

Hipomagnesemia subclínica em vacas leiteiras durante o período de transição: ocorrências hormonais e metabólicas*

Subclinic hypomagnesemia in dairy cows during transition period: hormonal and metabolic events

Eduardo Schmitt,** Rubens Alves Pereira,** Dustin André Chaves Hoffmann,** Lúcio Vendramin,** Márcio Erpen Lima,** Tiago dos Santos Farofa,** Mateus Silveira Lopes,** Paula Montagner,** Marcio Nunes Corrêa,** Francisco Augusto Burkert Del Pino**

Resumo

O objetivo, com este estudo, foi investigar as consequências da hipomagnesemia subclínica sobre parâmetros metabólicos de vacas leiteiras. Amostras de sangue foram coletadas de 12 animais, a cada dois dias, entre os dias 22 pré e 22 pós-parto, para a realização de análises sanguíneas e determinação do perfil metabólico. Os animais foram categorizados de acordo com os níveis séricos de magnésio: *Grupo Hipomagnesêmicas* (n=5), com níveis abaixo de 1,8 mg/dL em ao menos dois dias consecutivos, e o *Grupo Controle* (n=7), com níveis acima de 1,8 mg/dL em todo o período. O grupo hipomagnesêmicas apresentou níveis de glucagon maiores nos dias 10, 18 e 20, e a taxa Glucagon/Insulina foi maior nos dias 6, 8, 10, 12 e 16 após o parto. As concentrações de aspartato amino transferase foram maiores no grupo hipomagnesêmicas nos dias 0, 6, 8, 10, 12 e 14 pós-parto. Os resultados indicaram que níveis reduzidos de magnésio no periparto podem estar relacionados com níveis elevados de aspartato amino transferase e de glucagon. Em geral, a hipomagnesemia subclínica não altera os níveis dos indicadores do metabolismo energético, mas os resultados demonstraram que as vacas com hipomagnesemia apresentaram maior taxa de glucagon/insulina, demonstrando um maior desafio para manter os níveis glicêmicos.

Palavras-chave: magnésio, metabolismo mineral, periparto, produção leiteira.

Abstract

The objective, with this study, was to investigate the consequences of subclinical hypomagnesemia on the metabolic parameters of dairy cows. Blood samples were collected from 12 animals every two days, between -22 pre and 22 days postpartum, for blood analysis and determining the metabolic profile. The animals were grouped according to magnesium blood concentrations: Hypomagnesemia group (n=5), with blood levels below 1.8 mg/dL in at least two consecutive days, and Control group (n=7), with blood levels above 1.8 mg/dL during the period. The hypomagnesemia group had higher levels of glucagon on days 10, 18 and 20 as well as glucagon/insulin ratio was higher on 6, 8, 10, 12 and 16 days after calving. The blood concentrations of aspartate aminotransferase in the hypomagnesemia group were higher during days 0, 6, 8, 10, 12 and 14 after calving. The results indicate that the low blood levels of magnesium during peripartum may be associated with elevated levels of aspartate amino transferase and glucagon in the blood. In general, subclinical hypomagnesemia does not alter the levels of indicators of energy metabolism, but the results show that cows with hypomagnesemia have a higher rate of glucagon/insulin, demonstrating a greater challenge to maintain glucose blood concentration.

Keywords: magnesium, milk production, mineral metabolism, peripartum.

Introdução

O período do periparto em vacas leiteiras tem sido alvo de muitas pesquisas, relacionando fatores endócrinos e metabólicos com o equilíbrio energético (Mulligan et al., 2006). Os minerais estão presentes em diversas reações metabólicas, atuando principalmente como cofatores enzimáticos e participando da liberação de hormônios (Walz et al., 2007). A relação entre magnésio (Mg) e secreção de insulina já foi demonstrada por Matsunobu et al. (1990), quando ovelhas alimentadas com baixos níveis de Mg tiveram menor secreção de insulina durante o teste de tolerância à glicose. Além disso, o aumento nos níveis de Mg na urina foi observada em bezerras submetidas à infusão

de glucagon, estabelecendo uma relação entre o Mg e estes hormônios metabólicos (Madsen et al., 1976).

A hipomagnesemia subclínica pode predispor à hipocalcemia (Goff, 2008) e agravar o balanço energético negativo (BEN) (Goff, 2004). Já a hipomagnesemia clínica (incidência menor que 2%) pode levar à morte pela dificuldade de diagnóstico (Schneider et al., 2010). A suplementação de cálcio (Ca) e Mg após o parto pode aumentar a ingestão de matéria seca e amenizar o BEN (Weglicki, 2012).

Estudos em pacientes humanos diabéticos vêm demonstrando a relação Mg e secreção de insulina, em que a suplementação com Mg tem aumentado a sensibilidade à insulina (Mooren

*Recebido em 16 de dezembro de 2014 e aceito em 11 de agosto de 2016.

**Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, CEP: 96010-900, Pelotas, Rio Grande do Sul.

Autor para correspondência: rubens_ap@yahoo.com.br

et al., 2011). Este fato fica evidente pela maior incidência de cálculos renais em pacientes com tal síndrome metabólica, pois a resistência à insulina aumentaria a excreção renal de Ca e Mg (Jawerbaum & White, 2010). No passado, esse fato era tratado como uma consequência da hiperglicemia (McNair et al., 1978). Todavia, alguns estudos têm proposto que a insulina regularia o metabolismo do magnésio impedindo sua reabsorção renal, o que em casos de hiperinsulinemia crônica poderia causar hipomagnesemia (Barbagalo et al., 2003; Lee et al., 2006).

Existem poucos estudos sobre a interferência da hipomagnesemia no BEN de vacas leiteiras. Sabe-se que os casos subclínicos são fatores de risco para a hipocalcemia (Goff, 2008; Bhanugopan et al., 2010), e por isso está diretamente ligada ao agravamento do BEN (Goff, 2004).

Assim, sobre a hipótese que a hipomagnesemia agrave o balanço energético negativo, por influenciar a secreção e a ação da insulina, objetivou-se investigar as consequências da hipomagnesemia subclínica sobre o perfil metabólico e hormonal de vacas leiteiras.

Materiais e métodos

O experimento foi realizado em uma fazenda leiteira, localizada no sul do Rio Grande do Sul (31°48'13"S e 52°31'52"). Foram utilizadas nove vacas leiteiras da raça Jersey e três vacas oriundas do cruzamento das raças Jersey x Holandês. As vacas estavam entre a terceira e quarta lactação, com idade entre 5 e 7 anos de idade. As vacas foram admitidas no experimento no dia 28 pré-parto, sendo mantidas em pastejo contínuo numa área de oito hectares de *Brachiaria Decumbens*, com lotação de 2,4 UA por hectare e sal aniônico *ad libitum* (BCA pré-parto, Tortuga® Companhia Zootécnica Agrária - São Paulo, SP, Brasil). Após o parto, as vacas foram mantidas em pastejo rotacionado em *Panicum maximum cv. Aruana*. A cada 21 dias, eram realizados cortes amostrais ($\Delta = 50 \text{ cm}^2$; 17 repetições) na área de *B. Decumbens*, para a avaliação do porcentual de matéria seca e níveis de fibra bruta, proteína bruta, extrato etéreo e cinzas.

Entre os 22 dias do periparto (-22;+22), foram coletadas amostras de sangue a cada dois dias para a avaliação dos níveis de magnésio, cálcio, fósforo, cloretos, glicose, insulina, glucagon, ácidos graxos não esterificados (AGNE), aspartato amino transferase (AST) e gama glutariltransferase (GGT). Os resultados de magnésio foram utilizados para categorizar os animais em: grupo controle (CTL), animais que mantiveram os níveis séricos de magnésio igual ou superior a 1,8 mg/dL, e grupo hipomagnesêmicas (HIP), animais que apresentaram níveis de magnésio abaixo de 1,8 mg/dL em pelo menos duas coletas, caracterizando hipomagnesemia subclínica (Schneider et al., 2010). Amostras de urina foram coletadas para aferição do pH urinário utilizando pHmetro de bolso (PHTEK® pH100 - Curitiba, PR, Brasil).

As amostras de sangue foram obtidas por punção da veia coccígea, divididas em três tubos: um contendo anticoagulante (EDTA 10%) na proporção de 12 $\mu\text{L/mL}$ de sangue, o segundo com EDTA 10% e antiglicolítico (KF 12%) e o terceiro sem nenhuma solução. Imediatamente após a coleta, as amostras foram centrifugadas (1500 Xg por 15min) e divididas em três tubos e posteriormente congeladas a -18°C ou resfriadas a 4°C.

Os níveis plasmáticos de cálcio, magnésio, fósforo, cloretos, glicose, AST e GGT foram analisados por ensaios colorimétricos enzimáticos através de espectrofotômetro (FEMTO® 700 Plus, Femto Ind. e Com. de Instrumentos Ltda., São Paulo, Brasil). Os reagentes foram manipulados de acordo com as instruções do fabricante (Labtest®, Lagoa Santa, Brasil).

As análises de insulina (RI-13K®; Linco, St Louis, MO, USA) e glucagon (cat. # GL-32K®, MILLIPORE, Zug, Switzerland) foram determinadas por radioimunoensaio conforme metodologia descrita por Milles *et al.* (1965). Para insulina, o limite mínimo de detecção foi de 0,23 $\mu\text{UI/mL}$, e coeficiente de variação de 5,22% e 2,44%, para baixa e alta concentração de insulina, respectivamente. O glucagon tinha limite de detecção de 5,62 pg/mL e coeficiente de variação de 2,85% e 3,16%, para baixa e alta concentração, respectivamente. Para as análises de ácidos graxos não esterificados, utilizou-se o Kit HR Series NEFA-HR® (Wako NEFA-HR®, Wako Chemicals USA, Richmond, EUA), conforme metodologia descrita pelo fabricante. Os coeficientes de variação, tanto intra como interensaios, foram menores que 10%.

Os resultados foram analisados pelo método ANOVA, utilizando-se o Mixed Models do Software SAS® (2003). As variáveis categóricas foram o dia e grupo (CTL ou HIP), considerando o animal como efeito randômico. Os metabólitos analisados foram considerados como variáveis respostas. No pós-parto utilizou-se como covariável a produção leiteira, constituindo dois grupos durante o período experimental: menor ou maior que 13 litros/dia, no sentido de obter grupos homogêneos. As diferenças foram consideradas significativas quando o $P \leq 0,05$.

Todos os procedimentos experimentais deste projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal e pelo Conselho Coordenador do Ensino, da Pesquisa e de Extensão da UFPel (COCEPE: 5.05.01.038).

Resultados e discussões

Neste estudo, o grupo HIP foi composto por cinco vacas que apresentaram níveis séricos de magnésio < 1,8 mg/dL por mais de duas coletas, ou seja, duas vacas permaneceram mais que 60% do período experimental com $\text{Mg} < 1,8 \text{ mg/dL}$, enquanto as outras três vacas permaneceram de 30 a 45% do período experimental com níveis abaixo de 1,8 mg/dL (Tabela 1).

Tabela 1: Número de episódios e percentual de tempo que as vacas classificadas como hipomagnesêmicas permaneceram com níveis séricos de magnésio abaixo de 1,8mg/dL

Vacas	Episódios <1,8 mg/dL		% do Tempo Experimental
	Episódios Pré-parto	Episódios Pós-parto	
1	5	3	33,30%
4	5	4	37,50%
11	6	4	41,60%
3	9	6	62,50%
5	10	7	70,80%

As concentrações séricas de Mg no pré-parto foram maiores ($P=0,0025$) no grupo CTL ($2,12 \pm 0,04$ mg/dL) do que no grupo HIP ($1,85 \pm 0,04$ mg/dL). O mesmo foi observado no pós-parto, com valores médios de $2,00 \pm 0,05$ mg/dL e $2,33 \pm 0,05$ mg/dL, para o grupo HIP e CTL, respectivamente.

A prevalência da hipomagnesemia subclínica não tem sido devidamente quantificada em rebanhos leiteiros, mesmo sendo um importante fator de risco para hipocalcemia, geralmente associado ao desenvolvimento de transtornos metabólicos no periparto (Goff, 2008),

Nas condições alimentares do nosso estudo, 41% das vacas foram diagnosticadas com hipomagnesemia ($<1,8$ mg/dL). Apesar disso, os mecanismos de controle da calcemia aparentemente não foram afetados, já que as vacas do grupo HIP mantiveram a calcemia acima de $8,0$ mg/dL (Goff, 2008) e, mesmo após o parto, não diferiram do grupo CTL. O consumo de sal aniônico pelos animais pode ter auxiliado na ativação dos mecanismos homeostáticos do cálcio. Além disso, segundo Goff (2004), concentrações séricas de Mg abaixo de $1,6$ mg/dL prejudicam a transmissão do sinal da ligação do paratormônio (PTH) ao seu receptor nos tecidos alvo e, concentrações entre $0,8$ a $1,4$ mg/dL podem deprimir a secreção do PTH, comprometendo a sua ação.

Apesar do interesse, no estudo, em avaliar o impacto da hipomagnesemia subclínica na manifestação da hipocalcemia, o principal foco foi avaliar o impacto dos baixos níveis de magnésio sobre o metabolismo energético. Por isso, considerou-se o limite mínimo de Mg como $1,8$ mg/dL, o que segundo Goff (2004), não tornaria as vacas hipomagnesêmicas susceptíveis à hipocalcemia ($<1,6$ mg/dL, Figura 1).

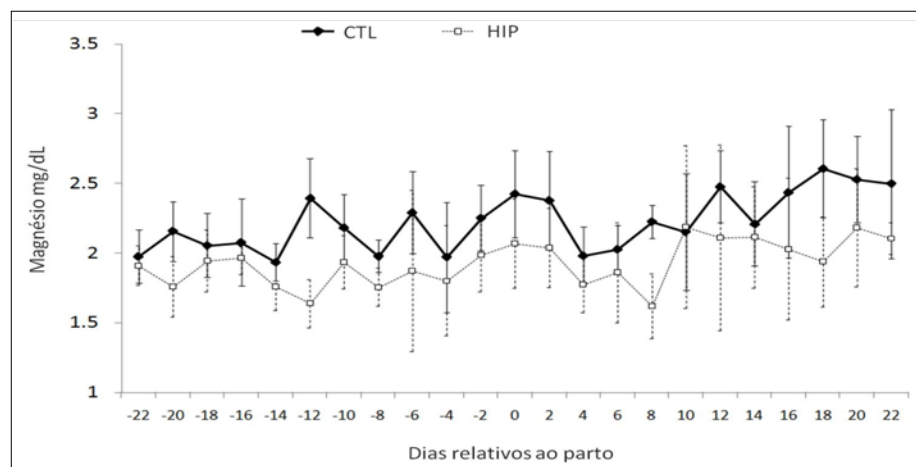


Figura 1: Concentrações séricas de magnésio (mg/dL) durante o período de transição de vacas leiteiras do grupo controle (CTL) e do grupo hipomagnesêmicas (HIP).

Além dos níveis reduzidos de magnésio, as vacas HIP também apresentaram concentrações séricas de fósforo maiores ($P = 0,0315$) que o grupo CTL durante todo período, sendo $5,65 \pm 0,18$ mg/dL e $5,13 \pm 0,15$ mg/dL, respectivamente (Figura 2). O maior nível pré-parto de fósforo nas vacas HIP ($P = 0,0315$) poderia justificar uma maior mobilização deste mineral no tecido ósseo e manutenção da função do PTH, já que os baixos níveis de magnésio não influenciariam o aumento da absorção intestinal ou a reabsorção renal de fósforo (Braithwaite, 1983).

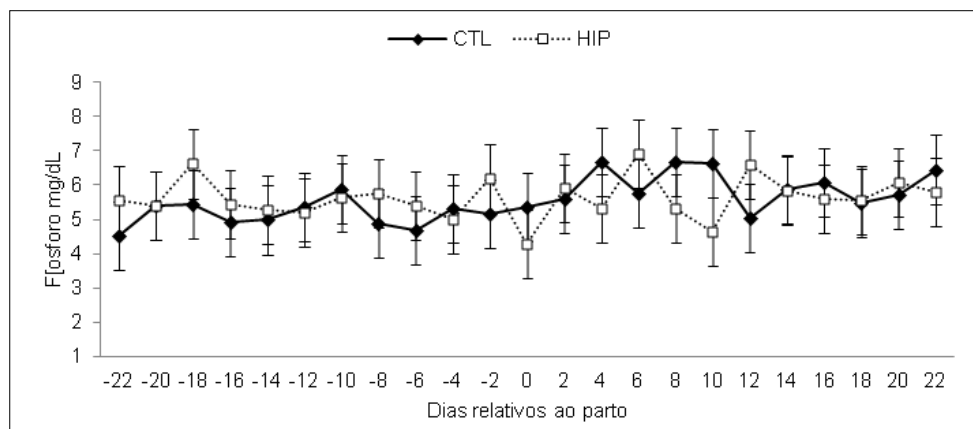


Figura 2: Concentrações séricas de fósforo (mg/dL) durante o período de transição de vacas leiteiras do grupo controle (CTL) e do grupo hipomagnesêmicas (HIP).

Embora não tenha sido observado efeito da hipomagnesemia no pH urinário, as vacas do grupo HIP poderiam ter um pH sanguíneo levemente reduzido, pela menor concentração de Mg. Além do mais, a hipomagnesemia poderia estimular uma maior secreção de PTH, com a manutenção da calcemia o que também poderia ser seguido deste discreto aumento da fosfatemia nas vacas HIP em relação às CTL (Goff, 2008).

Possivelmente, uma soma de fatores pode ter evitado a manifestação de quadros clínicos, devido à baixa qualidade da pastagem, com menor disponibilidade de fósforo e potássio. Estes minerais são abundantes em pastagens de boa qualidade, que quando compõem a base da dieta no pré-parto, são responsáveis pela etiologia da hipocalcemia, pois inibem a enzima 1α -hidroxilase presente no rim, que é responsável pela síntese de $1,25$ dihidroxivitamina D em resposta a um estímulo gerado pelo PTH em seus receptores no epitélio renal (Wilkins et al, 2013).

As vacas hipocalcêmicas tiveram níveis reduzidos de magnésio ($P<0,05$), tanto no período pré-parto quanto no pós-parto, que somado à lactação iniciada após o parto, acredita-se terem motivado a redução da calcemia (Goff, 2006). Como o íon magnésio garante a

atividade completa do receptor de PTH, por atuar como co-fator em um sítio de ligação presente na adenilciclase e na fosfolipase C, as vacas com níveis de magnésio plasmático abaixo de 1,6 mg/dL podem apresentar maior suscetibilidade à hipocalcemia (Goff, 2004).

Os desequilíbrios macrominerais estão associados ao aumento dos níveis de AGNE e à menor metabolização de glicose (Chaudhary et al., 2010). Em ruminantes as discussões sobre a causa destes achados estão geralmente vinculadas à diminuição da motilidade gastrointestinal e, conseqüentemente, redução da ingestão de matéria seca (Weglicki, 2012). Como os grupos não diferiram no pré-parto quanto às concentrações de ácidos graxos não esterificados (AGNE) e β -hidroxibutirato (BHBA), sugere-se que a ingestão de matéria seca tenha sido semelhante sem comprometer o balanço energético. Desta forma, estes marcadores também poderiam indicar que a hipomagnesemia subclínica não afetou de forma direta o balanço energético no pré-parto, apesar do magnésio atuar em reações enzimáticas importantes no metabolismo de carboidratos (Kim et al., 2010; Schneider et al., 2010).

A produção leiteira dos animais deste estudo não foi diferente entre os grupos, sendo $13,03 \pm 0,28$ e $14,77 \pm 0,46$ litros/dia para os grupos CTL e HIP, respectivamente. A taxa de glucagon/insulina apresentou uma tendência de ser maior para as vacas HIP ($P = 0,069$). Apesar disso, as demais variáveis relacionadas com o balanço energético, como AGNE, BHBA e glicose, não foram influenciadas pelas baixas concentrações de Mg.

As concentrações séricas de glucagon no grupo HIP foram maiores ($P=0,04$) nos dias 10, 18 e 20. Da mesma forma, a taxa Glucagon/Insulina foi maior ($P=0,04$) para o mesmo grupo nos dias 6, 8, 10, 12 e 16. Estes resultados demonstram que as vacas HIP tiveram uma maior relação glucagon/insulina, apesar de isoladamente as concentrações de cada hormônio não diferirem entre os grupos. Estes resultados corroboram com os de estudos em ratos, em que foi demonstrado que a hipomagnesemia altera a relação glucagon/insulina com a baixa ingestão alimentar, a qual pode estar relacionada com a diminuição da secreção de insulina (McNeill et al., 1982). Nossos resultados apresentaram maior relação glucagon/insulina nas vacas HIP, possivelmente influenciada pela sua menor secreção de insulina.

A baixa exigência nutricional durante o pré-parto poderia ser um fator para menor intensidade do BEN, refletindo em baixos níveis dos metabólitos energéticos AGNES, BHBA e colesterol e dos marcadores da função hepática neste período, AST e GGT. Entretanto, as concentrações de AST foram maiores ($P = 0,07$) nas vacas do grupo HIP ($54,57 \pm 1,95$), em relação ao grupo CTL ($45,77 \pm 1,80$, Figura 3), durante os dias 0, 6, 8, 10, 12 e 14, mesmo estando dentro dos limites fisiológicos para o período (Gregory et al., 2004). Os níveis elevados de AST nos dias 6 e 8 pós-parto precedem ou coincidem com os dias de níveis aumentados de AGNE e glucagon. Os valores de referência são

diferentes dependendo do autor: segundo Kaneko et al. (1997), os níveis fisiológicos para bovinos seriam entre 78 e 132 U/L. Já Stojevic et al. (2005), em uma pesquisa em vacas da raça Holandês, saudáveis, estabeleceram $32,90 \pm 7,0$ U/L durante o período seco e $57,79 \pm 16,49$ U/L durante a primeira semana de lactação. De qualquer forma, os níveis médios para as vacas hipocalcêmicas não ultrapassaram os limites fisiológicos, mas convergem para a hipótese de maior comprometimento da função hepática devido à maior mobilização de tecido adiposo e acúmulo hepático de lipídeos.

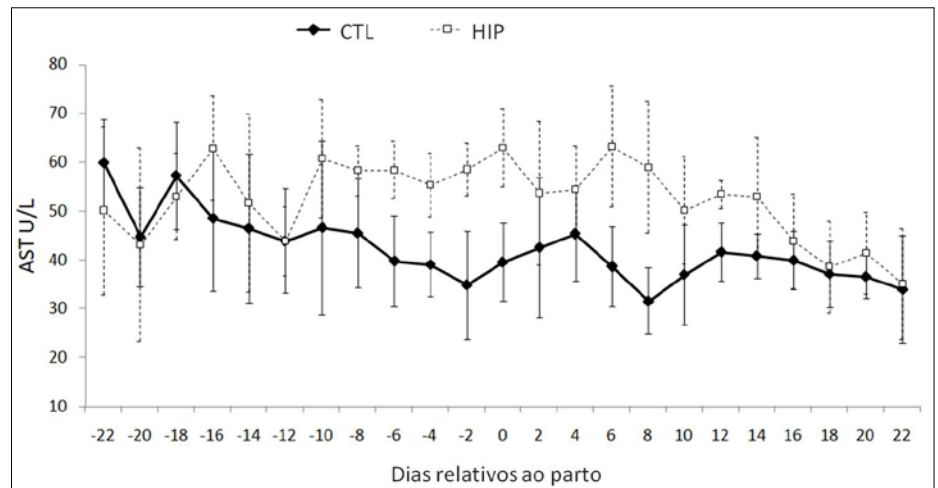


Figura 3: Concentrações séricas de AST durante o período de transição de vacas leiteiras do grupo controle (CTL) e do grupo hipomagnesêmico (HIP).

Além do mais, recentemente foi demonstrado que a hipomagnesemia em ratos aumenta as concentrações de AST como reflexo do dano na musculatura cardíaca (Walz et al., 2007). Outra possível causa poderia estar associada à função cardíaca, devido à maior fragilidade das hemácias em consequência da perda da função antioxidante do magnésio (Russell & Rousel, 2007; Watanabe et al., 2011). As concentrações de GGT não diferiram entre os grupos, mantendo-se dentro dos padrões de referência para espécie ($13,21 \pm 12,72$) (Gregory et al., 2004).

Apesar da hipocalcemia subclínica ter sido diagnosticada em poucos dias, já demonstrou influenciar o balanço energético, em virtude dos maiores níveis de glucagon e de AGNES, além da maior relação glucagon/insulina, que foram observados principalmente nos dias 6 e 8 pós-parto. Já os níveis de glicose não diferiram entre vacas normo e hipocalcêmicas, ficando dentro dos padrões fisiológicos 40 a 60 mg/dL (Goff, 2004), embora tenham sido menores no período pós-parto, principalmente na primeira semana de lactação. Isso reforça a hipótese de que a hipocalcemia é um agente desencadeador de rotas catabólicas pelas baixas concentrações de cálcio extra e intracelular, prejudicando o aumento dos mediadores de glicose e a taxa de oxidação da glicose nos tecidos muscular e adiposo (Draznin et al., 1987).

Em conclusão, neste estudo, a hipomagnesemia subclínica não altera os níveis dos indicadores do metabolismo energético. Além disso, vacas com hipomagnesemia apresentam maior relação glucagon/insulina, o que demonstra maior desafio para manter os níveis glicêmicos.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsas.

Referências

- BARBAGALO M., DOMINGUEZ L.J., GALIOTO A., FERLISI A., CANI C., MALFA L., PINEO A., BUSARDO A. & PAOLISSO G. 2003. Role of magnesium in insulin action, diabetes and cardio-metabolic syndrome x. *Molecular Aspects of Medicine*. v. 24, n. 1-3, p. 39-52.
- BHANUGOPAN M.S., FULKERSON W.J., FRASER D.R., HYDE M. & D.M. MCNEILL D.M. 2010. Carryover effects of potassium supplementation on calcium homeostasis in dairy cows at parturition. *Journal of Dairy Science*. v. 93, n. 5, p. 2119-2129.
- CHAUDHARY D.P., SHARMA R. & BANSAL D.D. 2010. Implications of magnesium deficiency in type 2 diabetes: A review. *Biological Trace Element Research*. v. 134, n. 2, p. 119-129.
- DRAZININ B., SUSSMAN K., KAO M., LEWIS D. & SHERMAN N. 1987. The existence of an optimal range of cytosolic free calcium for insulin – stimulated glucose transport in rat adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 262, p. 14385-14388.
- GOFF J.P. 2004. Macromineral disorders of the transition cow. *The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*. v. 20, n. 3, p. 471-494.
- GOFF J.P. 2006. Macromineral physiology and application to the feeding of the dairy cow for prevention of milk fever and other periparturient mineral disorders. *Animal Feed Science and Technology*. v. 126, n. 3-4, p. 237-257.
- GOFF J.P. 2008. The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *Veterinary Journal*. v. 176, n. 1, p. 50-57, 2008.
- GREENE L.W., WEBB J.R. K.E. & FONTENOT J.P. 1983. Effect of potassium level on site of absorption of magnesium and other macroelements in sheep. *Journal of Animal Science*. v. 56, n. 5, p. 1214-1221.
- GREGORY L., BIRGEL E.H., DÁNGELINO J.L., BENESI F.J., ARAUJO W.P. & BIRGEL E.H. 2004. Valores de referência dos teores séricos da ureia e creatinina em bovinos da raça Jersey criados no estado de São Paulo: influência dos fatores etários, sexuais e da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos. *Arquivos do Instituto Biológico*. v. 71, n. 3, p. 339-345.
- JAWERBAUM A. & WHITE V. 2010. Animal models in diabetes and pregnancy. *Endocrine Reviews*. v. 31, n. 5, p. 680-701.
- KANEKO J.J., HARVEY J.W. & BRUSSM.L. 1997. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. In: Academic Press. 5th ed. (Londres, Inglaterra). p. 303-325.
- LECUBE A., BAENA-FUSTEGUERAS J.A., FORT J.M., PELEGRI D., HERNANDEZ C. & SIMO R. 2012. Diabetes is the main factor accounting for hypomagnesemia in obese subjects. *Plos One*. v. 7, n. 1, p. e30599.
- LEE C.T., LIEN Y. H.H., LAI L.W., CHEN J.B., LIN C.R. & CHEN H.C. 2006. Increased renal calcium and magnesium transporter abundance in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Kidney International*. v. 69, n. 10, p. 1786-1791.
- MADSEN F.C., LENTZ D.E., MILLER J.K. & HANSARD S.L. 1976. Effect of glucagon infusion on plasma magnesium, glucose, and insulin in bull calves. *Journal of Dairy Science*. 59 (9): 1599-1602.
- MATSUNOBU S., TERASHIMA Y., SENSHU T., SANO H. & ITOH H. 1990. Insulin secretion and glucose uptake in hypomagnesemic sheep fed a low magnesium, high potassium diet. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 1 (3): 167-171.
- MCNAIR P., CHRISTIANSEN C., MADSBAD S., LAURITZEN E., FABER O., BINDER C. & TRANSBOL I. 1978. Hypomagnesemia, a risk factor in diabetic retinopathy. *Diabetes*. 27 (11): 1075-1077.
- MCNEILL D.A., HERBEIN J.H. & RITCHEY S.J. 1982. Hepatic gluconeogenic enzymes, plasma insulin and glucagon response to magnesium deficiency and fasting. *Journal of Nutrition*. 112 (4): 736-743.
- MOOREN, F.C., KRUGER K., VOLKER K., GOLF S.W., WADEPUHL M. & KRAUS A. 2011. Oral magnesium supplementation reduces insulin resistance in non-diabetic subjects - a double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Diabetes, Obesity & Metabolism*. 13 (3): 281-284.
- MULLIGAN F.J., O'GRADY L., RICE D.A. & DOHERTY M.L. 2006. A herd health approach to dairy cow nutrition and production diseases of the transition cow. *Animal Reproduction Science*. 96 (3-4): 331-353.
- RUSSELL K.E. & ROUSSEL A.J. 2007. Evaluation of the ruminant serum chemistry profile. *The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*. v. 23, n. 3, p. 403-426.
- SCHNEIDER A., SCHMITT E., GONÇALVES F.M., DEL PINO F.A.B., GONZALEZ M.C.M., PEREIRA R.A. & RABASSA V.R. Transtornos Relacionados ao Metabolismo dos Minerais. In: Corrêa, M.N., González F.H.D. & Silva S.C. *Transtornos Metabólicos nos Animais Domésticos*. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária, p.193-197.
- STOJEVIC Z., PIRSLJIN J., MILINKOVIĆ-TUR S., ZDELAR-TUK M. & LJUBIĆ B.B. 2005. Activities of AST, ALT and GGT in clinically healthy dairy cows during lactation and in the dry period. *Veterinarski Arhiv*. v. 75, n. 1, p. 67-73.
- WALZ H.A., WIERUP N., VIKMAN J., MANGANIELLO V.C., DEGERMAN E., ELIASSON L. & HOLST L.S. 2007. Beta-cell pde3b regulates Ca²⁺-stimulated exocytosis of insulin. *Cellular Signalling*. v. 19, n. 7, p. 1505-1513.
- WATANABE M., SHINOHARA A., MATSUKAWA T., CHIBA M., WU J., LESAKI T. & OKADA T. 2011. Chronic magnesium deficiency decreases tolerance to hypoxia/reoxygenation injury in mouse heart. *Life Sciences*. v. 88, n. 15-16, p. 658-663.
- WEGLIICKI W.B. 2012. Hypomagnesemia and inflammation: Clinical and basic aspects. *Annual Review of Nutrition*. v. 32, p. 55-71.
- WILKENS, M.R., COHRS I., LIFSCHITZ A.L., FRASER D.R., OLSZEWSKI K., SCHRÖDER B., BREVES G. 2013. Is the metabolism of 25-hydroxyvitamin D3 age-dependent in dairy cows? *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 136, p.44-46.