variável frutossamina, constatou-se que no tratamento Controle não ocorreu diferença estatística entre os momentos de avaliação, enquanto que no tratamento Biotina, observou-se menor concentração de frutossamina em M1.

Discussão

A ausência de efeito do tratamento com biotina nas concentrações de glicose e lipídios no sangue das bezerras pode ser explicada pela capacidade de animais saudáveis de manterem metabólitos sanguíneos dentro dos valores normais, mesmo diante de mudanças na dieta. Assim, embora a biotina esteja envolvida na gliconeogênese e na síntese de lipídeos, a homeostase do organismo impede alterações na concentração desses metabólitos no sangue, mesmo diante da maior disponibilidade dessa vitamina no organismo. A concentração plasmática de glicose é um parâmetro regido por intenso controle hormonal, que impede grandes variações glicêmicas (Wittwer, 2000; Enjalbert *et al.*, 2008). Embora o fornecimento de biotina tenha ocasionado aumento da secreção de insulina em ratos (Sone *et al.*, 1999), o mesmo resultado não foi observado em vacas (Ganj Khanlou *et al.*, 2007). A ausência de interação entre o tratamento com biotina e a concentração plasmática de glicose também foi observada por Zimmerly e Weiss, 2001, Majee *et al.*, 2003 e Enjalbert *et al.*, 2008, que não encontraram diferença na glicemia de vacas leiteiras suplementadas com essa vitamina. Diferentemente, Rosendo *et al.* (2004) em vacas e Kempton *et al.* (1978) em ovelhas, encontraram elevação da concentração plasmática de glicose, após suplementação com biotina, indicando que a influência da biotina na glicemia de ruminantes é um tema complexo, que demanda mais estudos para melhor compreensão.

Sabe-se que a biotina atua como cofator de duas enzimas envolvidas na gliconeogênese, a PC e a PCC (Ferreira e Weiss, 2007; Enjalbert *et al.*, 2008). A PC participa da síntese de glicose a partir do lactato, glicerol e alanina, enquanto que a PCC é necessária para a conversão do propionato em glicose (Ferreira e Weiss, 2007). Dessa forma, se a atividade dessas enzimas fosse limitada pela baixa concentração plasmática de biotina, a suplementação dessa vitamina poderia elevar a atividade dessas enzimas e, conseqüentemente, aumentar a taxa de gliconeogênese. Porém, esse efeito não foi observado no presente estudo.

A ausência de diferença estatística no parâmetro frutossamina indica que não houve aumento da glicemia nos dias que antecederam as colheitas. A frutossamina é uma proteína glicada formada pela união irreversível de uma molécula de glicose e uma albumina ou outra proteína sérica. Esse analito pode ser utilizado como um indicador da variação glicêmica dos últimos 14 dias, pois eleva-se em situações de hiperglicemia crônica (Kaneko, 2008). Os valores de concentração plasmática de frutossamina obtidos no presente estudo são semelhantes aos encontrados por Coppo (2001), que avaliou esse analito em bezerros zebuínos mestiços. Blum *et al.* (2000) também não encontraram diferenças na concentração de frutossamina no plasma de vacas suplementadas com triglicerídeos ou ácidos graxos livres, o que indica que possivelmente esse parâmetro é pouco influenciado por mudanças na dieta.

Não houve efeito da suplementação com biotina na concentração plasmática de lactato. Este resultado pode ser justificado, em parte, pelo tipo de dieta fornecida. Os animais utilizados neste estudo não foram submetidos a situações que promovessem hiperlactatemia, como dieta rica em carboidratos rapidamente degradáveis no rúmen. Dessa forma, o efeito que a suplementação com biotina poderia ocasionar no aumento da gliconeogênese utilizando o lactato como substrato não foi identificado. Resultado semelhante foi observado por Reynolds *et al.* (2007), que forneceram biotina para vacas em lactação.

Nenhum dos parâmetros avaliados no lipidograma foi influenciado pela suplementação com biotina. A biotina atua como cofator da ACC, enzima que catalisa a primeira etapa da biosíntese de ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) e exerce função regulatória sobre esse via metabólica (Bruss, 2008; Voet e Voet, 2011). Dessa forma, supôs-se que a maior disponibilidade de biotina no organismo poderia implementar o metabolismo de lipídios, entretanto isso não foi observado. Um estudo em humanos com diabetes mostrou que a suplementação com 15 mg de biotina por 28 dias reduziu significativamente a concentração plasmática de triglicerídeos e VLDL, mas não alterou as concentrações de colesterol e glicose (Revilla-Monsalve *et al.*, 2006). A ausência de efeito da biotina na concentração plasmática de lipídios observada no presente estudo pode ser justificada pela baixa concentração plasmática

de lipídios no sangue dos bovinos. A concentração de lipídios nas dietas normalmente consumidas por ruminantes é baixa, cerca de 4%. Consequentemente, a concentração sanguínea de triglicerídeos nos ruminantes é cerca de cinco vezes menor que nos monogástricos (Kozloski, 2011). Dessa forma, o baixo requerimento de biotina para biossíntese de lipídios justifica, em parte, a ausência de diferença nas concentrações de lipídios plasmáticos dos animais suplementados.

Rosendo et al. (2004) observaram redução da concentração hepática de triglicerídeos em vacas de alta produção leiteira suplementadas com biotina, porém não avaliaram a concentração desse analito no sangue. Embora a biotina participe da primeira etapa da biosíntese de ácidos graxos, ativando a enzima ACC, o processo para a biossíntese de lipídios é longo e envolve diversas enzimas, controladas por mecanismos endócrinos independentes de suplementação vitamínica (Voet e Voet, 2011). Enjalbert et. al (2008) atribuíram o aumento da produção leiteira de vacas suplementadas com biotina a melhora na mobilização lipídica proveniente do tecido adiposo, porém estes autores não realizaram lipidograma nos animais. Como os animais do presente estudo apresentavam pouca mobilização lipídica, pois não estavam em balanço energético negativo, possivelmente, a biotina não foi um fator limitante para a atividade da enzima ACC. Assim, o efeito da suplementação com biotina sobre a concentração plasmática de lipídios deve ser melhor estudado em bovinos em situação de balanço energético negativo, como vacas recém-paridas.

Conclui-se que a biotina fornecida por 120 dias na dose de 20 mg não interfere no metabolismo da glicose e dos lipídios de bezerras mestiças (Jersey x Holandês) desmamadas.

Agradecimentos

Os autores deste estudo agradecem à Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás (UFG), à Gado Gordo Nutrição Animal pelo e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Este trabalho teve o apoio do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da EVZ da UFG e do Hospital Veterinário da EVZ da UFG.

Declaração de conflito de interesses

Os autores declaram que não tem nenhum conflito de interesses.

Referências

- Aschenbach JR, Kristensen NB, Donkin SS, Hammon HM, Penner GB.** Gluconeogenesis in dairy cows: the secret of making sweet milk from sour dough. *IUBMB Life* 62, 12, 869-77, 2010.
- Bergsten C, Greenough PR, Gay JM, Seymour WM, Gay CC.** Effects of biotin supplementation on performance and claw lesions on a commercial dairy farm. *Journal of Dairy Science* 86, 12, 3953-62, 2003.
- Blum JW, Bruckmaier RM, Vacher PY, Munger A, Jans F.** Twenty-four-hour patterns of hormones and metabolites in week 9 and 19 of lactation in high-yielding dairy cows fed triglycerides and free fatty acids. *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine* 47, 1, 43-60, 2000.
- *Bruss ML.** Lipids and ketones. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML (eds). *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5th. Pp 81-115. Elsevier, Burlington, USA, 2008.
- Chauhan J, Dakshinamurti K.** Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats. *Journal of Biological Chemistry* 266, 16, 10035-8, 1991.
- Chen B, Wang C, Liu J.** Effects of dietary biotin supplementation on performance and hoof quality of Chinese Holstein dairy cows. *Livestock Science* 148, 1-2, 168-73, 2012.
- Coppo JA.** Evolution of fructosaminaemia and glucaemia during the growth of unweaned and early weaned half-bred zebu calves. *Veterinary Research Communications* 25, 6, 449-59, 2001.
- Dakshinamurti K, Li W.** Transcriptional regulation of liver phosphoenolpyruvate carboxykinase by biotin in diabetic rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* 132, 2, 127-32, 1994.
- Enjalbert F, Nicot MC, Packington AJ.** Effects of peripartum biotin supplementation of dairy cows on milk production and milk composition with emphasis on fatty acids profile. *Livestock Science* 114, 2-3, 287-95, 2008.
- Ferreira G, Brown AN, Teets CL.** Effect of biotin and pantothenic acid on performance and concentrations of avidin-binding substances in blood and milk of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 98, 9, 6449-54, 2015.
- Ferreira G, Weiss WP.** Effect of biotin on activity and gene expression of biotin-dependent carboxylases in the liver of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 90, 3, 1460-6, 2007.
- Ferreira G, Weiss WP, Willett LB.** Changes in measures of biotin status do not reflect milk yield responses when dairy cows are fed supplemental biotin. *Journal of Dairy Science* 90, 3, 1452-9, 2007.
- Fitzgerald T, Norton BW, Elliott R, Podlich H, Svendsen OL.** The influence of long-term supplementation with biotin on the prevention of lameness in pasture fed dairy cows. *Journal Dairy Science* 83, 2, 338-44, 2000.
- Ganjkhanelou M, Salimi M, Nikkhah A, Zali A.** Effects of supplemental dietary biotin on performance of holstein dairy cows. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10, 17, 2960-63, 2007.

- Hedges J, Blowey RW, Packington AJ, O'Callaghan CJ, Green LE.** A longitudinal field trial of the effect of biotin on lameness in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 84, 9, 1969-75, 2001.
- Higuchi H, Maeda T, Nakamura M, Kuwano A, Kawai K, Kasamatsu M, Nagahata H.** Effects of biotin supplementation on serum biotin levels and physical properties of samples of solar horn of Holstein cows. *Canadian Journal of Veterinary Research* 68, 2, 93-7, 2004.
- *Kaneko JJ.** Carbohydrate metabolism and its diseases. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML (eds). *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5th. Pp. 45-80. Elsevier, Burlington, USA, 2008.
- Kempton TJ, Balnave D, Leng RA.** The effects of biotin administration on glucose synthesis rates in starved pregnant sheep. *Australian Veterinary Journal* 54, 6, 319-20, 1978.
- *Kozloski GV.** *Bioquímica dos ruminantes*. 3^a. Editora da UFMS, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, 2011.
- Larrieta E, Velasco F, Vital P, Lopez-Aceves T, Lazo-de-la-Vega-Monroy ML, Rojas A, Fernandez-Mejia C.** Pharmacological concentrations of biotin reduce serum triglycerides and the expression of lipogenic genes. *European journal of pharmacology* 644, 1-3, 263-8.
- Lean IJ, Rabiee AR.** Effect of feeding biotin on milk production and hoof health in lactating dairy cows: a quantitative assessment. *Journal of Dairy Science* 94, 3, 1465-76, 2011.
- Lischer Ch J, Koller U, Geyer H, Mulling C, Schulze J, Ossent P.** Effect of therapeutic dietary biotin on the healing of uncomplicated sole ulcers in dairy cattle - a double blinded controlled study. *Veterinary Journal*, 163, 1, 51-60, 2002.
- Majee DN, Schwab EC, Bertics SJ, Seymour WM, Shaver RD.** Lactation performance by dairy cows fed supplemental biotin and a B-vitamin blend. *Journal of Dairy Science* 86, 6, 2106-12, 2003.
- *McDonald P, Edwards RA, Greenhalgh JFD, Morgan CA, Sinclair LA, Wilkinson RG.** *Animal Nutrition*. 7th. Pearson, New York, USA, 2010.
- *Mock DM.** Biotin. In: Robert B. Rucker; Janos Zempleni JWS, Donald B. McCormick (eds). *Handbook of Vitamins*. 4th. Pp. 361-77. CRC Press, Boca Raton, EUA.; 2007. p.608.
- Potzsch CJ, Hedges VJ, Blowey RW, Packington AJ, Green LE.** The impact of parity and duration of biotin supplementation on white line disease lameness in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 86, 8, 2577-82, 2003.
- Randhawa SS, Dua K, Randhawa CS, Munshi SK.** Effect of biotin supplementation on hoof health and ceramide composition in dairy cattle. *Veterinary Research Communication* 32, 8, 599-608, 2008.
- Revilla-Monsalve C, Zendejas-Ruiz I, Islas-Andrade S, Baez-Saldana A, Palomino-Garibay MA, Hernandez-Quiroz PM, Fernandez-Mejia C.** Biotin supplementation reduces plasma triacylglycerol and VLDL in type 2 diabetic patients and in nondiabetic subjects with hypertriglyceridemia. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 60, 4, 182-5, 2006.

- Reynolds CK, Aikman PC, Lupoli B, Humphries DJ, Beever DE.** Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. *Journal of Dairy Science* 86, 4, 1201-17, 2003.
- Reynolds CK, Beever DE, Steinberg W, Packington AJ.** Net nutrient absorption and liver metabolism in lactating dairy cows fed supplemental dietary biotin. *Animal* 1, 3, 375-80, 2007.
- Romero-Navarro G, Cabrera-Valladares G, German MS, Matschinsky FM, Velazquez A, Wang J, Fernandez-Mejia C.** Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets and in biotin-deficient rats. *Endocrinology* 140, 10, 4595-600, 1999.
- Rosendo O, Staples CR, McDowell LR, McMahon R, Badinga L, Martin FG, Shearer JF, Seymour WM, Wilkinson N.** Effects of biotin supplementation on peripartum performance and metabolites of Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 87, 8, 2535-45, 2004.
- Sone H, Ito M, Sugiyama K, Ohneda M, Maebashi M, Furukawa Y.** Biotin enhances glucose-stimulated insulin secretion in the isolated perfused pancreas of the rat. *Journal of Nutritional Biochemistry* 10, 4, 237-43, 1999.
- *Voet D, Voet JG.** *Biochemistry*. 4th. John Wiley & Sons, New York, USA, 2011. 1428.
- *Wittwer, F.** Diagnóstico dos desequilíbrio metabólicos de energia em rebanhos bovinos. In: González FHD, Barcellos JO, Ospina H, Ribeiro LAO (eds). *Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais*. Gráfica UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, 2000.
- Zimmerly CA, Weiss WP.** Effects of supplemental dietary biotin on performance of Holstein cows during early lactation. *Journal of Dairy Science* 84, 2, 498-506, 2001.

Tabela 1. Efeito da suplementação com 20 mg/dia de biotina durante 120 dias na concentração de glicose, frutossamina, lactato, colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) de bezerras mestiças (Jersey x Holandês).

Variável bioquímica	Tratamento	Momentos		
		T0	T1	T2
Glicose (mg/dL)	Controle	89,66 ± 7,09	94,83 ± 8,08	88,83 ± 3,20
	Biotina	91,83 ± 11,13	96,50 ± 6,57	88,33 ± 9,28
Frutossamina (μmol/L)	Controle	254,00 ± 14,71	241,74 ± 23,30	261,50 ± 15,15
	Biotina	251,83 ± 15,05 ^x	229,00 ± 16,28 ^y	266,61 ± 15,53 ^x
Lactato (mg/dL)	Controle	14,33 ± 2,25	18,83 ± 7,81	9,66 ± 1,64
	Biotina	8,33 ± 12,27	12,66 ± 15,35	11,50 ± 2,80
Triglicerídeos (mg/dL)	Controle	12,33 ± 3,93	14,00 ± 6,22	15,50 ± 3,51
	Biotina	18,16 ± 5,78	11,16 ± 1,47	17,16 ± 4,67
Colesterol Total (mg/dL)	Controle	57,16 ± 19,65 ^y	83,50 ± 25,49 ^x	87,00 ± 10,12 ^x
	Biotina	49,83 ± 9,41 ^y	86,16 ± 10,42 ^x	75,50 ± 13,58 ^x
HDL (mg/dL)	Controle	49,23 ± 19,01 ^y	74,30 ± 22,63 ^x	72,85 ± 9,80 ^x
	Biotina	36,16 ± 12,53 ^y	73,40 ± 12,33 ^x	60,65 ± 11,18 ^x
LDL (mg/dL)	Controle	8,41 ± 4,30	6,35 ± 9,60	14,18 ± 9,60
	Biotina	10,03 ± 8,27	10,53 ± 2,28	11,41 ± 8,75
VLDL (mg/dL)	Controle	2,46 ± 0,79	3,46 ± 1,24	3,10 ± 0,70
	Biotina	3,63 ± 1,16	2,23 ± 0,29	3,43 ± 0,93

T0=momento 0; T1=momento 1 (dia 60); T2=momento 2 (dia 120)

^{xyz} Valores com sobrescrito na minha linha e mesmo parâmetro diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização de pesquisas que busquem avaliar o efeito da suplementação com nutrientes importantes para a queratinização é fundamental para a formulação de dietas, que previnam o desenvolvimento de lesões podais nos rebanhos. Neste contexto, a suplementação com biotina para bezerras cruzadas (Jersey x Holandês) demonstrou potencial para reduzir o desgaste e aumentar o crescimento da muralha dorsal do casco. Esse resultado demonstra que a suplementação dessa vitamina pode ser usada como estratégia para redução do desgaste do casco de bezerros alojados em piso de concreto e, assim, reduzir a incidência de lesões associadas ao desgaste excessivo. Com base nos resultados do presente estudo, o fornecimento de biotina para bezerras desmamadas, pode diminuir a incidência de lesões digitais quando estas bezerras tornarem-se novilhas e primíparas, possibilitando assim aumento da produção leiteira e maior eficiência reprodutiva. Entretanto, mais estudos são necessários para a definição do mecanismo de ação da biotina na redução do desgaste do casco, visto que ainda existem muitos questionamentos sobre esse tema.

A realização de pesquisas futuras sobre as mudanças na microestrutura do estojo córneo promovidas pela suplementação dessa vitamina pode auxiliar no esclarecimento de como ela atua na redução do desgaste do casco. Dessa forma, o uso de técnicas de imagem modernas, que possibilitem a caracterização das modificações na microestrutura do casco após a suplementação é uma ferramenta que poderá produzir avanços nas pesquisas sobre o tema.

A dose ideal de biotina para bezerras desmamadas deve ser estabelecida, pois a dose de 20 mg, utilizada no presente estudo, foi estabelecida com base em experimentos realizados em vacas adultas. A definição de quanto da biotina suplementada é utilizada pela microbiota ruminal e o quanto é efetivamente utilizada pelo animal é um tema que carece de mais pesquisas. Ainda, outro questionamento importante é o quanto a microbiota recém formada de bezerras desmamadas recentemente pode influenciar no efeito da suplementação com biotina, tanto no tecido córneo, quanto em parâmetros bioquímicos. Possivelmente, o efeito da suplementação com biotina em ruminantes jovens pode diferir do efeito apresentado por ruminantes adultos, em razão da diferença na microbiota ruminal. Portanto, o desenvolvimento de mais estudos sobre o tema faz se necessário para a elucidação destes questionamentos.

Embora a biotina atue como cofator de enzimas relacionadas a gliconeogênese e a síntese de ácidos graxos, o fornecimento dessa substância para bezerras desmamadas não influenciou no lipidograma e nas concentrações plasmáticas de glicose, lactato e frutamina.

Entretanto, deve-se levar em consideração que animais saudáveis utilizam mecanismos fisiológicos, como a excreção renal e a deposição de lipídios, para a manutenção dos metabólitos sanguíneos dentro dos valores normais, mesmo diante de mudanças na dieta. Assim, mesmo que a biotina esteja envolvida na gliconeogênese e na síntese de lipídios, a homeostase do organismo impede alterações significativas nestes metabólitos sanguíneos, mesmo diante da maior disponibilidade dessa vitamina no organismo.

A realização de pesquisas futuras com o propósito de avaliar o efeito dessa vitamina sobre o metabolismo de bovinos que apresentem maior necessidade energética, como vacas em início de lactação e submetidas a dietas altamente acidogênicas, faz-se necessária. Pois o potencial da suplementação dessa vitamina sobre a produção leiteira e o metabolismo energético de bovinos, ainda, não foi completamente elucidado. Dessa forma, a definição de tal conhecimento pode colaborar com o aumento da produtividade de bovinos leiteiros e, assim, auxiliar no desenvolvimento da pecuária leiteira no Brasil e em outros países.

ANEXOS

Anexo A – Aprovação CEUA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 23 de novembro de 2015.

PARECER REFERENTE AO PROJETO PROTOCOLADO NESTA COMISSÃO SOB O N. 089/2015

I - Finalidade do projeto (pesquisa/ensino): Pesquisa

II - Identificação:

☐ **Título do projeto:** *Influência da suplementação com biotina no desenvolvimento do casco e no perfil metabólico de bezerras pré-púberes e novilhos*

☐ **Pesquisador Responsável/ Unidade:** Luiz Antônio Franco da Silva
Escola de Veterinária e Zootecnia/EVZ-UFV

☐ **Pesquisadores Participantes:**

Nome/Endereço do Currículo Lattes	Instituição	Formação Básica	Titulação Mais Recente	Função na Pesquisa
Luiz Antônio Franco da Silva http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4783002E1	EVZ/UFV	Medicina Veterinária	Doutorado	Coordenador
Paulo José Bastos Queiroz http://lattes.cnpq.br/5625298314637434	EVZ/UFV	Medicina Veterinária	Graduado	Manejo, realização de biópsias, realização das análises metabólicas e histológicas
Vinícius Menezes Maia http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K8211907P4	EVZ/UFV	Medicina Veterinária	Graduando	Manejo, fornecimento de biotina e contenção dos animais
Ana Paula de Almeida Vinhal http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K8201900H6	EVZ/UFV	Medicina Veterinária	Graduanda	Manejo, fornecimento de biotina e auxílio na colheita de amostras.
João Felipe Freire Oliveira http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K8207686D1	EVZ/UFV	Medicina Veterinária	Graduando	Manejo, fornecimento de biotina e contenção dos animais.
Josyanne Rodrigues de Freitas http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4358448T4	EVZ/UFV	Medicina Veterinária	Graduanda	Manejo, fornecimento de biotina e contenção dos animais.
João Messias Cavalhaes Filho http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4358476Y7	EVZ/UFV	Medicina Veterinária	Graduando	Manejo, fornecimento de biotina e contenção dos animais.
Danieli Brolo Martins http://lattes.cnpq.br/3365458344732081	EVZ/UFV	Medicina Veterinária	Doutorado	Co-orientadora e auxílio na realização das análises laboratoriais.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFV, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876. Email: ceua.ufv@gmail.com



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA**



Médico Veterinário Responsável:

Nome	Número do CRMV
Paulo José Bastos Queiroz	CRMV-GO nº 5966

- ☐ **Unidade onde será realizado:** Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Goiás, Goiânia/GO.
☐ **Data de apresentação a CEUA:** 27/10/2015

III - Objetivos e justificativa do projeto:

O presente projeto tem por objetivo avaliar a influência da suplementação com biotina no desenvolvimento do casco e no perfil metabólico de bezerras pré-púberes e novilhos púberes. Entende-se que as doenças digitais representam um dos principais problemas da bovinocultura leiteira, ocasionando diversos prejuízos ao produtor. Assim, a biotina é uma vitamina hidrossolúvel do complexo B, sendo possivelmente a vitamina de maior importância para processo de queratinização do casco e, também está envolvida na gliconeogênese, no metabolismo do propionato, na síntese de ácidos graxos e na degradação de aminoácidos. Apesar dos estudos já realizados com a suplementação de biotina, pouco se sabe sobre o efeito da suplementação dessa vitamina em bovinos jovens. Para tanto, propõe os seguintes objetivos específicos: 1) Avaliar o efeito da biotina no desenvolvimento do casco por meio de análises morfológicas e histológicas em bezerras pré-púberes e novilhos; 2) Avaliar o efeito da suplementação com biotina no hemograma, hemogasometria e líquido rumenal de novilhos; 3) Analisar o efeito da biotina no perfil metabólico e ganho em peso dos animais suplementados com essa vitamina.

IV - Sumário do projeto:

☐ **Discussão sobre a não utilização de métodos alternativos e necessidade do número de animais:**

Segundo o pesquisador responsável, não foi encontrado na literatura nenhum estudo demonstrando o uso de métodos alternativos para esse experimento. Segundo ele, a principal dificuldade para o desenvolvimento de métodos alternativos no presente estudo encontra-se na característica peculiar do trato gastrointestinal dos ruminantes. Após o fornecimento por via oral a biotina chega ao rúmen, uma câmara de fermentação na qual bactérias, protozoários e fungos vivem em simbiose com os ruminantes. Após parte da biotina suplementada ser utilizada pela microbiota ruminal, o restante é absorvido pela mucosa do intestino delgado e atinge a circulação. Em seguida, a biotina segue para os tecidos que necessitam dessa vitamina para seu metabolismo, dentre eles está o tecido queratinizado do casco. Diante da complexidade das interações que ocorrem durante o percurso do fornecimento até a chegada da biotina no tecido queratinizado do casco, o desenvolvimento desse estudo em modelos experimentais alternativos ainda é inviável.

☐ **Grau de Invasividade:** GI 2

☐ **Animal utilizado e fonte de obtenção. Deixar explícita a espécie animal, o número total de animais utilizados e o número de animais para cada experimento.**

Serão utilizados animais da espécie bovina, sendo 12 fêmeas e 6 machos, o que totaliza 18 animais inseridos no estudo. Quanto à idade dos animais, as fêmeas, de até 100 kg, terão 6 anos em média e os machos, de até 250kg, terão de 12 a 15 anos em média. Quanto à procedência, na 1ª etapa, os animais serão comprados de propriedades leiteiras do estado de Goiás, sendo posteriormente destinados à Fazenda Escola da Universidade Federal de Goiás (Setor de bovinocultura leiteira). Segundo o pesquisador responsável, o número de animais utilizados na pesquisa se justifica pelo delineamento experimental: 1ª etapa: O experimento será instalado em delineamento inteiramente ao acaso em esquema de parcelas subdivididas no tempo, em quatro tempos, utilizando seis animais. Para os dados será utilizado análise de variância e teste



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA**



de Tukey (variáveis quantitativas) e teste de Kruskal-Wallis (escores), ambos com nível de significância de 5%. 2ª etapa:

O experimento será instalado em delineamento inteiramente ao acaso em esquema de parcelas subdivididas no tempo, com dois tratamentos (Grupo Biotina e Grupo Controle) e quatro tempos, utilizando seis animais por tratamento. Para os dados será aplicado análise de variância e teste de Tukey (variáveis quantitativas) e teste de Kruskal-Wallis (escores), ambos com nível de significância de 5%. Portanto, o experimento será dividido em duas etapas, que por questões logísticas serão realizados simultaneamente durante o período de nove meses. Os animais serão abrigados em galpão coberto, sendo alojados dois animais em cada baia, sempre respeitando a homogeneidade do sexo e peso. Na primeira etapa serão utilizados seis bovinos machos mestiços (*Bos indicus* X *Bos taurus*) com idade variando entre 12 e 15 meses. Os bovinos que participarão da primeira etapa experimental serão submetidos às seguintes avaliações: hemograma, hemogasometria, avaliação morfométrica do casco, avaliação histológica do casco e avaliação do líquido rumenal. Hemograma, hemogasometria, avaliação morfométrica do casco e avaliação do líquido rumenal serão realizados durante o período experimental nos dias 0 (M0), 90 (M1), 180 (M2) e 270 (M3). A avaliação histológica do casco será realizada no dia 0, no dia 135 e no dia 270 do período experimental. Na segunda etapa do experimento serão utilizadas 12 bezerras, cruzadas (Holandês x Jersey), com idade inicial de seis meses. As bezerras serão divididas em dois grupos (Grupo Controle e Grupo Biotina), cada um com seis animais. O grupo biotina será tratado diariamente com 20 mg de biotina por via oral durante nove meses. Serão realizadas avaliações morfométricas do casco e determinação do perfil metabólico antes do início da suplementação e a cada 90 dias, correspondendo aos momentos: 0 (M), 90 (M1), 180 (M2), 270 (M3). Será realizada, também, biópsia e avaliação histológica da muralha do casco e do cório coronário, nos dias 0, 135 e 270 do período experimental.

❑ Materiais biológicos destes exemplares serão usados em outros projetos:

O pesquisador responsável não menciona um número de protocolo aprovado pela CEUA, somente que no futuro haverá retinografia em bovinos da raça Jersey e mestiços Jersey/holandês relacionada ao material coletado neste estudo.

❑ Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do ambiente (ar, temperatura, umidade), alimentação/hidratação:

Os animais serão instalados no galpão experimental de grandes animais do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG. O galpão é coberto e permite a entrada de luz e ventilação natural. As baias são de piso de concreto e serão cobertas com “cama” de maravalha. Cada baia possui um cocho e um bebedouro feito em alvenaria. Será realizada a retirada de fezes e “cama” úmida duas vezes ao dia, logo após a alimentação. Uma vez na semana, será realizada a troca de toda a “cama” de maravalha das baias. Medidas da baia: largura 2 m, altura 2 m, comprimento 5 m. Quanto à alimentação, será constituída de silagem de milho (2% do peso vivo na matéria seca) e concentrado contendo 18% de proteína (1% do peso vivo na matéria seca), ambos fornecidos duas vezes ao dia, às 8 e 16 horas, *ad libitum* e permitindo-se sobras de no máximo 10%. As sobras de silagem serão retiradas diariamente antes do fornecimento da alimentação às 16 horas. Serão utilizados cochinhos fixos feitos de alvenaria e cochinhos móveis de plástico permitindo um espaçamento de cocho de no mínimo 30 cm por animal. A dieta atenderá as recomendações nutricionais do NRC (2001) para ganhos em peso médio diário de 600 a 700 g/dia. Ficará disponível aos animais um cocho de plástico contendo sal mineral para consumo *ad libitum*. O fornecimento de água será realizado por meio de bebedouros feitos em alvenaria, de fácil acesso aos animais, contendo boia para reposição automática de água. A limpeza será realizada semanalmente, ou sempre que se julgar necessário diante da presença de sujidades. Medidas - Cocho fixo: largura 40 cm, comprimento 85 cm e altura 50 cm. Cocho de plástico móvel: largura 35 cm e comprimento 50 cm. Bebedouro de alvenaria: largura 45 cm, comprimento 42 cm e altura 45 cm. O pesquisador menciona ainda que o galpão experimental permite a entrada de luminosidade e ventilação natural, pois entre as paredes das baias e o teto do galpão há um espaço de cerca de 3 m, que permite a entrada de luz e ar, segundo informações da Estação Evaporimétrica da Escola de Agronomia da UFG. Baias do Galpão experimento de grandes animais da Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG. Na primeira etapa, será mantido 1 animal por baia, e na 2ª etapa, 2 animais por baia. Os animais serão soltos em piquete um vez ao dia durante o período de 2 horas.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA**



❑ Procedimentos experimentais do projeto de pesquisa.

- *Uso de fármacos anestésicos*: 1) Cloridrato de Xilazina a 2% (DCB: Xilazina ou Cloridrato de Xilazina) - Dose (UI ou mg/kg) 0,1 a 0,2 mg/kg. Via de administração: intravenosa; 2) Cloridrato de lidocaína a 2% (DCB: Lidocaína ou Cloridrato de Lidocaína) - 10 ml – Bloqueio de Bier. Via de administração: intravenosa regional (Bloqueio de Bier).
- *Uso de fármacos analgésicos*: 1) Flunixin Meglumina (DCB: Flunixin) - Dose (UI ou mg/kg) 1,1 mg/kg. Via de administração: intramuscular. Frequência: Uma vez ao dia durante 3 dias.
- *Contenção do animal*: Contenção mecânica realizada com peias confeccionadas a partir de sacos de ração e cordas.
- *Condições alimentares*: 1) Jejum - Duração em horas: 18 horas; 2) Restrição hídrica - Duração em horas: 8 horas;
- *Cirurgias múltiplas*: Biópsias da região do cório coronário e da muralha do casco em um membro. Os procedimentos serão realizados antes do início da suplementação de biotina, após 135 dias do início da suplementação e ao final do período de suplementação. Acontecerá em atos diferentes, com um período de intervalo de 135 dias entre os procedimentos.
- *Pós-Operatório*: A. Observação da recuperação - será realizado monitoramento visual durante a recuperação dos animais submetidos a sedação com cloridrato de xilazina; B. Uso de analgesia – Fármaco: Flunixin Meglumine; Dose (UI ou mg/kg) 1,1 mg/kg; Via de administração: Intramuscular; Frequência: Uma vez ao dia; Duração: 3 dias.
- *Outros cuidados pós-operatórios*: A realização das biópsias ocasionará lesões no casco e no cório coronário, as quais podem servir como porta de entrada para agentes infecciosos. Então, após a colheita dos tecidos, serão realizados curativos e bandagem oclusiva com algodão e atadura, que será impermeabilizada com pasta de alcatrão vegetal (Unguento Friezol®, Pinus, Jundiá-SP). A bandagem será retirada após cinco dias e serão realizados curativos tópicos com PVPI tópico até a completa cicatrização.
- *Exposição / Inoculação / Administração*: Fármaco - Solução de PVPI tópico: curativo das feridas das biópsias após a retirada da bandagem. Sem dosagem definida. Via de administração: Tópica. Frequência: Diariamente até a completa cicatrização.
- *Extração de materiais biológicos*: 1) Material biológico: Sangue. Quantidade da amostra: 10 ml. Frequência: 1 vez cada 90 dias. Método de coleta: Venopunção jugular; 2) Material biológico: Líquido ruminal. Quantidade da amostra: 500 ml. Frequência: 1 vez a cada 90 dias. Método de coleta: Colheita através da cânula ruminal; 3) Material biológico: Tecido do cório coronário e da muralha do casco. Quantidade da amostra: 1 cm² de tecido. Frequência: 1 vez a cada 4 meses. Método de coleta: Biópsia.

❑ Métodos utilizados para minimizar o sofrimento e aumentar o bem-estar dos animais antes, durante e após a pesquisa. Pontos Finais Humanitários.

Segundo o pesquisador responsável, os animais serão avaliados visualmente duas vezes ao dia durante todo o período experimental, dessa forma qualquer manifestação de dor ou sofrimento será diagnosticada e os procedimentos cabíveis serão realizados para eliminação da dor e sofrimento.

❑ Riscos aos professores/alunos (físicos, biológicos, psicológicos e sociais).

Os riscos envolvidos incluem: 1) Risco de lesões durante o manejo e fornecimento de biotina: a equipe responsável pelo manejo e fornecimento de biotina aos animais receberá o devido treinamento para a execução dessa tarefa. Ademais, os animais utilizados no estudo são de aptidão leiteira e acostumados desde o início da vida ao convívio com o homem, tornando-se assim animais dóceis. Dessa forma, o risco de lesões aos envolvidos na pesquisa durante o manejo e fornecimento de biotina é mínimo; 2) Risco de lesões durante a contenção dos animais: a equipe responsável pela contenção dos animais também receberá treinamento adequado para a execução dessa atividade, a fim de reduzir ao máximo o risco de contusões durante a contenção aos executores dessa tarefa e aos animais; 3) Risco de lesões com agulhas e objetos cortantes durante a anestesia e biópsia: os responsáveis pela anestesia e colheita de material receberam treinamento e serão orientados por profissionais experientes durante a execução dessa atividade.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFV, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) -
CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876. Email: ceua.ufv@gmail.com



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



☐ **Descrição do método de eutanásia (caso se aplique) e destino dos animais após a aula prática.**

Não haverá eutanásia. Na 1ª etapa, os novilhos utilizados retornarão ao rebanho da Escola de Veterinária e Zootecnia. Na 2ª etapa, as bezerras retornarão para a Fazenda Escola (setor de bovinocultura leiteira) da UFG.

V – Comentários do relator frente às orientações da CEUA:

☐ **Quanto a documentos:** O protocolo é composto pela Ficha de Protocolo do Projeto (p. 01-13), pelo Termo Responsabilidade assinados por todos os pesquisadores (p. 14), pela Certidão de Ata (p. 15), Declaração de venda de animais para pesquisa (p. 16) e por um CD com todos os itens do protocolo físico gravados em mídia digital.

VI - Parecer da CEUA:

Após apreciação dos esclarecimentos sobre as medidas que serão utilizadas para minimizar o sofrimento de animais que não se recuperarem do procedimento cirúrgico, consideramos o projeto **APROVADO**. Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que a pesquisadora responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPI-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, a qual está prevista para finalizar suas ações até 30 de novembro de 2016.

VI - Data da reunião: 23/11/2015

Dra. Renata Mazaro e Costa
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG

ANEXO B – Normas Revista *Veterinary Animal Health and Production*

Instructions for Authors

Authorship Policy

Authorship should incorporate and should be restricted to those who have contributed substantially to the work in one or more of the following categories:

- Conceived of or designed study
- Performed research
- Analyzed data
- Contributed new methods or models
- Wrote the paper

Types of Articles

Manuscripts should be presented preferably in Times New Roman font, double spaced, using A4 paper size. Please use the automatic page and line numbering function to number the pages and lines in your document and number the lines in a single continuous sequence.

Regular Articles:

Articles should be as concise as possible and should not normally exceed approximately 4000 words or about 8 pages of the journal including illustrations and tables. Articles should be structured into the following sections;

- (a) Abstract of 150-250 words giving a synopsis of the findings presented and the conclusions reached. The Abstract should be presented as a single continuous paragraph without subdivisions.
- (b) Introduction stating purpose of the work
- (c) Materials and Methods
- (d) Results
- (e) Discussion (conclusions should be incorporated in the discussion!)
- (f) Acknowledgements
- (g) Statement of Animal Rights
- (h) Conflict of Interest Statement
- (i) References

Short Communications and Technical Notes:

Short Communications and Technical Notes should not normally exceed approximately 2000 words or about 4 pages of the journal, including illustrations, tables and references. An abstract of 150-250 words should be included and a minimum number of sub-headings may be included if it adds clarity to the article.

Short Communications report original scientific data.

Technical Notes describe innovative methodologies.

Reviews:

Review articles will be welcomed. However, authors considering the submission of review articles are advised to consult the Editor-in-Chief in advance.

Correspondence:

Letters on topics relevant to the aims of the Journal will be considered for publication by the Editor-in-Chief who may modify them.

It is the authors responsibility to ensure that submitted manuscripts comply with journal format as indicated in the current instructions to authors and free sample articles on the springer.com journal homepage.

Ethical standards

Manuscripts submitted for publication must contain a statement to the effect that all human and animal studies have been approved by the appropriate ethics committee and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments.

It should also be stated clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Details that might disclose the identity of the subjects under study should be omitted.

These statements should be added in a separate section before the reference list. If these statements are not applicable, authors should state: The manuscript does not contain clinical studies or patient data.

The editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned requirements. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned requirements

Manuscript Submission

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Costs of Color Illustrations

Online publication of color illustrations is always free of charge.

For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs of EUR 950 / US\$ 1150 (+ local tax) per article, irrespective of the number of figures in it.

Title page

Title Page

The title page should include:

The name(s) of the author(s)

A concise and informative title

The affiliation(s) and address(es) of the author(s)

The e-mail address, and telephone number(s) of the corresponding author

If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables. Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

Please note:

Use the automatic page and line numbering function to number the pages and lines in your document

References

1. All publications cited in the text should be presented in the list of references. The typescript should be carefully checked to ensure that the spelling of the authors' names and dates are exactly the same as in the reference list.

2. In the text, refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed, if necessary, by a short reference to appropriate pages. Examples: 'Peters (1985) has shown that 'This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1984, pp. 12--16)'

3. If reference is made in the text to a publication by three or more authors, the abbreviation et al. should be used. All names should be given in the list of references.

4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically by authors' surname(s) and chronologically by author. If an author in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications by the single author, arranged according to publication dates; publications of the same author with co-authors. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1986a, 1986b, etc.

5. Use the following system for arranging each reference in the list:

- For journal articles:

Ahl, A.S., 1986. The role of vibrissae in behaviour: a status review, *Veterinary Research Communications*, 10, 245--268

- For books:

Fox, J.G., Cohen, B.J. and Lowe, F.M., 1984. *Laboratory Animal Medicine*, (Academic Press, London)

- For a paper in published symposia proceedings or a chapter in multi-author books:

Lowe, K.F. and Hamilton, B.A., 1986. Dairy pastures in the Australian tropics and subtropics. In: G.T. Murtagh and R.M. Jones (eds), *Proceedings of the 3rd Australian conference on tropical pastures*, Rockhampton, 1985, (Tropical Grassland Society of Australia, St. Lucia; Occasional Publication 3), 68-79

- For unpublished theses, memoranda etc:

Crowther, J., 1980. *Karst water studies and environment in West Malaysia*, (unpublished PhD thesis, University of Hull)

- For Online documents:

Doe J. Title of subordinate document. In: *The dictionary of substances and their effects*. Royal Society of Chemistry. 1999. <http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document>. Accessed 15 Jan 1999

6. Do not abbreviate the titles of journals mentioned in the list of references.

7. Titles of references should be given in the original language, except for the titles of publications in non-Latin alphabets, which should be transliterated, and a notation such as '(in Russian)' or '(in Greek, with English abstract)' added.

8. Citations of personal communications should be avoided unless absolutely necessary. When used, they should appear only in the text, using the format: 'E. Redpath, personal communication, 1986' and should not appear in the Reference List. Citations to the unpublished data of any of the authors should not be included unless the work has already been accepted for publication, in which case a reference should be given in the usual way with "in press" in place of the volume and page numbers.

Tables

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Artwork and Illustrations Guidelines

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

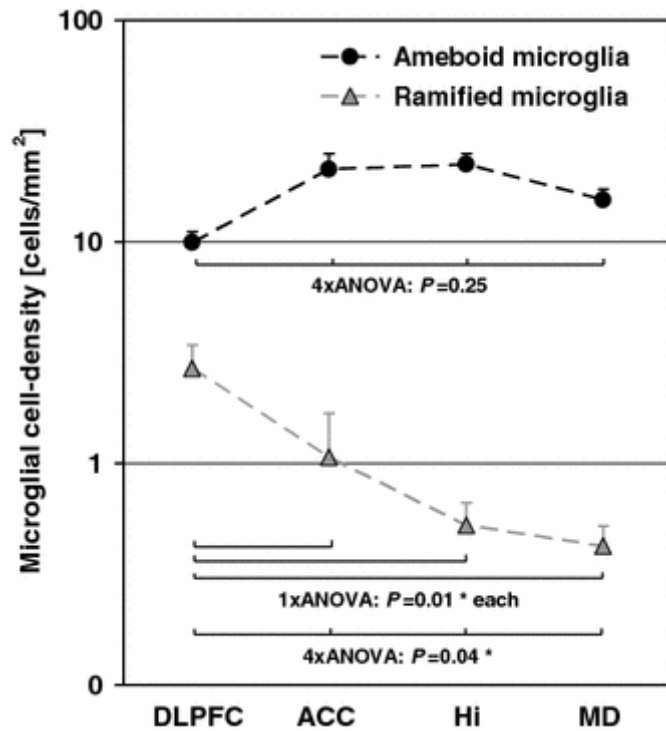
Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



Definition: Black and white graphic with no shading.

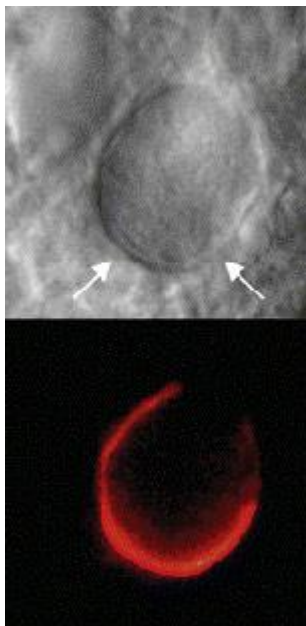
Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

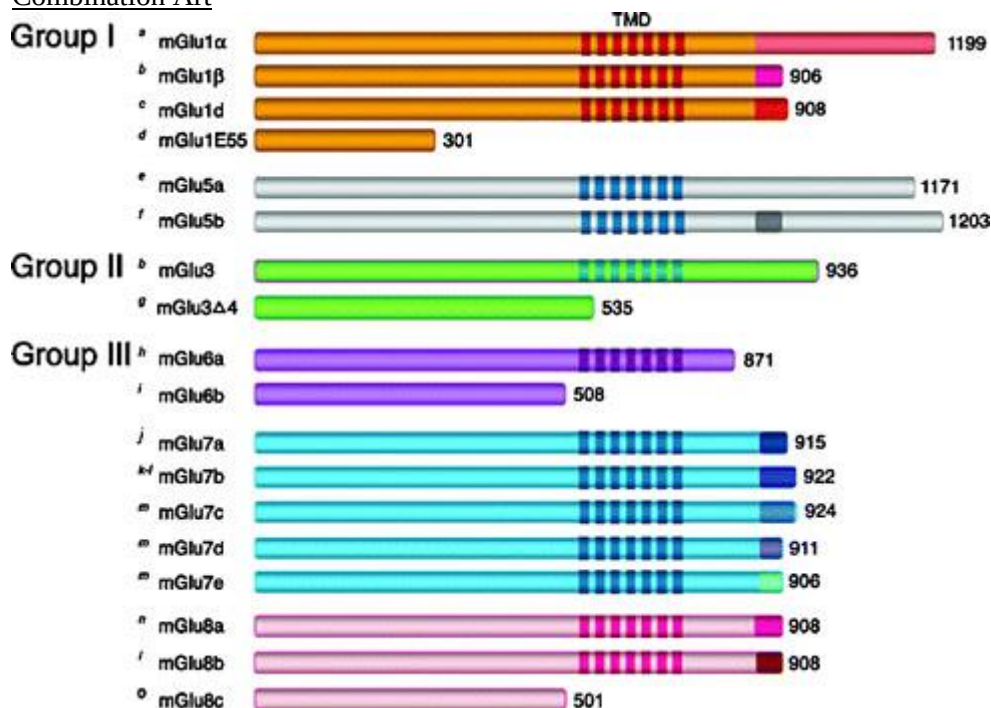


Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art



Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures,

"A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type. No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

Figures should be submitted separately from the text, if possible.

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Electronic Supplementary Material

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as electronic supplementary material, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

Aspect ratio: 16:9 or 4:3

Maximum file size: 25 GB

Minimum video duration: 1 sec

Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.
Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that
The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

Ethical Responsibilities of Authors

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.

The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”)).

A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami-publishing”).

No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions

No data, text, or theories by others are presented as if they were the author’s own (“plagiarism”). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near

verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.

Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

Authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission. Changes of authorship or in the order of authors are **not** accepted **after** acceptance of a manuscript.

Adding and/or deleting authors **at revision stage** may be justifiably warranted. A letter must accompany the revised manuscript to explain the role of the added and/or deleted author(s). Further documentation may be required to support your request.

Requests for addition or removal of authors as a result of authorship disputes after acceptance are honored after formal notification by the institute or independent body and/or when there is agreement between all authors.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential proprietary data is excluded.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:

If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.

If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note. Please note that retraction means that the paper is **maintained on the platform**, watermarked "retracted" and explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.

The author's institution may be informed.

Compliance with Ethical Standards

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

Disclosure of potential conflicts of interest

Research involving Human Participants and/or Animals

Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

Disclosure of potential conflicts of interest

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following:

Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)

Honoraria for speaking at symposia

Financial support for attending symposia

Financial support for educational programs

Employment or consultation

Support from a project sponsor

Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships

Multiple affiliations

Financial relationships, for example equity ownership or investment interest

Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)

Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found

[here](#):

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Research involving human participants and/or animals

1) Statement of human rights

When reporting studies that involve human participants, authors should include a statement that the studies have been approved by the appropriate institutional and/or national research ethics committee and have been performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that the independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study.

The following statements should be included in the text before the References section:

Ethical approval: "All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards."

For retrospective studies, please add the following sentence:

“For this type of study formal consent is not required.”

2) Statement on the welfare of animals

The welfare of animals used for research must be respected. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals have been followed, and that the studies have been approved by a research ethics committee at the institution or practice at which the studies were conducted (where such a committee exists).

For studies with animals, the following statement should be included in the text before the References section:

Ethical approval: “All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.”

If applicable (where such a committee exists): “All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.”

If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, please select one of the following statements:

“This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.”

Informed consent

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. Hence it is important that all participants gave their informed consent in writing prior to inclusion in the study. Identifying details (names, dates of birth, identity numbers and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scientific purposes and the participant (or parent or guardian if the participant is incapable) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning.

The following statement should be included:

Informed consent: “Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.”

If identifying information about participants is available in the article, the following statement should be included:

“Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.”

After acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer’s web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

Open Choice

Copyright and license term – CC BY

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Find more about the license agreement

English Language Editing

For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider:

Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity.

Visiting the English language tutorial which covers the common mistakes when writing in English.

Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review. Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts.

English language tutorial

Nature Research Editing Service

American Journal Experts

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted.

If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style before publication.

ANEXO C – Normas Revista *New Zealand Veterinary Journal***New Zealand Veterinary Journal****Instructions for Authors**

(updated 28 June 2013)



New Zealand Veterinary Journal, Vet Clinic, IVABS Reception, Mail Code 412, Massey University
Private Bag 11-222, Palmerston North, 4442, New Zealand
P +64 6 350 5355 | F +64 6 350 5659 | E nzvj@vets.org.nz | www.nzvetjournal.org.nz

Scope and general policy	1
Publication options	1
Page charges and fast-track publication	1
Open access options	1
Green open access	1
Specific policies	1
Authorship	1
Notification of sources of funding and financial, conflicting or competing interests	1
Animal welfare and medical ethics	2
Copyright and manuscript release	2
Misconduct	2
Disclaimer	2
Peer review	2
Submission of manuscripts	3
Preparation of manuscripts	3
Classes of articles	3
Journal layout	3
Format	3
Journal style	4
References	5
Tables	5
Figures	6
Supplementary Information	6
Statistical guidelines	6
Aims	6
Materials and methods	6
Statistical analysis	7
Presentation	7
Proofs and reprints	7
Proofs	7
Reprints	7

Scope and general policy

The *New Zealand Veterinary Journal* publishes general scientific articles, clinical communications, short communications, reviews and correspondence on all aspects of veterinary science, animal welfare, and animal health aspects of animal science. Submissions from all disciplines are welcomed.

The editorial policies of the *Journal* are in accordance with the *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals* published by the International Committee for Medical Journal Editors (ICMJE) at: www.icmje.org.

Publication options

The *Journal* is published by Taylor & Francis on behalf of the New Zealand Veterinary Association.

Accepted manuscripts are published online within three weeks of acceptance and subsequently allocated to issues

published bimonthly in January, March, May, July, September and November each year.

Page charges and fast-track publication

There are no page charges for the routine publication of articles in the *Journal*. Rapid communications and correspondence are published in the next available print issue.

Provision exists for authors to advance publication of articles that have been refereed and accepted in the usual way, ahead of their scheduled date, upon payment of a \$NZ450 base fee plus \$NZ225 per page.

Open access options

Articles can be made fully and permanently open access online, and for hosting in open access repositories and/or distribution without license, on payment of an Author Publishing Charge of \$US2950. This option is only made available once an article has been accepted.

Green open access

Articles can be made freely accessible by posting the Author Accepted Manuscript in the author's institutional or subject repository, after an embargo period of 12 months following publication of the Version of Record (i.e. the published article after all proof corrections).

Specific policies**Authorship**

All authors should meet all the following criteria to qualify for authorship, as recommended by the ICMJE:

- Substantial contributions to conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data;
- Drafting the article or revising it critically for important intellectual content; and
- Final approval of the version to be published.

The names and contributions of those involved in the study who did not qualify for authorship may be included in the Acknowledgements section. Further guidance is provided at:

http://www.icmje.org/ethical_1author.html.

Notification of sources of funding and financial, conflicting or competing interests

Submissions must be accompanied by clear disclosures from all authors of their affiliations, funding and financial or competing interests that may have bearing on the submission.

- All authors must disclose all financial holdings, professional affiliations, advisory positions, board memberships, patent applications/holdings, or possible conflicts or competing interests that may bear relationship to the submitted work. The Editor will determine whether any of the material disclosed should be published as part of the article in a section preceding the Acknowledgements entitled, "Declaration of Interest".
- All sources of funding and financial support pertaining to the submitted research, including support in kind,

must be stated explicitly in the Acknowledgements section of the manuscript.

- Organisational affiliations of all authors including academic, corporate and other commercial affiliations that have any bearing on the study must be listed in the Acknowledgements section, or included in affiliations listed for each author as footnotes on the title page.
- Where funding or support has been provided from a commercial source or a conflict or competing interest exists, the role of the named parties in the experimental design, implementation, analysis, interpretation of results, reporting and decision to publish must be declared.

Failure to disclose all sources of funding and financial, conflicting or competing interests is grounds for immediate rejection or retraction of submitted or published manuscripts, or may result in publication of a notice of undisclosed competing conflict of interest, at the Editor's discretion. Conflict of interest may exist whether or not an individual believes it affects his or her scientific judgment, and is best managed by full disclosure.

Animal welfare and medical ethics

All experimental work involving humans and/or animals must comply with the legal and ethical requirements of the institutions at which, and in the jurisdictions under which, the work was done. All experimental work involving animals must also conform with the ethical standards described in the MAF User's Guide to Part 6 of the New Zealand Animal Welfare Act 1999, published by MAF Biosecurity New Zealand, and in the Good Practice Guide for the Use of Animals in Research, Testing and Teaching, published by the National Animal Ethics Advisory Committee (2002). Research involving the manipulation of live animals conducted in New Zealand since 1999 must have been conducted under and in accordance with approval by an accredited animal ethics committee, in accordance with Part 6 of the Animal Welfare Act 1999.

Under the Act, research is defined as any work (being investigative work or experimental work or diagnostic work or toxicity testing work or potency testing work) that involves the manipulation of any animal. Unless the manipulation is carried out on any animal that is in the immediate care of a veterinarian (i) for clinical purposes in order to diagnose any disease in the animal or any associated animal, or (ii) to assess the effectiveness of a proposed treatment regime for the animal or any associated animal, then it must be approved by an animal ethics committee.

All research involving either the participation of humans, or where the research impacts on human individuals, groups or communities, must be approved by an accredited human ethics committee. In New Zealand, committees must be accredited by the Health Research Council Ethics Committee.

Studies using client-owned animals must be performed with informed client consent and demonstrate a high standard (best practice) of veterinary care.

The final decision concerning acceptability of a manuscript on ethical and welfare grounds rests with the Editor.

Copyright and manuscript release

Submission of a manuscript is held to imply that it has not been and, if accepted, will not be published elsewhere in whole or in part without permission of the Editor, and that all parties to the ownership of the intellectual property contained in it agree to its publication. Publication elsewhere in the form of an abstract, extended summary or conference proceedings does not necessarily preclude publication in the *Journal*, but should be declared at the time of submission.

Authors wishing to include extracts or illustrations from other published works must obtain permission from the copyright holder and, if they are not the author(s) of the reproduced material, it is recommended that permission of the author(s) also be sought.

All articles accepted for publication become the exclusive copyright of the New Zealand Veterinary Association Inc. (the Publisher), including the right to reproduce the article in all forms and media.

Misconduct

Research misconduct generally refers to mistreatment of research subjects, falsification and fabrication of data, piracy and plagiarism. It does not include honest error or differences of opinion. Authors may not use their own, previously published work without appropriate citation.

Please note that the *New Zealand Veterinary Journal* uses CrossCheck™ software to screen papers for unoriginal material. By submitting your paper you are agreeing to any necessary originality checks your paper may have to undergo during the peer-review and production processes.

Authors suspected of misconduct of any form at any time during the publication process will be alerted and given the opportunity to provide a satisfactory answer. If an author is not able to provide a satisfactory answer their manuscript will be withdrawn and their institution may be notified of the accusation. They may also be prohibited from publishing future work in the *Journal* for a period of time.

Disclaimer

The *New Zealand Veterinary Journal* is published by the New Zealand Veterinary Association Incorporated (NZVA). Authors are advised that views expressed in the *Journal* do not necessarily represent those of the NZVA or the editors, and neither the NZVA nor the editors endorse any products or services advertised. The NZVA is not the source of the information reproduced in the *Journal* and does not independently verify the truth of the information. It does not accept any legal responsibility for the truth or accuracy of the information contained therein. Neither the NZVA nor the editors accept any liability whatsoever for the contents of the *Journal* or for any consequences which may result from the use of any information contained therein or advice given therein. This provision is intended to exclude the NZVA, the editors, its staff and contractors from all liability whatsoever, including liability for negligence in the publication or reproduction of the materials set out therein.

Peer review

All articles submitted for publication will be independently refereed regardless of source. Referees are selected by the Editorial Board, and may or may not in-

clude individuals nominated by authors. Referees will remain anonymous, unless both the referee and the Editor agree otherwise, and are obliged to keep all unpublished information confidential. Referees are asked to state explicitly whether or not any conflicts of interest that could bias their opinions of the manuscript exist, and to disqualify themselves from reviewing specific manuscripts if they believe it to be appropriate.

The final decision concerning acceptability of a manuscript is the responsibility of the Editor. Failure to comply with *Journal* policy at any stage is grounds for rejection.

Submission of manuscripts

Authors should submit their manuscripts online to <http://mc.manuscriptcentral.com/tnzv>. All submissions must include an electronic version of the manuscript text (as a MS Word document), and figures (formatted as directed below). Please do not try to upload PDF files of your text. The system will automatically convert your files to a PDF proof.

Authors will be guided step-by-step through uploading files directly from their computers

Preparation of manuscripts

Authors are urged to consult a recent issue of the *Journal* and follow the style therein as closely as possible. Manuscripts must be written in English of a high standard and are expected to have been peer-reviewed for scientific content and correctness of language and presentation prior to submission. Manuscripts that conform poorly with editorial requirements and the format of the *Journal* may be returned without review.

For submissions where the quality of English is assessed as sub-standard, i.e. requiring additional editorial input, authors will be given the option of enlisting the assistance of a professional editor proficient in English.

Classes of articles

General Scientific Articles report new and substantial contributions to veterinary science based on original research. They have the format: Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements and References.

Short Communications are vehicles for valuable but limited or preliminary observations. They generally have the same format as General Scientific Articles but are limited to 3,500 words and a maximum of 4 figures/tables.

Clinical Communications report novel observations from clinical practice. Single case reports will only be considered for publication when of real novelty or potential significance, e.g. a novel putative infectious disease. The format may include Abstract, Introduction, Case History, Clinical Findings, Discussion, Acknowledgements and References. They are limited to 4,500 words and a maximum of 4 tables/figures, unless otherwise agreed at the time of submission.

Rapid Communications may be preliminary in nature, and report information of pressing importance. At the discretion of the Editorial Board, these will be published as soon as possible following peer review and should follow the format of General Scientific Articles.

Review Articles provide expert summaries of current knowledge in a particular field and provide new ideas. They should not just be a review of the literature. They have no set format. Authors should consult the Editor before embarking on a review. Submissions of review articles longer than 10,000 words, including references, will not be accepted without prior consultation and approval from the Editor.

Correspondence contains no headings, but may be followed by a short list of references. Correspondence of a scientific nature should follow the usual sequence for scientific articles, and normally contain no more than one table or illustration.

Journal layout

Manuscripts should be printed double-spaced throughout, on one side only of A4 paper, with at least 2-cm margins on all sides. Number all pages consecutively, and every line in the left margin of each page, continuously.

Headings and sub-headings should be typed on separate lines and are not followed by stops. Headings (e.g. "Materials and methods") should be centred and bold. Only the first letter of headings and sub-headings is capitalised. Primary sub-headings (e.g. "Experimental design") should be left-justified and bold; secondary sub-headings are left-justified and italicised. Do not use underlining and do not number sub-headings or itemised lists.

Format

Titles should be short, specific and informative. Only the first letter is capitalised. Do not use trade names or abbreviations in the title.

Authors' names and addresses. Use initials (without stops) and surnames only, separated by commas. The superscript symbols (*†‡§¶, in that order) should be used after each author's name to identify their full postal address and the author for correspondence (§) in footnotes at the bottom of the first page. The same symbol should be used for authors from the same address, e.g. AB Smith[§], CD Jones^{*} and EF Harris[†]

Abstracts should contain the following internal sub-headings for scientific articles and short communications: Aims, Methods, Results, Conclusions, Clinical Relevance (where appropriate), and Key Words; for clinical communications use: Case History, Clinical Findings, Diagnosis, Clinical Relevance, and Key Words. Abstracts should be no more than 400 words in length, brief and informative when read in isolation from the article, include the main results and conclusions of the study, and should not contain abbreviations unless these are defined in the Abstract itself. All non-standard abbreviations should be listed after the Abstract.

Introduction. This should set the study in context by briefly reviewing relevant knowledge, and must contain a clear and concise statement of the study's aims.

Materials and Methods should contain sufficient detail to allow others to repeat the study. For studies that involve the experimental use of humans or animals, include a statement to the effect that all procedures involving the experimental use of animals were approved by the (registered name) Animal Ethics Committee (city, country).

The generic name, dose and route of administration should be given for drugs, and the manufacturer's name and location (city, state, and country) of drugs, reagents

and specialised equipment used should be stated in parentheses on first reference. Thereafter, only generic names should be used. Details of all statistical methods used must be given at the end of this section under the sub-heading “Statistical analysis”, and should include adequate detail to allow readers to determine precisely how data have been analysed and presented. See below for Statistical guidelines.

Results should be presented concisely and logically without discussion or reference to other work. Data presented in tables and figures should not be repeated in text. Actual probability values should be given, to 2 or 3 decimal places, wherever possible (e.g. “ $p=0.011$ ” rather than “ $p<0.05$ ”) except where $p<0.001$.

Discussion should evaluate and interpret the results and relate these to the results and interpretations of other relevant studies. Do not repeat or present new results in this section. Care should be taken to develop the Discussion in a logical and concise manner, and it should end with a statement of conclusions and brief summary of the clinical relevance of your findings, wherever applicable.

Acknowledgements should be brief, and only include people who have made a direct contribution or provided material or financial support. All sources of funding for the submitted research must be stated.

Journal style

Style and spelling follow the New Zealand *Style Book* (available from GP Publications, Wellington, NZ) and the *Concise Oxford Dictionary*, except that the verbal suffix “-ise” is used, not “-ize”.

Numbers <10 are written as words, unless followed by an abbreviation or unit of measure. Numbers >9 are generally printed as numerals unless at the beginning of a sentence. A decimal point must always be preceded by a numeral, e.g. “0.5”, not “.5”; do not use a comma, i.e. not “0,5”.

Quantities. All measurements should be reported in SI units or their decimal multiples, unless it is normal practice in a discipline to use derivatives, e.g. the international unit and the curie. The New Zealand Standard 6501 (available from Standards New Zealand at: www.standards.co.nz), contains the recommended units of measure.

Dates take the form “25 August 2000” in the text, but they may be abbreviated in tables and figures. Use the 24-hour clock for times of day. When used as units, spell in full hours, minutes and seconds.

Nomenclature. Manuscripts should conform to internationally recognised codes of nomenclature (e.g. the *International Code of Zoological Nomenclature*, *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Botanical Nomenclature*). All botica should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals. Generic and specific names should be italicised. Names of organisms should be given in full when used in the Title and when first used in the Abstract or text; after first use, generic names should be abbreviated as far as possible without causing confusion.

Footnotes (other than for authors’ addresses on the title page) should be used to (a) indicate the address of people cited as personal communications; and (b) to elaborate abbreviations and headings in tables.

Abbreviations. The following abbreviations may be used without definition in the *Journal*. In addition, all chemical elements, common chemical formulae, SI and units of measure used with a value should be used without definition. Abbreviations are generally not permitted in the Title. Plural abbreviations do not require “s”.

cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
cfu	Colony forming units
cRNA	Complementary ribonucleic acid
DM	Dry matter
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNase	Deoxyribonuclease
EDTA	Ethylene diamino tetra-acetate
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
epg	Eggs per gram of faeces
H&E	Haematoxylin and eosin
Ig	Immunoglobulin
I/M	Intramuscular(ly)
I/V	Intravenous(ly)
kb	Kilobyte(s)
LD ₅₀	Dose killing 50% of exposed population
mRNA	Messenger ribonucleic acid
PCR	Polymerase chain reaction
PAGE	Pulsed-field gel electrophoresis
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuclease
rpm	Revolutions per minute
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid
S/C	Subcutaneous(ly)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane

Statistical terms

ANOVA	Analysis of variance
CI	Confidence interval(s)
CV	Coefficient(s) of variation
df	Degree(s) of freedom
GLM	Generalised linear model
LSD	Least significant difference
LSM	Least squares means
n	Number of samples
OR	Odds ratio
r	Correlation coefficient
R ²	Coefficient of determination
RR	Relative risk
SD	Standard deviation
SE	Standard error
SED	Standard error of the difference
SEM	Standard error of the mean
χ^2	Chi-squared

The use of other abbreviations should be limited as much as possible. They should not be used if they are in any way ambiguous. Non-standard abbreviations should be listed after the Abstract, and their meaning must be clearly evident or explained when they are first introduced. For international units, “IU” should be used; “U” should be used for enzyme activity. Units of length, weight and volume should be given in lower case (e.g. kg, mg/L). Abbreviations for chemical elements, SI units, contractions and suspensions in common use (including country names such as USA, UK and NZ, but excluding “e.g.” and “i.e.”) are not followed by stops; other suspensions generally are (e.g. pers. comm.). The abbreviations “e.g.” and “i.e.” are not italicised but “*et al.*”, “*ad libitum*” “*in vivo*”, “*in vitro*” are.

References

The accuracy of references is the responsibility of authors, and references must be verified against the original article. Please ensure that all articles cited in the text are included in the References list and *vice versa*. In the text, citations should be listed in parentheses in chronological order, citing authors' names, and using "*et al.*" after the first author's name where there are more than two, e.g. (Jones 1994; Smith and Jones 1996; Smith *et al.* 2000). When listing more than one publication by the same author just list the years of publication e.g., (Tasker *et al.* 2003b, 2006a, 2009b) or (Tasker *et al.* 2006ab). In general, no more than three citations should be included after a statement.

In the References list, references must be in alphabetical order of the first author and include the names of all authors, except if there are more than 10 author names then put "*et al.*" after the 10th author and delete the remaining names. When no author is given, use the term "Anonymous" in both text and References list. References with the same first author should be listed in the order: a) single author; b) two authors alphabetically according to the name of the second author; c) three or more authors, chronologically. The letters a, b, c, etc. should be appended to the year for papers published by the same author(s) in the same year.

Authors' names should be in bold, with no stops between initials. Journal titles and names of books should be in italics, in full (not abbreviated). Do not use stops after the year.

Use the following examples as a guide:

For journal articles:

Pomroy WE, Charleston WAG, West DM. Failure of young goats to acquire resistance to *Haemonchus contortus* in paddock grazing situations. *New Zealand Veterinary Journal* 37, 23–6, 1989

For preprint articles with a digital object identifier:

Kenyon PR, Morel PCH, Morris ST, West DM. A note on the effect of vasectomised rams and short-term exposures to entire rams prior to the breeding period on the reproductive performance of ewe lambs. *Applied Animal Behaviour Science* doi:10.1016/j.applanim.2007.04.006, 2007

For chapters in a book or an occasional proceedings:

Weinstein L, Swartz MN. Pathogenic properties of invading microorganisms. In: Sodeman WA Jr, Sodeman WA (eds). *Pathogenic Physiology: Mechanisms of Disease*. Pp 457–72. WB Saunders, Philadelphia, USA, 1974

For articles in proceedings published in a regular series:

Hanlon DW. Reproductive problems in the postpartum cow. *Proceedings of the 15th Annual Seminar of the Society of Dairy Cattle Veterinarians of the New Zealand Veterinary Association*. Pp 209–17, 1998

Ellison RS. Trace elements in deer. *Proceedings of a Deer Course for Veterinarians, No. 12, Deer Branch of the New Zealand Veterinary Association*. Pp 57–68, 1995

Xu ZZ, Burton LJ. Reproductive efficiency in lactating dairy cows. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 56, 34–7, 1996

For theses:

McDougall S. Postpartum anoestrus in the New Zealand dairy cow. *PhD thesis*, Massey University, Palmerston North, NZ, 1994

For government acts:

***Anonymous.** *Animal Welfare Act 1999*. New Zealand Government Printer, Wellington, New Zealand, 1999

Citation of non-peer-reviewed references, e.g. Anonymous, conference proceedings, text books, theses, is discouraged but not precluded. Authors are specifically discouraged from citing their own publications in non-peer-reviewed sources; such data should be cited as "unpublished" or original data presented. Referees are specifically requested to scrutinise the use of non-peer-reviewed references and make recommendations regarding alternatives or omission.

If non-peer-reviewed references are cited, these should be less than two years old and clearly distinguished as such in the text by qualifying statements such as "preliminary data" or "non-peer-reviewed reports...etc". In the References list, non-peer-reviewed articles should be preceded by an asterisk before the first author's name, e.g.

***Loth L, Stone M.** Weaner pig mortality rates on New Zealand farms affected by PMWS. *Surveillance* 32 (1), 3–6, 2005

Reference to material on a website is to be avoided in general, unless it is essential to your argument, and providing it does not exist in a printed or published form, in which case it should be cited as a reference in the References list. When referencing a website, the data provided must be substantiated, and you should be personally satisfied that the data are defensible. Please provide the full title of the work, its full URL so that the exact information being referred to can be accessed, last date of accession, and the name of the organisation publishing the website. The authors' names should be provided wherever possible, else listed as Anonymous, e.g.

***Anonymous.** *New Zealand Dairy Statistics 2008-09*. http://www.lic.co.nz/pdf/dairy_stats/DAIRY_STATISTICS_08-09.pdf (accessed 02 November 2010). LIC and DairyNZ, Hamilton, NZ, 2009

Avoid using abstracts as references, and do not use "unpublished data" or "personal communications" unless they exist in written form. If they do, they may be referred to in the text, but must not appear in the References list. A pers. comm. should be a numbered footnote including the author's initials and last name, followed by workplace name, city and country.

References to papers which have been accepted but not published should be cited as "in press", whereas papers which have been submitted but not accepted should be referred to as "unpublished data".

Tables

Tabular material should be kept to a minimum and printed on separate pages after the References. Information in tables must not be repeated in the text. Tables must be numbered consecutively (Arabic numbers) in the order they are referred to, and be understandable without reference to the text. The title should be a single sentence typed at the head of the table; additional explanatory information including non-standard abbreviations should appear as alphabetically ordered footnotes ^a ^b cross-referenced to the column entries. If using superscript letters to denote significant differences between means, use ^{x y z} and elaborate these in footnotes.

Tables should be constructed using the Table function of a word processor or spreadsheet (MS Word or Excel preferred), with each entry in a separate cell; avoid using tabs or line breaks within cells. Do not use vertical lines.

Use horizontal lines to separate the table from the title and footnotes, and column headings from data. Only the first letter of column or row headings should be capitalised. Unit descriptors should be placed under each column heading in parentheses and chosen to minimise the number of digits in each column. Report zero values as “0”, and any values not tested as “NT”, and identify the statistical measure(s) of variation used in either the title or footnotes.

Figures

Figures should be submitted in the highest quality format possible. Failure to comply with the following instructions will result in figures being returned to authors and publication being delayed.

No specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or colour balance are acceptable if they are applied to the whole image and as long as they do not obscure, eliminate, or misrepresent any information present in the original. Any digital manipulation must be mentioned in the figure legend. The author(s) must also state in the covering letter that the scientific content of the image has not been altered.

Figures should be placed at the end of the manuscript on separate pages and numbered consecutively using Arabic numerals in the order they are described in the text (e.g. “Figure 1”). Figure captions should be listed on a separate page containing an explanation of all markers, lines and symbols used (i.e. the key), as well as all abbreviations. Each caption should contain sufficient information that it stands alone from the text. Authors should consult a recent issue of the *Journal* for examples of the presentation of Figures.

Figure size. Figures should be constructed exactly as the authors want them reproduced, at the final size for publication, e.g. single column width (88 mm) or double column width (185 mm).

Font size and line thickness as described below apply to the Figure at final publication size. Do not include a box around, or gridlines within the Figure.

Font size. The font for all text within the figure and axis labels should be sans-serif type (e.g. Arial) 7 point.

Line thickness. The thickness of all lines including axes, tick marks, whiskers, and connecting lines between datapoints should be 0.2 mm (0.57 point)

Axis labels. Tick marks should face outwards, and titles for axes should run parallel to their axes, left to right and bottom to top, using capital letters for the first word only. State the value being measured, followed by its appropriate SI unit in parentheses, e.g. “Liveweight (kg)”

Symbols and shading. For line graphs the preferred symbols are ○ ● □ ■ ▲. If more symbols are required, ensure their shape is different enough that they are still distinct enough when overlapping occurs. Lines should not be visible within symbols or bars. For bar graphs use white, then black, then grey shading as either 10%, 30% or 50%. Avoid the use of three-dimensional bar charts.

Photomicrographs, X-rays, photographs. Bar scales should be used on photographs and diagrams; magnifications should only be stated for electron photomicrographs. The thickness of lines for bars (depicting scale) or for arrows should be 0.53 mm (1.5 point) at the final size the figure will be reproduced (e.g. single column width, as above). Any lettering or numbers within a pho-

tomicrograph, X-ray or photograph should be lower case sans-serif type (e.g. Arial) 10 point. If figures require cropping or reorienting, this must be done prior to submission.

File formats. Figures should be saved as high-resolution files, either EPS or TIFF, with a minimum resolution of 300–600 dpi. Most graphic applications allow files to be saved as EPS files. However, a PostScript printer driver may need to be installed to do this. The file can then be saved using the ‘print to file’ option. PDF files may be acceptable, but only if generated from a digital source, i.e. graphic software, NOT an image or scanned image. See also:

<http://journalauthors.tandf.co.uk/preparation/artwork.asp>. Files from MS Excel or MS Powerpoint are not acceptable.

Each figure, including each part of a figure, e.g. Figure 1a, Figure 1b, should be saved as a separate file, but do not add the labels (a, b, etc) to the figure. Each figure should preferably not exceed 10 MB per individual file.

Authors are required to pay the cost of reproducing colour drawings and photographs at a cost of \$NZ540 per page. Please indicate on submission if you require colour reproduction.

Supplementary Information

Supplementary information (SI) is non peer-reviewed material directly relevant to the conclusion of a paper that cannot be included in the printed version for reasons of space. SI is posted online with the article at the time of publication, generally as a single PDF. It must be related to and add to the content of the article. Categories of SI may include: supplementary figure(s) and legend(s); supplementary methods; supplementary table(s); supplementary equation(s); supplementary data, supplementary videos or audio.

Supplementary information should be submitted at the same time as the manuscript and will be subject to peer-review and editorial scrutiny. SI is not copy-edited so authors should ensure that it is clearly and succinctly presented, and that the style conforms with the rest of the paper. Authors are responsible for the accuracy and content of all SI. Inclusion of SI is at the discretion of the Editor.

Supplementary tables and figures must have a separate numbering system from that used for tables and figures in the print version e.g. “Supplementary Figure 1”. Each piece of SI should be referred to in the print version of the paper at an appropriate point in the text.

Supplementary videos can be submitted as PAL or NTSC format, with a size of 320x240 (PAL) or 360x240 (NTSC). Audios can be submitted as MP4 (h.264) or WMV formats with a maximum file size of 30 MB.

Statistical guidelines

Aims

Clearly state the aims, objectives or hypotheses tested in the Abstract and at the end of the Introduction.

Materials and methods

The following must be clearly described:

Selection of subjects. For experiments or field trials, the source and number of subjects (animals, groups, farms) in the study, the process for their selection and specific

criteria for inclusion/exclusion must be stated. Indicate procedures used to determine sample size, preferably considering both the power of the study and level of statistical significance in relation to anticipated biological outcomes.

Surveys. Indicate design (retrospective, cross-sectional, etc), definition of target and sample populations, sampling methods used, and evidence that the sample population is representative of the target population. Where relevant, describe measures taken to maximise the rate of participation, and validation procedures. A copy of the questionnaire should be provided as Supplementary Information (see above).

Allocation to treatments. Describe the method of randomisation used to allocate subjects to treatment groups. If stratification, blocking, or matching are involved, these should be clearly described and considered in the analysis and results.

Statistical analysis

Describe statistical methods used in a sub-section of Materials and Methods headed 'Statistical analysis'.

Analytical methods should be appropriate for the design of the study, and the unit of analysis (e.g. individual animal, group, farm, etc) and outcome variables stated unambiguously. When several analytical methods are used, clearly state where each method was applied. Two-sided tests are to be used unless a strong argument is presented to justify a one-sided test. Complex procedures should be explained in detail or referenced.

Details of software packages used should be identified by name, version and supplier, e.g. R v2.9.1 (R Development Core Team, 2009; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria), SAS v9.1 (SAS Institute Inc., Cary NC, USA 2003, IBM SPSS Statistics v. 19 (IBM Corporation, Software Group, Somers, NY, USA).

Assumptions. Many statistical methods have implicit assumptions (distribution of data, independence of observations, etc). Data should be tested to ensure these assumptions are met. If transformation of data is used to meet the assumptions of a statistical method it should be verified that the required effect has been achieved.

Lack of independence. If measurements are not independent (e.g. repeated measures, animals clustered in pens or flocks), appropriate measures should be taken to account for clustering. Possible correlation between outcome measurements, and co-linearity between explanatory variables in observational studies should be evaluated.

Extreme data points. Observations that are inconsistent with the overall data ('outliers') should not be excluded without clear justification, and any omissions should be documented.

Presentation

All items referred to in Materials and Methods should be presented in Results and *vice versa*.

Descriptive statistics. Measures of central tendency (e.g. mean, median) must be accompanied by measures of variation among individuals (e.g. SD, inter-quartile range) or precision for population estimates (e.g. SEM). For ordered qualitative data that do not approximate to a continuous linear measure, the use of means and SE or SD is invalid, and proportions should be stated. CI must be presented for population parameters, and estimates of effect such as OR and RR. For comparative studies, CI

for observed differences should be reported rather than separate CI for each comparison group.

Format. Use the following format: e.g. mean 14.2 (SD 7.4) or mean 14.2 (SEM 1.9) rather than 14.2 ± 7.4 . For CI use e.g. mean 14.2 (95% CI=10.2–18.3), OR=0.74 (95% CI= 0.57–0.96), and for range use e.g. median 6 (min 1, max 15).

Probability values are given in the form "p=0.003" (lower case, no spaces, to 2 or 3 decimal places only).

Numerical precision. Numerical results should be presented with appropriate precision. Means should not be presented to more than one decimal place more than the raw data. Percentages should not be presented with decimal places unless $n > 100$, and should always indicate the denominator.

Hypothesis tests. Exact p-values should be reported to two or three decimal places when between 0.01 and 0.05, and to three decimal places when between 0.010 and 0.001. P-values < 0.001 should be reported as such. Avoid over-emphasis on p-values to dichotomise significant results. Interpretation of hypothesis tests should consider study power, type-1 error rate (e.g. 0.05), sample size, the size of the effect with CI and biological significance. Biologically meaningful effects may not be statistically significant if sample size is small. Estimation of the size of the effect (with CI) can be helpful in interpretation of test results, particularly if the reported p-value exceeds the defined threshold. Multiple comparisons require the use of an appropriate adjustment to control type-1 error.

Post-hoc power analysis may be helpful in some studies. P-values from *post-hoc* analyses or modelling of multiple explanatory variables, e.g. in epidemiological studies of risk factors, should be considered as exploratory and not equivalent to tests of pre-specified hypotheses.

Proofs and reprints

Proofs

A typeset copy of each article will be sent to the corresponding author for proof-reading. Authors must proof-read and return the article to the production editor within the specified time, or else the Scientific Editor reserves the right to proof-read the article on an "all care, no responsibility" basis and continue with its publication. Subject to final acceptance, papers are taken to be complete on their arrival at the editorial office, and alterations to the text other than the correction of minor errors at the time of proof-reading may not be accepted. Neither the Editor nor the Publisher accept any responsibility for printed errors which are not noted by authors at the time of proof-reading.

Reprints

Authors can distribute free access to an electronic version of their article to 50 friends, colleagues, or contacts following publication. Article reprints can be ordered through Rightslink® when you receive your proofs. If you have any queries about reprints, please contact the Taylor & Francis Author Services team at reprints@tandf.co.uk.

Article Type [*Article - Times New Roman, Font 13pt, Bold, Italics, Left justified*]

Manuscript title [Title - Arial 14 bold, centred]

FA Author^{*§}, S-B Author[†], T Author[‡] and F Author Jr^{#¥} [Authors - Times New Roman 13, bold, centred]

^{*}Department, Institution, Place (e.g. Street, Building, PO Box, City, State), Country

[†]Department, Institution, Place (e.g. Street, Building, PO Box, City, State), Country

[‡]Department, Institution, Place (e.g. Street, Building, PO Box, City, State), Country

[#] Department, Institution, Place (e.g. Street, Building, PO Box, City, State), Country

[¥]Current address: Department, Institution, Place (e.g. Street, Building, PO Box, City, State), Country
(For any author whose present address differs from that at which the work was done)

[§]Author for correspondence. Email: firstname.familyname@company.com

[Normal - Times New Roman 12, single line spacing, left justified]

Abstract

[Heading 1 - Times New Roman 13 bold, centred, line spacing 1.5, space after 9pt]

AIMS: Text [Times New Roman 12, left justified, line spacing 1.5, space after 9pt]

METHODS:

RESULTS:

CONCLUSIONS:

CLINICAL RELEVANCE: (where relevant)

KEY WORDS: Key word 1, key word 2, key word 3, key word 4, key word 5

5-6 of the most important words or phrases. Abstract should not exceed 400 words, including Key Words. Define abbreviations in the text.

ABB

Abbreviation

Introduction

[Heading 1 - Times New Roman 13 bold, centred, line spacing 1.5, space after 9pt]

Text [Times New Roman 12, left justified, line spacing 1.5, space after 9pt]

Materials and Methods

[Heading 1 - Times New Roman 13 bold, centred, line spacing 1.5, space after 9pt]

Text [Times New Roman 12, left justified, line spacing 1.5, space after 9pt]

Heading 2 [Arial 11 bold, left justified, space before and after 9pt]

Text [Times New Roman 12, left justified, line spacing 1.5, space after 9pt]

Heading 3 [Times New Roman 12, Italics, keep with next, 9pt after].

Text [Times New Roman 12, left justified, line spacing 1.5, space after 9pt]

Results

[Heading 1 - Times New Roman 13 bold, centred, line spacing 1.5, space after 9pt]

Text [Times New Roman 12, left justified, line spacing 1.5, space after 9pt]

Heading 2 [Arial 11 bold, left justified, space before and after 9pt]

Text [Times New Roman 12, left justified, line spacing 1.5, space after 9pt]

Heading 3 [Times New Roman 12, Italics, keep with next, 9py after].

Text [Times New Roman 12, left justified, line spacing 1.5, space after 9pt]

Discussion

[Heading 1 - Times New Roman 13 bold, centred, line spacing 1.5, space after 9pt]

Text [Times New Roman 12, left justified, line spacing 1.5, space after 9pt]

Heading 2 [Arial 11 bold, left justified, space before and after 9pt]

Text [Times New Roman 12, left justified, line spacing 1.5, space after 9pt]

Heading 3 [Times New Roman 12, Italics, keep with next, 9pt after].

Text [Times New Roman 12, left justified, line spacing 1.5, space after 9pt]

Acknowledgements

[Heading 1 - Times New Roman 13 bold, centred, line spacing 1.5, space after 9pt]

Text [Times New Roman 12, left justified, line spacing 1.5, space after 9pt]

References

[Heading 1 - Times New Roman 13 bold, centred, line spacing 1.5, space after 9pt]

[Times New Roman 12, Indent: left 0cm, Hanging 0.7cm, Left justified, Line spacing 1.5, 10pt after]

Author AB. Title of article. *Full Name of the Journal* volume number, first page–last page numbers, year

Author same, Author B, Author CD, Author E. Title of article. *Full Name of the Journal* volume number, first page–last page numbers, same year a

Author same, Author B, Author CD, Author E. Title of article. *Full Name of the Journal*
volume number, first page–last page numbers, same year b

Author C, Author B, Author AD, Author E. *Title of Book*. Publisher name, place of
publication (i.e. city, state (if applicable) and country), year

Author 1, Author 2, Author 3,.... Author 10, et al. Title of article. *Full Name of the Journal*
volume number, first page–last page numbers, year

Author C, Author B, Author AD, Author E. Title of communication. In: Author A, Author
BC, Author D (eds). *Name of the Meeting or Symposium*. Pp first page–last page.
Publisher name, place of publication (i.e. city, state (if applicable) and country), year

Author A, Author D. Chapter title. In: Editor AB, Editor CD (eds). *Book Title*. 2nd Edtn. Pp
first page–last page numbers. Publisher name, place of publication (i.e. city, state (if
applicable) and country), year

Author A, Author N, Author CAB, Author M. Title of communication. *Proceedings of the
Conference Title*. Pp first page–last page numbers or poster/article number, year

Author M, Author J, Author PE, Author D. *Document title*. Full URL of website (accessed
Day Month Year). Company, City, Country, Year

Author M. Title of thesis. *Type of thesis*, University with English name, location of the
University (i.e. city, state (if applicable) and country), year

Table 1. [Arial 11 bold, left justified, single line spacing] Effect of x and y on z in w;
tables should be sufficiently detailed for being understood without any reference to
the text; each entry should be in a separate cell, do not use hard returns or spaces to
separate entries. Data can be separated by using blank rows or columns.

Spanner heading [Arial 9pt]					
Stub heading	Spanner heading ^a		Spanner heading		
	Column heading 1 ^b	ColH2	ColH3	ColH4	ColH5
Row heading (units)					
Row subheading					
Row sub-subheading	Value	Value	Value	Value	Value
Row sub-subheading	Value	Value	Value	Value	Value
Row subheading					
Row sub-subheading	Value	Value	Value	Value	Value

Row sub-subheading	Value ^x	Value ^{xy}	Value ^{yz}	Value ^z	Value
Row heading ^c	Value	Value	Value	Value	Value
Row heading	Value	Value	Value	Value	Value
Row heading	Value	Value	Value	Value	Value

ColH2=Column heading 2; ColH3=Column heading 3; ColH4=Column heading 4; ColH5=Column heading 5

^a Footnote explaining spanner heading.

^b Footnote explaining column heading 1.

^c Footnote explaining row heading.

^{xyz} Values within a row with different superscripts differ (p<0.05)

[Footnotes – Arial 9pt, single spacing, left justified]

Figure 1. [Arial 11 bold, left justified, single line spacing] All figure captions are listed on a separate sheet at the end of the manuscript and should be sufficiently detailed to allow figures to be understood without any reference to the text. They should contain an explanation of all markers, lines and symbols used (i.e. the key), as well as all abbreviations.

Figures

Each figure, including each part of a figure, e.g. Figure 1a, Figure 1b, should be saved as a separate file, but do not add the labels (a, b, etc.) to the figure. Each figure should preferably not exceed 10 MB per individual file.

Figures should be submitted in the highest quality format possible. Failure to comply with the following instructions will result in figures being returned to authors and publication being delayed.

File formats. Figures should be saved as high-resolution files, either EPS or TIFF or JPG, with a minimum resolution of 300–600 dpi. PDF files may be acceptable, but only if generated from a digital source, i.e. graphic software, NOT an image or scanned image. MS Excel and MS PowerPoint files are permitted, provided that figures have been originally created in these formats and that all embedded images are at a suitable resolution. If any doubt, submit the source files that were used to create your figures.

Figure size. Figures should be constructed exactly as the authors want them reproduced, at the final size for publication, e.g. single column width (88 mm) or double column width (185 mm). Font size and line thickness as described below apply to the Figure at final publication size. Do not include a box around, or gridlines within the Figure.

Font size. The font for all text within the figure and axis labels should be sans-serif type (e.g. Arial) 7 point.

Line thickness. The thickness of all lines including axes, tick marks, whiskers, and connecting lines between datapoints should be 0.2 mm (0.57 point)

Axis labels. Tick marks should face outwards, and titles for axes should run parallel to their axes, left to right and bottom to top, using capital letters for the first word only. State the value being measured, followed by its appropriate SI unit in parentheses, e.g. “Liveweight (kg)”

Symbols and shading. For line graphs the preferred symbols are ○ ● □ ■ △ ▲. If more symbols are required, ensure their shape is different enough that they are still distinct enough when overlapping occurs. Lines should not be visible within symbols or bars. For bar graphs use white, then black, then grey shading as either 10%, 30% or 50%. Avoid the use of three-dimensional bar charts.

Photomicrographs, X-rays, photographs. Bar scales should be used on photographs and diagrams; magnifications should only be stated for electron photomicrographs. The thickness of lines for bars (depicting scale) or for arrows should be 0.53 mm (1.5 point) at the final size the figure will be reproduced (e.g. single column width, as above). Any lettering or numbers within a photomicrograph, X-ray or photograph should be lower case sans-serif type (e.g. Arial) 10 point. If figures require cropping or reorienting, this must be done prior to submission.