

Metabolismo Ósseo de Vacas Jovens Nelore em Pastos de *Brachiaria brizantha* Suplementadas ou não Durante a Seca com Fósforo/Cálcio e Concentrado

Maria Luiza Franceschi Nicodemo¹, Sheila da Silva Moraes¹, Luiz Roberto Lopes de S. Thiago¹, Elizângela Luiz Caxias², Manuel Cláudio Motta Macedo^{1,3}, Pedro Paulo Pires¹, Cláudio Roberto Madruga^{1,3}, Eustáquio Camargo Vaz⁴, Gustavo Eugênio Barrocas⁵

RESUMO - Vacas sob dietas deficientes em fósforo (P) não têm respondido à suplementação desse elemento no final da gestação, mesmo com adequação de outros nutrientes, mas parecem responder na lactação. Estudou-se a resposta à suplementação de cálcio e de fósforo com ou sem proteína e energia, durante a seca, sobre o metabolismo ósseo de vacas em pastejo. Todos os animais receberam mistura mineral completa nas águas, enquanto, na seca, mistura mineral completa (MMC) e mistura mineral sem fosfato bicálcico, com (MMR) ou sem (MM) suplemento protéico-energético. Vacas recebendo suplemento protéico-energético durante a seca tenderam à menor variação nas medidas ósseas. As concentrações de Ca nas cinzas dos ossos foram sempre inferiores a 34%, sem qualquer sintoma de deficiência do elemento. A concentração de P nas cinzas também esteve marginal em relação às concentrações consideradas adequadas, mesmo nas vacas que recebiam P suplementar o ano todo, enquanto o P plasmático permaneceu na faixa normal. Osteocalcina e fosfatase alcalina óssea apresentaram valores mais elevados durante a gestação, época em que deoxipiridinolina apresentou valores mais baixos. As vacas que receberam suplemento protéico-energético na seca também apresentaram valores de deoxipiridinolina mais baixos. Deoxipiridinolina aumentou na época do parto e no início de lactação. Independentemente dos tratamentos estudados, vacas de cria não apresentaram sinais de deterioração da qualidade do osso em três anos de experimento.

Palavras-chave: bovino de corte, cerrado, marcadores, osso, suplementação

Bone Metabolism of Young Nelore Cows in *Brachiaria brizantha* Pastures Supplemented or not During the Dry Season with Dicalcium Phosphate and Concentrate

ABSTRACT - Cows on diets deficient in P have not responded P supplementation during late pregnancy, although they may respond in early lactation. Bone metabolism of range cows has been monitored. All cows received complete mineral mixtures during wet season; during dry season, the imposed treatments were: complete mineral mixtures (MMC) or mineral mixtures lacking dicalcium phosphate, supplemented (MMR) or not (MM) with concentrate. Cows supplemented with the concentrate tended to show less variation on bone measurements. Calcium concentrations on bone ash were always below 34% without any symptom of Ca deficiency. Phosphorus concentrations on bone ash were also marginal, even in cows that received additional P all year round, while plasma P was always normal. Osteocalcin and bone alkaline phosphatase showed higher values ($P < 0.05$) during late pregnancy, when deoxypyridinoline concentrations were the lowest. Deoxypyridinoline increased at parturition and during early lactation. Cows that received concentrate also presented lower deoxypyridinoline mean values. After three years, beef cows did not show signs of bone loss in any of the treatments.

Key Words: beef cattle, "cerrado", bone markers, bone, supplementation

Introdução

O fósforo (P), geralmente, está deficiente nas pastagens tropicais. Vacas de cria estão mais sujeitas a deficiências de fósforo que outras categorias do rebanho, em razão da alta exigência nutricional e do tempo de permanência no rebanho. As exigências de fósforo são elevadas, sobretudo, no terço final da

gestação, para o crescimento fetal, e no início da lactação, posto que é estimada deposição em torno de 1,6 g de P/kg de leite. As altas demandas de cálcio e de fósforo no final da gestação aparentemente não podem ser atendidas apenas pela dieta, e a fêmea tem que mobilizar suas reservas ósseas (Braithwaite, 1983 a, b). A reposição das reservas ósseas mobilizadas depende não somente da adequação de

¹ Pesquisadores, Embrapa Gado de Corte, Rodovia BR 262, km 4, Caixa Postal 154, CEP: 79002-970 Campo Grande, MS (luiza@cnpqc.embrapa.br).

² Bolsista, Embrapa Gado de Corte, acadêmica de Zootecnia da Universidade Católica Dom Bosco.

³ Bolsista do CNPq.

⁴ Médico-Veterinário, Embrapa Gado de Corte (*in memoriam*).

⁵ Químico, Embrapa Gado de Corte.

cálcio e de fósforo na dieta, como também da disponibilidade de outros nutrientes, como proteína (Sykes & Field, 1972) e energia (McMeniman & Little, 1974). Nos sistemas de produção em que parte final da gestação coincide com a seca, é possível que o fornecimento de uma dieta adequada durante o período de chuvas possa maximizar a reposição de perda óssea, de modo que as reservas estejam recompostas até a fase de alta demanda no próximo ciclo reprodutivo.

Embora trabalhos com ruminantes sejam relativamente escassos, diversos estudos em ratos mostraram os efeitos da restrição alimentar sobre o crescimento ósseo, com redução na formação de osso (Lee & Myers, 1979), além de decréscimo na celularidade, alteração no tamanho celular e composição celular no osso (Nakamoto & Miller, 1977). Soliman et al. (1996) observaram que crianças subnutridas manifestaram sintomas clínicos de raquitismo quando intercalaram fases de recuperação com períodos de infecção e privação nutricional, sugerindo que a maior atividade metabólica do osso, associada ao crescimento compensatório nos períodos de melhor nutrição, aumentaria sua vulnerabilidade. A subnutrição foi relacionada à depressão nas concentrações do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I, regula o metabolismo ósseo, particularmente a formação de osso pelos osteoblastos), associada à redução ou cessação do crescimento epifisário e à menor mineralização dos ossos longos.

Estudos em seres humanos mostraram também que dietas deficientes em proteína podem ser prejudiciais tanto para a aquisição de massa óssea durante o crescimento como para sua conservação na vida adulta (Schurch et al., 1998; Bonjour et al., 2001). Ratos adultos sob dietas deficientes em proteína sofreram redução na formação de osso (menor recrutamento e atividade dos osteoblastos), indicada por diminuição nas concentrações de osteocalcina plasmática e de IGF-I, na aposição mineral e na formação periosteal, assim como na reabsorção do osso esponjoso, indicada por redução das superfícies erodidas ativas e do número de osteoclastos (Bourrin et al., 2000).

Em bovinos jovens, a deficiência de proteína foi relacionada à redução do crescimento ósseo e/ou à menor mineralização (Siebert et al., 1975; Tuen et al., 1984). Ressalta-se que a suplementação de proteína, quando a concentração de fósforo na dieta está inadequada, exacerba ainda mais os efeitos desta

deficiência (Bortolussi et al., 1996). Todavia, esses autores não encontraram qualquer efeito negativo da deficiência de nitrogênio sobre a espessura da cortical e sobre a mineralização do osso de novilhos azebuados.

A deficiência de energia também interfere no metabolismo do osso. A restrição de energia foi relacionada à redução da síntese e da concentração sérica de IGF-I, bem como à diminuição da síntese de colágeno em seres humanos (Zanker & Swaine, 2000). Em ratas, a restrição da energia dietética provocou elevação na reabsorção óssea e redução da massa corporal e da densidade do osso. Ratas idosas apresentaram quedas consistentes nas propriedades biomecânicas do osso. A elevação da formação de osso esteve associada à queda na densidade de minerais (Talbot et al., 1998; Talbot et al., 2001). Em bovinos, redução na utilização de fósforo na deficiência de energia foi observada em bovinos consumindo *Acacia aneura* (McMeniman & Little, 1974).

O estado fisiológico do animal é outro fator que pode interferir na capacidade de utilização dos nutrientes da dieta. Assim, vacas lactantes tendem a ser mais responsivas à suplementação de fósforo do que vacas no final de gestação (Fishwick et al., 1977). A vaca parece responder à suplementação de P durante a lactação, aumentando a digestibilidade e o consumo de matéria seca, assim como a produção de leite (Fishwick et al., 1977; Call et al., 1987).

A caracterização do perfil metabólico do osso pode contribuir para o delineamento de estratégias de suplementação de fósforo para vacas de cria. A utilização da biópsia de costela permite o conhecimento da composição do osso, em determinado momento, refletindo o resultado líquido dos processos de formação e reabsorção óssea. Marcadores de reabsorção óssea (hidroxiprolina e deoxipiridinolina) representam a degradação de colágeno tipo I, ao passo que os de formação óssea, como fosfatase alcalina óssea e osteocalcina, indicam a atividade dos osteoblastos, a formação e mineralização da matriz orgânica do osso (Christenson, 1997). A utilização conjunta desses recursos, embora com limitações próprias, possibilita acompanhar as respostas do osso às mudanças na dieta e no estado fisiológico.

Neste trabalho, objetivou-se estudar o efeito da suplementação de cálcio e de fósforo, com ou sem proteína e energia, durante a seca, sobre o metabolismo ósseo de vacas de cria em pastejo.

Material e Métodos

Sessenta novilhas Nelore com diagnóstico positivo de prenhez foram distribuídas em três tratamentos, em dois blocos, de acordo com o ano de nascimento (1994 e 1995), totalizando 20 fêmeas por tratamento.

A área experimental encontrava-se na Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, com clima tropical úmido (Aw), segundo a classificação de Köppen, com estação chuvosa no verão e seca no inverno. A precipitação média anual situa-se em torno de 1.500 mm, sendo junho, julho e agosto os meses de menor precipitação. A temperatura média anual oscila entre 19°C e 25°C.

O experimento foi implantado em piquetes de 22 ha com *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, formada há cerca de dez anos em latossolo vermelho imperfeitamente drenado, de relevo plano. A área foi submetida a gessagem e calagem (gesso 613 kg/ha; calcário dolomítico, 2,27 ton/ha), em setembro/1998, e adubação (NPK 2-20-20, 500 kg/ha; uréia 110 kg/ha), em janeiro/1999. Em fevereiro/1998, os piquetes (com água *ad libitum* e cochos cobertos) foram vedados; em julho, as fêmeas foram introduzidas na área; e em agosto, deu-se início ao experimento. Os lotes experimentais foram rotacionados nos piquetes a cada 15 dias, com taxa de lotação média de 0,94 unidade animal/ha.

A estação de monta (natural) teve duração de 90 dias, de janeiro a março. Os touros foram submetidos a exames andrológicos antes de serem introduzidos e, durante a estação de monta, foram rotacionados nos tratamentos. Os bezerros foram desmamados aos seis meses de idade.

Durante três anos experimentais completos, compreendidos entre 01 agosto/1998 e 01 agosto/2001, todas as vacas receberam mistura mineral completa¹ (P, S, Cu, Zn, Co, I, Se, Na), na época das águas. Na seca, as vacas foram submetidas aos seguintes tratamentos:

- MMC: mistura mineral completa todo o ano
- MM: mistura mineral sem fosfato bicálcico
- MMR: mistura mineral sem fosfato bicálcico + suplemento protéico-energético²

O controle (mensal) de consumo da mistura mineral foi obtido pela diferença de pesagem entre o fornecido e a sobra. O consumo do suplemento protéico energético, fornecido diariamente no período da manhã, foi total, enquanto o consumo médio de suplemento mineral (UA/d) foi de 63 g nas chuvas e, nas secas, as médias foram de 43 g (MMC), 36 g (MM) e 25 g (MMR).

Para cada ano experimental foram feitas, ao acaso, coletas em sete a dez vacas/tratamento, de sangue, de urina e de ossos, nas seguintes épocas: início do 1/3 final de gestação (agosto); ao parto (novembro/dezembro); e logo após o terço inicial de lactação (março). A metodologia usada em cada coleta e as respectivas análises foram as seguintes:

Sangue - Via jugular em frascos heparinizados. Centrifugação a 3.000 r.p.m por 15 minutos, separação do plasma, armazenamento em alíquotas a -20°C até análise. Neste material, foram feitas análises de osteocalcina intacta (Kit para ELISA Novocalcin, Metra Biosystems), de fosfatase alcalina óssea (Kit para ELISA Alkaphase-B, Metra Biosystems) e de fósforo inorgânico (Fick et al., 1980).

Urina - coleta direta, filtração em dobras de gaze, e adição de 10% de ácido sulfúrico a 10% (v/v). As alíquotas foram congeladas a -20°C até análise. Foram feitas análises de deoxipiridinolina (kit para ELISA Ppylinks-D, Metra Biosystems) e de creatinina (Reflotron, fita para diagnóstico, Boehringer Mannheim).

Ossos - coleta de amostras de osso da 12ª costela, utilizando a técnica de Little (1972). Não foi feita coleta ao parto. Neste material, foram feitas análises de matéria seca, cinzas, Ca, P (Fick et al., 1980), espessura da cortical (Little, 1984) e gravidade específica (GE), de acordo com a fórmula: $GE = \text{peso ao ar} / (\text{peso ao ar} - \text{peso na água})$.

Foi criada uma variável (PxCort), para expressar a quantidade total de fósforo na biópsia de osso (mg), calculada como $P \text{ (mg/cm}^3\text{)} \times \text{espessura da cortical (cm)} \times \pi R^2$, com raio R (diâmetro da broca/2) = 0,65 cm.

Foi empregado delineamento de blocos ao acaso, com parcelas subdivididas no tempo, em que os blocos foram ano de nascimento das vacas (1994 e 1995). Os tratamentos foram alocados na parcela

¹ Composição da mistura mineral: fosfato bicálcico, 57,923%; sulfato de zinco, 2,041%; sulfato de cobre, 0,454%; sulfato de cobalto, 0,019%; iodato de potássio, 0,008%; selenito de sódio, 0,005%; flor de enxofre, 7,240%; cloreto de sódio, 31,310% e melaço em pó, 1%.

² Suplemento protéico-energético (consumo médio por animal/dia): farelo de soja, 800 g; grão de milho triturado, 1500 g e carbonato de cálcio, 32 g. Corresponde a cerca de 0,55% do peso vivo.

principal; as épocas de amostragem, na subparcela; e o ano experimental, na sub-subparcela. Não foram estabelecidas repetições para os pastos. O número de partos/vaca foi utilizado como covariável para análise de variância das variáveis estudadas. Análises de variância foram feitas usando-se o procedimento GLM do SAS Institute (SAS, 1985). Quando houve diferença significativa, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

Um dos pontos em questionamento era se as vacas seriam capazes de manter a estrutura óssea nos diferentes tratamentos. Com o avanço da idade, aumentou a concentração de cinzas, de cálcio e de fósforo (este último expresso em volume de osso fresco) no osso (Tabelas 1 e 2). A espessura da cortical e a variável PxCort não se alteraram com o avanço da idade, embora esta última tenha apresentado tendência de aumento ($P=0,13$). Fósforo nas cinzas e razão Ca/P flutuaram irregularmente. No terceiro ano experimental, os teores ósseos de cinzas, Ca e P nas cinzas e de P, expressos por volume, foram mais elevados. Tomados em conjunto, esses dados indicam que a qualidade do osso foi, pelo menos, mantida no final dos três anos de estudo, em todos os tratamentos. A boa qualidade das pastagens na estação seca pode ter reduzido os efeitos de tratamento.

A gravidade específica do osso reduziu-se com o tempo, sobretudo durante a gestação. Em decorrência da expectativa de a gravidade específica estar relacionada à concentração de minerais no osso (Shupe et al., 1988), torna difícil a interpretação deste resultado. O osso é formado por matriz orgânica na qual são depositados minerais. O osso poderia ser avaliado pela espessura da camada cortical, que não variou entre tratamentos, e pelo grau de mineralização. A concentração de fósforo expressa em volume de osso (mais sensível que P nas cinzas) manteve-se praticamente igual ao período inicial no tratamento MMC, tendo aumentado com o tempo nos tratamentos MM e MMR. Quando os valores foram ajustados considerando as alterações na espessura de cortical (PxCort), as diferenças entre tratamentos desapareceram, mas os valores continuaram favorecendo MMR.

A capacidade de recuperação do osso, quando o bovino recebe dieta adequada, pode ser observada

nos estudos de Bortolussi et al. (1999), que relataram aumento do consumo e da taxa de ganho de peso, com o acréscimo de P ao osso e a restauração da espessura da cortical em novilhos de recria submetidos a dietas deficientes em P e com concentrações medianas a baixas de proteína.

Houve interação significativa entre os tratamentos aplicados e ano experimental para a concentração de fósforo (%) e a razão Ca/P no osso. O teor de fósforo no osso indicou valores mais baixos durante o segundo ano experimental (Tabela 2), expresso tanto nas cinzas ($P<0,001$) como em volume de osso ($P=0,06$), juntamente com a maior razão Ca/P. O segundo ano experimental foi caracterizado por seca rigorosa e perda de parte da área experimental (cerca de 30%), em decorrência de um incêndio. No grupo de vacas recebendo ração, houve menor efeito desse ano na redução dos teores de P expresso por volume de osso, embora não se tenha observado esse mesmo efeito em P nas cinzas.

As concentrações de fósforo inorgânico (P_i) plasmático estavam dentro da faixa de normalidade em todos os tratamentos (deficiência < 3 mg%), apesar de o tratamento MM tender a apresentar concentrações mais baixas (Tabela 3). Entretanto, no segundo ano experimental, registrou-se queda significativa nas concentrações de P_i plasmático ($P<0,001$), o que caracteriza as condições difíceis encontradas no campo naquele ano.

Vários estudos mostram redução na celularidade e nas taxas de síntese (Van Mosel et al., 1990) e de reabsorção (Van de Braak et al., 1987) com o avanço da idade. Essas mudanças metabólicas são acompanhadas por alterações nas concentrações dos marcadores ósseos, que, geralmente, tendem a diminuir com o tempo. Neste estudo, as concentrações de osteocalcina e de fosfatase alcalina óssea reduziram-se significativamente com o passar do tempo (Tabela 3) e tenderam a apresentar valores menores em vacas nascidas em 1994 (45,00 *versus* 53,06 ng/mL para osteocalcina [$P=0,09$] e 22,01 *versus* 28,39 U/L para fosfatase alcalina óssea [$P<0,01$]).

A deoxipiridinolina aumentou com o tempo (Tabela 4), indicando que, à medida que as vacas envelheciam, a taxa de reabsorção aumentava. Esse descompasso entre as taxas de formação óssea e de reabsorção poderia levar, a médio prazo, à perda óssea. Entretanto, Green (2001), comentando as limitações de se expressar os marcadores urinários em relação à concentração de creatinina, chama a aten-

Tabela 1 - Parâmetros de osso: espessura do osso cortical, concentração de cinzas no osso seco e desengordurado, gravidade específica, concentração de Ca nas cinzas e razão Ca/P em biópsias de costela obtidas na gestação (G) e na lactação (L) nos três anos experimentais

Table 1 - Bone parameters: cortical thickness, ash concentration in defatted dried bone, specific gravity, calcium concentration in the ashes and Ca/P ratio in rib biopsies obtained during late gestation (G) and early lactation (L) in three experimental years

Tratamentos <i>Treatments</i>	Variáveis <i>Variables</i>	Ano 1 <i>Year 1</i>		Média <i>Mean</i>	Ano 2 <i>Year 2</i>		Média <i>Mean</i>	Ano 3 <i>Year 3</i>		Média <i>Mean</i>	Média geral <i>General means</i>
		G	L		G	L		G	L		
MMC	Cortical, mm <i>Cortical thickness</i>	3,46	3,94	3,70	3,80	3,82	3,81	3,49	3,69	3,59	3,70
	Cinzas, % <i>Ashes</i>	64,13	64,37	64,25	64,64	66,53	65,58	64,34	65,89	65,12	64,98
	Gravidade específica <i>Specific gravity</i>	1,89	1,90	1,89	1,81	1,83	1,82	1,78	1,88	1,83	1,85
	Ca, %	34,54	33,73	34,13	35,58	34,63	35,10	34,21	39,99	37,10	35,44
	Ca/P	1,87	1,88	1,88	1,98	2,15	2,06	2,20	2,06	2,13	2,02 ^A
MM	Cortical <i>Cortical thickness</i>	3,41	3,38	3,40	3,74	3,32	3,53	3,01	3,89	3,45	3,46
	Cinzas <i>Ashes</i>	64,16	64,44	64,30	64,86	64,90	64,88	66,16	66,12	66,14	65,11
	Gravidade específica <i>Specific gravity</i>	1,89	1,93	1,91	1,86	1,83	1,84	1,84	1,84	1,84	1,86
	Ca, %	34,51	32,89	33,70	35,00	36,58	35,79	34,32	39,80	37,06	35,52
	Ca/P	1,89	1,84	1,86	1,93	2,14	2,04	1,82	2,08	1,95	1,95 ^B
MMR	Cortical <i>Cortical thickness</i>	3,44	3,60	3,52	3,97	3,35	3,66	2,85	4,26	3,56	3,58
	Cinzas <i>Ashes</i>	64,16	63,93	64,04	64,36	65,45	64,91	65,22	65,65	65,43	64,79
	Gravidade específica <i>Specific gravity</i>	1,89	1,89	1,89	1,86	1,87	1,86	1,77	1,84	1,81	1,85
	Ca, %	34,55	33,20	33,88	34,83	35,40	35,12	34,15	39,25	36,70	35,23
	Ca/P	1,89	1,86	1,87	1,96	2,18	2,07	1,71	2,00	1,86	1,93 ^B
Médias <i>Means</i>	Cortical <i>Cortical thickness</i>	3,44	3,64	3,54	3,84	3,50	3,67	3,12	3,95	3,53	3,58
	Cinzas <i>Ashes</i>	64,15	64,24	64,20 ^b	64,62	65,63	65,12 ^a	65,24	65,88	65,56 ^a	64,86
	Gravidade específica <i>Specific gravity</i>	1,89	1,91	1,90 ^a	1,84	1,84	1,84 ^b	1,80	1,85	1,82 ^b	1,86
	Ca, %	34,53	33,27	33,90 ^c	35,14	35,54	35,34 ^b	34,23	39,68	36,95 ^a	35,33
	Ca/P	1,88	1,86	1,87 ^c	1,96	2,15	2,06 ^a	1,91	2,05	1,98 ^b	1,96

Letras diferentes (a,b,c) na mesma linha indicam diferença estatística entre as médias.

Different letter (a,b,c), in the same row, indicate statistical differences between the means.

Letras diferentes (A,B) na mesma coluna indicam diferença estatística entre as médias.

Different letter (A,B), in the same column, indicate statistical differences between the means.

ção para o fato de que pode haver decréscimo na excreção de creatinina, com o avanço da idade, o que originaria valores artificialmente mais altos dos marcadores de reabsorção óssea. Tem-se buscado testes para a deoxipiridinolina circulante, o que possibilitaria a superação deste problema. O alto coeficiente de variação de deoxipiridinolina observado neste experimento é característico dessa medida (Kleerekoper, 2001).

No presente experimento, vacas mais velhas, nascidas em 1994, apresentaram maior teor de cinzas

e de fósforo (expresso por volume) no osso em relação às nascidas em 1995. A gravidade específica tendeu a ser maior com a idade ($P=0,06$).

Outro ponto em questionamento, nesta pesquisa, era a existência de perda óssea na fase final de gestação-início de lactação em vacas Nelore consumindo pastagem. Essas perdas, se existentes, poderiam ser manipuladas com a dieta ou poderiam ser consideradas fisiológicas?

Nas condições deste trabalho, os partos concentraram-se de meados de novembro até final de

Tabela 2 - Parâmetros de osso: concentração de P nas cinzas, P expresso por unidade de volume no osso fresco e quantidade de P total (PxCort) em biópsias de costela obtidas na gestação (G) e na lactação (L) nos três anos experimentais

Table 2 - Bone parameters: phosphorus concentration in the ashes, P expressed in unit of volume of wet bone and total P amount (PxCort) in rib biopsies obtained during late gestation (G) and early lactation (L) in three experimental years

Tratamentos Treatments	Variáveis Variables	Ano 1 Year 1		Média Mean	Ano 2 Year 2		Média Mean	Ano 3 Year 3		Média Mean	Média geral Overall mean
		G	L		G	L		G	L		
MMC	P, %	18,43	17,98	18,21	17,99	16,17	17,08	15,91	19,37	17,64	17,64
	P, mg/cc	164,68	168,20	166,44	175,36	145,00	160,18	137,58	197,38	167,48	164,70B
	PxCort, mg	301,5	351,4	326,4	353,4	288,7	321,0	262,8	385,8	324,3	323,9
MM	P, %	18,30	17,90	18,10	18,13	17,14	17,64	18,95	19,13	19,04	18,26
	P, mg/cc	163,33	167,99	165,66	181,82	138,44	160,13	195,43	185,48	190,46	172,08A
	PxCort, mg	296,8	300,9	298,8	360,9	243,0	302,0	271,4	385,5	328,4	309,7
MMR	P, %	18,26	17,89	18,07	17,77	16,36	17,07	20,14	19,63	19,88	18,34
	P, mg/cc	163,06	162,40	162,73	178,40	160,24	169,32	187,26	192,34	189,80	173,95A
	PxCort, mg	297,6	310,8	304,2	375,8	287,0	331,4	292,6	433,8	363,2	332,9
Médias Means	P, %	18,33	17,92	18,13b	17,96	16,56	17,26c	18,33	19,38	18,86a	18,09
	P, mg/cc	163,69	166,20	164,94b	178,53	147,89	163,21b	173,42	191,73	182,58a	169,18
	PxCort, mg	298,6	321,0	309,8	363,4	272,9	318,1	275,6	401,7	338,7	321,4

Letras diferentes (a,b,c) na mesma linha indicam diferença estatística entre as médias.

Letras diferentes (A,B) na mesma coluna indicam diferença estatística entre as médias.

Different letter (a,b,c), in the same row, indicate statistical differences among the means.

Different letter (A,B), in the same column, indicate statistical differences among the means.

Tabela 3 - Concentrações médias de osteocalcina (OC, ng/mL), fosfatase alcalina óssea (AP, U/L) e fósforo inorgânico (Pi, mg %) no plasma de vacas de corte no início do terço final de gestação (G), ao parto (P) e após o terço inicial da lactação (L)

Table 3 - Mean concentrations of osteocalcin (OC), bone alkaline phosphatase (AP) and inorganic phosphorus in plasma of beef cows in late gestation (G) and early lactation (L)

Tratamento Treatment	Variáveis Variables	Ano 1 Year 1			Média Mean	Ano 2 Year 2			Média Mean	Ano 3 Year 3			Média Mean	Média geral Overall mean
		G	P	L		G ¹	P	L		G	P	L		
		MMC	OC, ng/mL	83,03		34,02	49,22	55,42		73,90	54,37	25,01		
AP, U/L	35,20		28,41	24,91	29,51	27,50	34,87	33,12	31,83	21,43	24,02	21,93	22,46	27,93
Pi, mg%	5,90		4,89	6,55	5,78	5,80	5,29	4,67	5,25	5,11	6,64	5,44	5,73	5,59
MM	OC, ng/mL	64,43	34,46	44,13	47,68	54,53	47,65	23,70	41,96	63,49	34,15	37,54	45,06	44,90
	AP, U/L	28,77	18,95	28,93	25,55	21,41	30,15	26,83	26,13	22,01	19,86	16,40	19,42	23,70
	Pi, mg%	6,14	5,25	5,57	5,65	5,24	4,79	4,31	4,78	4,48	5,02	4,81	4,77	5,07
MMR	OC, ng/mL	81,78	39,39	43,34	54,84	93,19	42,59	27,37	54,38	58,20	33,00	40,66	43,95	51,06
	AP, U/L	31,17	18,40	26,24	25,27	33,24	24,24	22,82	26,77	20,84	18,18	20,58	19,87	23,97
	Pi, mg%	6,27	4,37	6,49	5,71	6,51	4,62	4,76	5,30	6,25	5,81	5,49	5,85	5,62
Médias Means	OC, ng/mL	76,41	35,96	45,56	52,64 ^a	73,87	48,21	25,36	49,15 ^{ab}	58,48	36,74	40,71	45,31 ^b	48,63
	AP, U/L	31,72	21,92	26,69	26,78 ^a	27,38	29,75	27,59	28,24 ^a	21,43	20,69	19,64	20,58 ^b	25,53
	Pi, mg%	6,10	4,84	6,20	5,71 ^a	5,85	4,90	4,58	5,11 ^b	5,28	5,82	5,24	5,45 ^{ab}	5,37

Letras diferentes (a,b,c) na mesma linha indicam diferença estatística entre as médias.

Different letter (a,b,c), in the same row, indicate statistical differences among the means.

¹ Valores médios estimados para tratamento MMC, ano 2, gestação.

¹ Mean estimated values for MMC, year 2, pregnancy.

Tabela 4 - Concentrações médias de deoxipiridinolina (DPD, nmol/ mmol de creatinina) na urina no início do terço final de gestação (G), ao parto (P) e após o terço inicial da lactação (L)

Table 4 - Mean concentrations of deoxypyridinoline (DPD, nmol/mmol of creatinine) in urine in late pregnancy (G), at parturition (P) and in early lactation (L)

Tratamento <i>Treatment</i>	Ano 1 <i>Year 1</i>			Média <i>Mean</i>	Ano 2 <i>Year 2</i>			Média <i>Mean</i>	Ano 3 <i>Year 3</i>			Média <i>Mean</i>	Média geral <i>General mean</i>
	G	P	L		G	P	L		G	P	L		
MMC	3,83	4,93	4,04	4,26	7,35	5,92	18,00	10,42	4,28	16,71	7,38	9,45	8,05 ^A
MM	5,44	6,87	3,05	5,12	3,14	3,31	8,54	5,00	4,43	14,99	4,14	7,85	5,99 ^B
MMR	2,84	1,89	2,89	2,54	4,04	2,50	10,63	5,73	2,24	12,32	3,57	6,04	4,77 ^B
Médias <i>Means</i>	4,04	4,57	3,33	3,98 ^b	4,85	3,91	12,39	7,05 ^a	3,65	14,68	5,03	7,78 ^a	6,55

Letras diferentes (a,b) na mesma linha indicam diferença estatística entre as médias.

Different letter (a,b), in the same row, indicate statistical differences between the means.

Letras diferentes (A,B) na mesma coluna indicam diferença estatística entre as médias.

Different letter (A,B), in the same column, indicate statistical differences between the means.

dezembro. A curva de lactação para vacas Nelore em pastejo, descrita por S'Thiago et al. (2000), mostrou declínio progressivo na produção de leite desde os 30 dias pós-parto (cinco litros/vaca/dia), chegando a produzir menos de 3 kg/vaca/dia aos 150 dias de lactação. Desse modo, em meados de março, época de amostragem, as vacas já passaram pela fase de maior demanda de cálcio e de fósforo para a produção de leite.

Não foi caracterizada perda óssea entre o início do terço final da gestação (meados de agosto) e o período inicial da lactação (meados de março) (Tabela 5). Não é possível separar os efeitos da gestação e da lactação sobre o osso. Observou-se aumento na concentração de cálcio no osso entre a gestação e o início da lactação. Dessa forma, espessura da cortical (P=0,14), teor de cinzas (P=0,13), gravidade específica (P=0,18) e razão Ca/P (P=0,13) tenderam a ser mais altos na lactação, mas, assim como as concentrações de fósforo nas cinzas e por volume de osso ou PxCort, não apresentaram variação significativa com a época de amostragem.

Meses de seca antecederam a amostragem de agosto, e a menor disponibilidade de nutrientes poderia interferir nos parâmetros ósseos avaliados na gestação. Entretanto, o suplemento protéico-energético recebido na seca pelas vacas do tratamento MMR, aparentemente, não foi capaz de alterar as médias observadas nas biópsias, uma vez que a interação entre tratamento e época não foi significativa para qualquer parâmetro ósseo.

Nas biópsias de costela, a medida de atividade óssea limita-se a uma pequena área de osso compacto e pode não representar o esqueleto como um todo. Fishwick et al. (1977) relataram alterações significa-

tivas na densidade radiográfica em ossos da cauda de vacas recebendo ou não fósforo suplementar no pós-parto, que não foi detectada nas medidas de biópsia de costela. Essa limitação é superada pelos marcadores de metabolismo ósseo (Kleerekoper, 2001). Os marcadores ósseos mostraram-se úteis quando avaliados em ensaios clínicos e contribuem para o entendimento do metabolismo ósseo. Entretanto, comparações entre valores obtidos por técnicas diferentes e em diferentes laboratórios são desaconselhadas (Christenson, 1997; Kleerekoper, 2001). Portanto, os valores numéricos obtidas nesta pesquisa, especialmente para osteocalcina, podem não ser adequados para comparações com os dados de outros estudos.

As concentrações de osteocalcina obtidas neste estudo foram maiores durante a gestação, tendência seguida pela fosfatase alcalina óssea (Tabela 6). Este fato indica que os processos de formação de osso se encontravam especialmente ativos no início do terço final da gestação, em plena estação seca (agosto), justamente quando o marcador de reabsorção óssea (deoxipiridinolina) estava em seus níveis mais baixos. Ao parto, as concentrações de osteocalcina reduziram significativamente (P<0,01), assim como as de fosfatase alcalina óssea (P=0,08); esses valores mantiveram-se na coleta efetuada após os três meses de lactação.

Queda progressiva na taxa de formação de osso foi descrita por van Mosel et al. (1990), usando histometria associada ao uso de fluorocromos nos dois últimos meses de gestação ao parto, em vacas leiteiras. Esses dados corroboram relatos de Van Mosel & Corlett (1990), que relataram queda progressiva nos valores circulantes de osteocalcina.

Tabela 5 - Parâmetros de osso: médias de espessura do osso cortical, concentração de cinzas no osso seco e desengordurado e gravidade específica, concentração de Ca e P nas cinzas, P expresso por unidade de volume no osso fresco e razão Ca/P em biópsias de costela obtidas na gestação (G) e na lactação (L)

Table 5 - Bone parameter means: cortical thickness, ash concentration in defatted dried bone, specific gravity, calcium and phosphorus concentration in the ashes, P expressed in unit of volume of wet bone and total P amount (PxCort) and Ca/P ratio in rib biopsies obtained during late gestation (G) and early lactation (L)

Tratamento Treatment	Variáveis Variables	Época Period		
		G	L	
MMC	Cortical, mm <i>Cortical</i>	3,58	3,82	
	Cinzas, % <i>Ashes</i>	64,37	65,59	
	Gravidade específica <i>Specific gravity</i>	1,83	1,87	
	Ca, %	34,78	36,11	
	P, %	17,44	17,84	
	P mg/cc	159,20	170,19	
	PxCort	305,9	342,0	
	Ca/P	2,01	2,03	
	MM	Cortical, mm <i>Cortical</i>	3,39	3,53
		Cinzas, % <i>Ashes</i>	65,06	65,15
Gravidade específica <i>Specific gravity</i>		1,86	1,86	
Ca, %		34,61	36,43	
P, %		18,46	18,06	
P mg/cc		180,20	163,97	
PxCort		309,7	309,8	
Ca/P		1,88	2,02	
MMR		Cortical, mm <i>Cortical</i>	3,42	3,74
		Cinzas, % <i>Ashes</i>	64,58	65,01
	Gravidade específica <i>Specific gravity</i>	1,84	1,87	
	Ca, %	34,51	35,95	
	P, %	18,72	17,96	
	P mg/cc	176,24	171,66	
	PxCort	322,0	343,9	
	Ca/P	1,86	2,01	
	Médias Means	Cortical, mm <i>Cortical</i>	3,46	3,70
		Cinzas, % <i>Ashes</i>	64,67	65,25
Gravidade específica <i>Specific gravity</i>		1,84	1,87	
Ca, %		34,63 ^b	36,16 ^a	
P, %		18,21	17,95	
P mg/cc		171,88	168,61	
PxCort		312,5	331,9	
Ca/P	1,92	2,02		

Letras diferentes (a,b) na mesma linha indicam diferença estatística entre as médias.
Different letter (a,b), in the same row, indicate statistical differences among the means.

Tabela 6 - Variáveis de sangue e urina: concentrações médias de osteocalcina(OC), fosfatase alcalina óssea (AP) e fósforo inorgânico (Pi) no plasma e de deoxipiridinolina (DPD) na urina no início do terço final de gestação (G), ao parto (P) e após o terço inicial da lactação (L)

Table 6 - Mean concentrations of osteocalcin (OC), bone alkaline phosphatase (AP), inorganic phosphorus (Pi) in the plasma and deoxypyridinoline (DPD) in the urine of beef cows in late gestation (G) and early lactation (L)

Tratamento Treatment	Variáveis Variables	Época Period		
		G	P	L
MMC	OC, ng/mL	70,22	43,82	39,39
	AP, U/L	28,04	29,10	26,65
	Pi, mg%	5,60	5,60	5,55
	DPD	5,15	9,19	9,80
MM	OC	60,82	38,75	35,12
	AP	24,07	22,98	24,05
	Pi	5,28	5,02	4,89
	DPD	4,33	8,39	5,24
MMR	OC	77,72	38,33	37,12
	AP	28,42	20,28	23,21
	Pi	6,34	4,93	5,58
	DPD	3,04	5,57	5,70
Médias Means	OC	69,59 ^a	40,30 ^b	37,21 ^b
	AP	26,84	24,12	24,64
	Pi	5,74	5,18	5,34
	DPD	4,18 ^b	7,71 ^a	6,92 ^a

Letras diferentes (a,b) na mesma linha indicam diferença estatística entre as médias.
Different letter (a,b), in the same row, indicate statistical differences among the means.

Liesegang et al. (2000) descreveram o comportamento de marcadores ósseos entre 14 dias antes do parto aos oito meses pós-parto de vacas leiteiras. Osteocalcina estava marcadamente baixa 14 dias pós-parto. Queda nas concentrações de osteocalcina no período próximo ao parto também foi verificada por Naito et al. (1990) e por Larsen et al. (2001), mas os primeiros autores relataram recuperação nas concentrações de osteocalcina já aos 15 dias pós-parto. Segundo Liesegang et al. (2000), as concentrações de osteocalcina elevaram-se continuamente até 60 dias pós-parto e decresceram a seguir até o final do período experimental. É possível que o pico de osteocalcina aos 60 dias observado pelos pesquisadores tenha sido perdido, no presente trabalho, pelo intervalo das datas de coletas ou pela variação menos acentuada deste marcador em vacas Nelore, graças às diferenças em produção, às curvas de lactação e ao manejo nutricional. Outro aspecto é que Liesegang et al. (2000) não mencionaram nova cobertura das

vacas após o parto, enquanto as vacas deste trabalho voltavam logo a ser cobertas.

Deoxipiridinolina aumentou bastante da gestação ao parto e lactação (Tabela 6), indicando maior atividade de reabsorção óssea nesses períodos, como relatado por Barton et al. (1987). Liesegang et al. (2000) relataram rápido aumento da deoxipiridinolina entre 14 dias pré e pós-parto, seguindo de lento decréscimo até 150 dias pós-parto. Este padrão é comparável ao observado nesta pesquisa.

Sugeriu-se que fêmeas no final da gestação e início da lactação não seriam capazes de atender às demandas de cálcio e de fósforo com a dieta – déficit que seria compensado pela mobilização das reservas ósseas. Portanto, a taxa de reabsorção do osso aumentaria bastante neste período, enquanto a formação de osso permaneceria constante até o meio da lactação. Somente a partir deste ponto, a reabsorção de osso reduzir-se-ia significativamente e as deposições de cálcio e de fósforo no osso elevar-se-iam, permitindo o reestabelecimento das reservas ósseas (Braithwaite, 1983a, b; Liesegang et al., 2000; Wu et al., 2001).

Corroborando a argumentação de Braithwaite (1983b), Wu et al. (2001) salientaram que a concentração de P na dieta não deveria ser reduzida em função da menor produção de leite, uma vez que, ao final da gestação, haveria provável aumento de demanda por P, graças à necessidade de reposição deste elemento no osso, ao rápido crescimento do feto e dos anexos fetais, bem como ao aumento na concentração de P no leite produzido.

Os tratamentos adotados neste experimento interferiram com as concentrações de deoxipiridinolina medidas nas diferentes épocas de amostragem ($P < 0,05$). No primeiro ano experimental, as concentrações de deoxipiridinolina no tratamento MMR foram de 38% a 27% do valor alcançado ao parto pelos tratamentos MMC e MM, respectivamente, indicando menor reabsorção de osso nas vacas primíparas que recebiam suplemento protéico-energético (Tabela 4). Nos demais anos, este tratamento manteve valores de deoxipiridinolina mais baixos que MMC, ficando MM em um nível intermediário. Braithwaite (1978) sugeriu que a deficiência de proteína poderia levar ao aumento na reabsorção óssea em ovelhas gestantes, causada por redução da taxa de absorção de cálcio. Vale ressaltar que o suplemento protéico-energético foi fornecido apenas durante a seca, ou seja, durante parte da gestação, indicando se tratar, nesta pesquisa, de um efeito residual.

A amplitude de variação nas concentrações de osteocalcina parece ser maior em vacas mais jovens, podendo dobrar ou triplicar na gestação, quando comparada às outras épocas de coleta. Osteocalcina e fosfatase alcalina óssea não variaram significativamente entre tratamentos, mas tenderam a apresentar valores mais baixos para as vacas que receberam MM.

O número de partos/vaca foi uma covariável importante ($P < 0,05$) apenas para osteocalcina, mas pode haver confundimento, porque o número de partos/vaca aumentou com o passar do tempo. Quando os dados do terceiro ano foram analisados separadamente, o efeito de número de partos desapareceu.

As médias dos tratamentos mantiveram-se dentro dos valores normais para a espessura da cortical (Tabelas 1 e 5), situando-se entre 3 e 4 mm (deficiência < 2 mm; Little, 1984), e para a concentração de cinzas (deficiência $< 60,5\%$; Ammerman et al., 1974). As concentrações de cálcio nas cinzas foram frequentemente menores que 36% (Tabelas 1 e 5), o que indica deficiência deste elemento (Fick et al., 1980) em todos os tratamentos. Beighle et al. (1994) encontraram 34,4% de Ca nas cinzas, em vacas consideradas normais da África do Sul. É possível que os valores sugeridos por Fick et al. (1980) estejam superestimados, ou que as vacas não tenham ingerido quantidades adequadas de todos os nutrientes necessários para manutenção da estrutura óssea. A concentração de cálcio na forrageira estava adequada (Ca $> 0,28\%$ na matéria seca), devendo-se ressaltar que as vacas não exibiram qualquer indicação de deficiência de cálcio, observando-se desempenho reprodutivo satisfatório.

As concentrações de P nas cinzas (Tabelas 2 e 5) mantiveram-se marginais (deficiência $< 17\%$; Fick et al., 1980), apesar de as vacas de dois dos tratamentos (MMC e MMR) terem consumido fósforo suplementar em quantidades adequadas, todo o ano. O fósforo fítico, encontrado em grãos de cereais, é considerado de boa disponibilidade para bovinos adultos (Clark et al., 1986). Assim, embora as vacas de MMR recebessem mistura mineral sem uma fonte de fósforo, o aporte de P via concentrado foi considerado adequado. Tem-se questionado a validade dos valores de referência internacionais (Wadsworth et al., 1990). Wu et al. (2001) também observaram valores médios de P nas cinzas em vacas leiteiras em torno de 17%, mas sem sinais de deficiências. Observação semelhante foi feita por Beighle et al. (1994), em bovinos na África do Sul.

Conclusões

Independentemente dos tratamentos estudados, vacas de cria não apresentaram sinais de deterioração da qualidade do osso em três anos de experimento. A boa qualidade das pastagens na seca pode ter contribuído para esse resultado. As taxas de formação e reabsorção de osso variaram em função da fase do ciclo reprodutivo, mas podem ser moduladas pela dieta, reduzindo ou aumentando a intensidade da resposta. A suplementação protéico-energética na seca manteve a reabsorção óssea em patamares mais baixos, e foi especialmente importante para vacas primíparas. Os marcadores ósseos osteocalcina e fosfatase alcalina óssea indicaram maior taxa de formação de osso no início do terço final de gestação, com queda ao parto e se mantendo baixos na coleta aos três meses de lactação. A reabsorção óssea aumentou significativamente da gestação para o parto, mantendo-se elevada aos três meses de lactação.

Agradecimento

Ao Dr. Rafael Geraldo de O. Alves, pela orientação estatística inicial; à Geni Passos Miranda, Ernani Miranda da Fonseca e Jacir Vieira de Barros, pelo auxílio nos trabalhos de campo; e à Sandra Helena Ratier, pelos serviços de laboratório.

Literatura Citada

- AMMERMAN, C.B.; LOAIZA, J.M.; BLUE, W.G. et al. Mineral composition of tissues from beef cattle under grazing conditions in Panama. **Journal of Animal Science**, v.38, n.1, p.158-162, 1974.
- BARTON, B.A.; JORGENSEN, N.A.; DELUCA, H.F. Impact of prepartum dietary phosphorus intake on calcium homeostasis at parturition. **Journal of Dairy Science**, v.70, n.6, p.1186-1191, 1987.
- BEIGHLE, D.E.; BOYAZOGLU, P.A.; HEMKEN, R.W. et al. A. Determination of calcium, phosphorus, and magnesium values in rib bones from clinically normal cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v.55, n.1, p.85-89, 1994.
- BONJOUR, J.P.; AMMANN, P.; CHEVALLEY, T. et al. Protein intake and bone growth. **Canadian Journal of Applied Physiology**, v.26, suppl. p.S153-166, 2001.
- BORTOLUSSI, G.; TERNOUTH, J.H.; McMENIMAN, N.P. Dietary nitrogen and phosphorus depletion in cattle and their effects on liveweight gain, blood metabolite concentrations and phosphorus kinetics. **Journal of Agricultural Science**, v.126, n.4, p.493-501, 1996.
- BORTOLUSSI, G.; TERNOUTH, J.H.; McMENIMAN, N.P. Phosphorus repletion of cattle previously exposed to dietary nitrogen and phosphorus deficiencies. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.50, n.1, p.93-99, 1999.

- BOURRIN, S.; AMMANN, P.; BONJOUR, J. P. et al. Dietary protein restriction lowers plasma insulin-like growth factor I (IGF-I), impairs cortical bone formation, and induces osteoblastic resistance to IGF-I in adult female rats. **Endocrinology**, v.141, n.9, p.3149-3155, 2000.
- BRAITHWAITE, G.D. The effect of dietary protein intake on calcium metabolism of the pregnant ewe. **British Journal of Nutrition**, v.40, n.3, p.505-507, 1978.
- BRAITHWAITE, G.D. Calcium and phosphorus requirements of the ewe during pregnancy and lactation. 1. Calcium. **British Journal of Nutrition**, v.50, n.3, p.711-722, 1983a.
- BRAITHWAITE, G.D. Calcium and phosphorus requirements of the ewe during pregnancy and lactation. 2. Phosphorus. **British Journal of Nutrition**, v.50, n.3, p.723-736, 1983b.
- CALL, J.W.; BUTCHER, J.E.; SHUPE, J.L. et al. Clinical effects of low dietary phosphorus concentrations in feed given to lactating dairy cows. **American Journal of Veterinary Research**, v.48, n.1, p.133-136, 1987.
- CHRISTENSON, R.H. Biochemical markers of bone metabolism: an overview. **Clinical Biochemistry**, v.30, n.8, p.573-593, 1997.
- CLARK JR., W.D.; WOHLT, J.E.; GILBREATH, R.L. et al. Phytate phosphorus intake and disappearance in the gastrointestinal tract of high producing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.69, n.12, p.3151-3155, 1986.
- FICK, K.R.; MCDOWELL, L.R.; MILES, J.H. et al. **Métodos de análises de minerais em tecidos de animais e de plantas**. 2.ed. Gainesville: University of Florida, 1980. Paginação descontínua.
- FISHWICK, G.; FRASER, J.; HEMINGWAY, R.G. et al. The effects of dietary phosphorus inadequacy during pregnancy and lactation on the voluntary intake and digestibility of oat straw by beef cows and the performance of their calves. **Journal of Agricultural Science**, v.88, n.1, p.143-150, 1977.
- GREEN, J.H. Correlations between biochemical markers of bone resorption and creatinine excretion. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v.61, n.1, p.27-32, 2001.
- KLEEREKOPER, M. Biochemical markers of bone turnover: why theory, research, and clinical practice are still in conflict. **Clinical Chemistry**, v.47, n.8, p.1347-1349, 2001.
- LARSEN, T.; MOLLER, G.; BELLIO, R. Evaluation of clinical and clinical chemical parameters in periparturient cows. **Journal of Dairy Science**, v.84, n.7, p.1749-1758, 2001.
- LEE, M.; MYERS, G.S. The effect of protein-energy malnutrition on appositional bone growth in the rat. **Experientia**, v.35, n.6, p.824-825, 1979.
- LIESEGANG, A.; EICHER, R.; SASSI, M.L. et al. Biochemical markers of bone formation and resorption around parturition and during lactation in dairy cows with high and low standard milk yields. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.8, p.1773-1781, 2000.
- LITTLE, D.A. Bone biopsy in cattle and sheep for studies of phosphorus status. **Australian Veterinary Journal**, v.48, n.12, p.668-670, 1972.
- LITTLE, D.A. Definition of an objective criterion of body phosphorus reserves in cattle and its evaluation *in vivo*. **Canadian Journal of Animal Science**, v.64, suppl., p.229-231, 1984.
- McMENIMAN, N.P.; LITTLE, D.A. Studies on the supplementary feeding of sheep consuming mulga (*Acacia aneura*). I. The precision of phosphorus and molasses supplements under grazing condition. **Australian Journal**

- of **Experimental Agricultural Research and Animal Husbandry**, v.14, n.68, p.316-321, 1974.
- NAITO, Y.; SHINDO, N.; SATO, R. et al. Plasma osteocalcin in preparturient and postparturient cows: correlation with plasma 1,25-dihydroxyvitamin D, calcium, and inorganic phosphorus. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.3481-3484, 1990.
- NAKAMOTO, T.; MILLER, S.A. Effect of protein-energy malnutrition on the growth of mandible and long bone in newborn male and female rats. **Journal of Nutrition**, v.107, n.6, p.983-989, 1977.
- SCHURCH, M.A.; RIZZOLI, R.; SLOSMAN, D. et al. Protein supplements increase serum insulin-like growth factor-I levels and attenuate proximal femur bone loss in patients with recent hip fracture. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Annals of Internal Medicine**, v.128, n.10, p.801-809, 1998.
- S'THIAIGO, L.R.L.; MORAES, S.S.; NICODEMO, M.L.F. et al. Efeito do fósforo suplementar sobre o desempenho reprodutivo de vacas de corte em pastagem de *Brachiaria humidicola*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.2, p.449-456, 2000.
- STATISTICAL ANALYSES SYSTEM - SAS. **User's guide: basics**. Cary: 1985. 1290p.
- SHUPE, J.L.; BUTCHER, J.E.; CALL, J.W. et al. Clinical signs and bone changes associated with phosphorus deficiency in beef cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v.49, n.9, p.1629-1636, 1988.
- SIEBERT, B.D.; NEWMAN, D.M.R.; HART, B. et al. Effects of feeding varying levels of protein and phosphorus in relation to bone disorders in cattle. **Australian Journal of Experimental Agriculture and Husbandry**, v.15, p.321-324, 1975.
- SOLIMAN, A.T.; MADINA, E.H.; MORSI, M.R. Radiological, biochemical, and hormonal changes in malnourished children with rachitic manifestations. **Journal of Tropical Pediatrics**, v.42, n.1, p.34-37, 1996.
- SYKES, A.R.; FIELD, A.C. Effects of dietary deficiencies of energy, protein and calcium on the pregnant ewe. I. Body composition and mineral content of the ewe. **Journal of Agricultural Science**, v.78, p.109-117, 1972.
- TALBOTT, S.M.; CIFUENTES, M.; DUNN, M.G. et al. Energy restriction reduces bone density and biomechanical properties in aged female rats. **Journal of Nutrition**, v.131, n.9, p.2382-2387, 2001.
- TALBOTT, S.M.; ROTHKOPF, M.M.; SHAPSES, S.A. Dietary restriction of energy and calcium alters bone turnover and density in younger and older female rats. **Journal of Nutrition**, v.128, n.3, p.640-645, 1998.
- TUEN, A. A.; WADSWORTH, J. C.; MURRAY, M. Absorption of calcium and phosphorus by growing cattle during protein deficiency. **Proceedings of the Nutrition Society of Australia**, v.9, p.144-147, 1984.
- Van DE BRAAK, A.E.; VAN'T KLOOSTER, A.T.; GOEDEGEBUURE, S.A. et al. Effects of calcium and magnesium intakes and feeding level during the dry period on bone resorption in dairy cows at parturition. **Research in Veterinary Science**, v.43, n.1, p.7-12, 1987.
- Van MOSEL, M.; CORLETT, S.C. Assessment of bone turnover in the dry period of dairy cows by measurement of plasma bone GLA protein, total plasma alkaline phosphatase activity and urinary hydroxyproline. **Experimental Physiology**, v.75, n.6, p.827-837, 1990.
- Van MOSEL, M.; Van'T KLOOSTER, A.T.; MALESTEIN, A. Effects of an inadequate dietary intake of magnesium on osteogenesis in dairy cows during the dry period. **Research in Veterinary Science**, v.48, n.3, p.280-287, 1990.
- WADSWORTH, J.C.; MCLEAN, R.W.; COATES, D.B. et al. Phosphorus and beef production in northern Australia. 5. Animal phosphorus status and diagnosis. **Tropical Grasslands**, v.24, p.185-196, 1990.
- WU, Z.; SATTER, L.D.; BLOHOWIAK, A.J. et al. Milk production, estimated phosphorus excretion, and bone characteristics of dairy cows fed different amounts of phosphorus for two or three years. **Journal of Dairy Science**, v.84, n.7, p.1738-1748, 2001.
- ZANKER, C.L.; SWAINE, I.L. Responses of bone turnover markers to repeated endurance running in humans under conditions of energy balance or energy restriction. **European Journal of Applied Physiology**, v.83, n.4-5, p.434-440, 2000.

Recebido em: 23/05/03

Aceito em: 25/10/04