

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**GRAU DE INFILTRAÇÃO LIPÍDICA NO FÍGADO EM RELAÇÃO A
INDICADORES SANGUÍNEOS DE FUNCIONALIDADE HEPÁTICA E
VARIAÇÃO DA CONDIÇÃO CORPORAL EM VACAS LEITEIRAS**

TESE DE DOUTORADO

Chester Patrique Batista

Porto Alegre
2019

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**GRAU DE INFILTRAÇÃO LIPÍDICA NO FÍGADO EM RELAÇÃO A
INDICADORES SANGUÍNEOS DE FUNCIONALIDADE HEPÁTICA E
VARIAÇÃO DA CONDIÇÃO CORPORAL EM VACAS LEITEIRAS**

Autor: Chester Patrique Batista, MV, MSc

**Tese apresentada como requisito parcial
para a obtenção do título de doutor em
Ciências Veterinárias**

Orientador: Prof. Félix H. D. González

**Porto Alegre
2019**

“O presente trabalho foi realizado com o apoio da coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior- Brasil (CAPES)- código de financiamento 001”

CIP - Catalogação na Publicação

Batista, Chester Patrique
GRAU DE INFILTRAÇÃO LIPÍDICA NO FÍGADO EM RELAÇÃO A
INDICADORES SANGUÍNEOS DE FUNCIONALIDADE HEPÁTICA E
VARIAÇÃO DA CONDIÇÃO CORPORAL EM VACAS LEITEIRAS / Chester
Patrique Batista. -- 2019.
84 f.
Orientador: Félix Hilario Diaz González.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-
RS, 2019.

1. Lipidose hepática. 2. Período de transição. 3.
Bioquímica clínica. I. Diaz González, Félix Hilario,
orient. II. Título.

Chester Patrique Batista

GRAU DE INFILTRAÇÃO LIPÍDICA NO FÍGADO EM RELAÇÃO A
INDICADORES SANGUÍNEOS DE FUNCIONALIDADE HEPÁTICA E
VARIAÇÃO DA CONDIÇÃO CORPORAL EM VACAS LEITEIRAS

Aprovada em 15 março de 2019.

APROVADO POR:

Félix H. D. González
Orientador e Presidente da Comissão Avaliadora

Sérgio Ceroni da Silva (Universidade Federal do Rio Grande do Sul)
Membro da Comissão Avaliadora

Carlos Bondan (Universidade de Passo Fundo)
Membro da Comissão Avaliadora

Rodrigo de Almeida (Universidade Federal do Paraná)
Membro da Comissão Avaliadora

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos de forma integral e irrestrita contribuíram para este momento.

Dedico aos meus pais pelo apoio e compreensão com a minha obsessão pelos estudos e a ausência do convívio do lar.

Dedico aos meus avôs pelos cuidados e carinho a mim empregado.

Dedico aos meus amigos e colegas de trabalho pela ajuda e pela compreensão nos momentos de ausência.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por ter me proporcionado e permitido chegar a este momento da conclusão de uma importante fase da minha vida. Foram muitos anos de total preparação e dedicação irrestrita para concluir este ciclo, que com a permissão de Deus está se findando da melhor forma possível.

Aos meus pais Laerte e Rosane Batista, pelo amor, palavras sábias que me ensinaram a viver com dignidade. Minha eterna gratidão, pois sei que muitos dos seus sonhos foram renunciados em prol dos meus.

Aos meus avôs Ivo e Iolanda Breunig, pelo amor, apoio e carinho com que me cuidam até hoje.

Ao orientador, Félix H. D. González muito obrigado por ter me dado a honra de ser orientado pelo senhor! Pelos ensinamentos, experiência, confiança e principalmente amizade. Enfim, tenho orgulho e terei eternamente por ter sido orientado pelo senhor e pelo o que o seu legado representa para a ciência leiteira.

Aos amigos Giovani e Mirela Noro agradeço do fundo do coração, pois mais do que amigos e colegas vocês foram irmãos do peito que a vida me deu, com uma amizade pura e verdadeira.

Ao amigo Cristian Nied pela companhia nas aulas, e os ensinamentos transmitidos, claro que além dos mates cevados e das longas viagens até Porto Alegre.

À fazenda Santa Isabel, na pessoa dos proprietários Diogo e Margareth Strobel Vincenzi pelo apoio para que eu pudesse ir as aulas do doutorado e para rodar os experimentos. Agradeço muito pois vocês permitiram que eu pudesse expressar todo meu conhecimento em prol da ciência e das fazendas leiteiras.

Ao Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (LACVET- UFRGS) na pessoa das colegas Angélica e Laura, as quais muito me ajudaram no laboratório e com as que sempre pude contar.

Aos amigos e irmãos Otávio Meotti, e Valdoir Cavalheiro pela ajuda com as coletas de campo dos animais nos vários experimentos que trabalhamos juntos, e com os momentos de descontração e trabalho na fazenda.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Enfim, meu muito obrigado a todos! Serei eternamente grato a vocês.

“A vitória está reservada para aqueles que
estão dispostos a pagar o preço”.

(Sun Tzu)

Grau de infiltração lipídica no fígado em relação a indicadores sanguíneos de funcionalidade hepática e variação da condição corporal em vacas leiteiras

Autor: Chester Patrique Batista

Orientador: Félix Hilário Díaz González

Resumo

A baixa funcionalidade hepática tem se apresentado de forma incisiva nos rebanhos leiteiros, causando severas perdas diretas e indiretas ao desempenho dos animais. Geralmente afeta os animais no período final da gestação e o início da lactação, as quais são fases de intensa demanda energética em que geralmente as demandas não acompanham o consumo alimentar. Os principais problemas relacionados com ela são a baixa produção de leite, menor eficiência reprodutiva, aumento da incidência de outras doenças e descarte involuntário. Durante o período de transição, a diminuição no consumo de matéria seca e o aumento da demanda energética, promovem uma lipomobilização que incrementa as concentrações séricas dos ácidos graxos não esterificados (NEFA) e do beta-hidroxibutirato (BHB). O aumento destes parâmetros indica um maior grau de balanço energético negativo, que pode levar um acúmulo de triglicerídeos e lipídeos totais no fígado originando a lipidose hepática. O presente estudo teve como objetivos: (1) Associar os metabólitos com o grau de infiltração lipídica e com a perda de condição corporal avaliada de forma objetiva (câmera de escore) e subjetiva (escala visual de Ferguson), bem como comparar o grau de concordância dos dois métodos de avaliação; (2) Correlacionar o grau de infiltração lipídica com o índice de função hepática (IFH); (3) Comparar os valores dos indicadores bioquímicos com o grau de infiltração lipídica no pré e pós-parto. Para tanto foram realizados dois estudos. No primeiro estudo, foram utilizadas 51 vacas leiteiras multíparas da raça Holandesa, avaliadas durante os primeiros 28 dias de lactação. Foi determinado o grau de infiltração lipídica mediante histopatologia hepática. Simultaneamente foram realizadas amostragens de sangue para avaliação dos indicadores de lesão e função hepática (AST, GGT, FA, albumina, bilirrubina, colesterol) e a avaliação do escore de condição corporal. Diferentemente do esperado, as vacas de ambos os grupos de coleta não apresentaram grau de infiltração lipídica considerável, e somente alguns animais apresentaram grau leve de infiltração. A perda

de condição corporal foi de 0,19 pontos para o método subjetivo e 0,17 pontos para o método objetivo entre o 3º e o 28º dia pós-parto. As concentrações de BHB, NEFA, GGT, AST, FA, e bilirrubina sofreram diminuição entre os dois períodos. No entanto, houve aumento dos valores de albumina e colesterol no mesmo período. Independente do grupo, todas as vacas apresentaram hipocolesterolemia no pós-parto imediato. Houve uma correlação positiva e significativa entre os métodos subjetivo e objetivo de avaliação do ECC. Comparação nos metabólitos de vacas com e sem lipidose (total) o único metabólito alterado foi o colesterol das vacas com lipidose hepática, os demais estavam dentro dos intervalos de referência. As vacas com lipidose hepática no pós-parto apresentaram índice de função hepática menor (-3,46), comparado com vacas sem lipidose (-1,02), podendo o IFH ser usado como teste indicativo de lipidose hepática. No segundo estudo foram utilizadas 54 vacas leiteiras multíparas da raça Holandesa, divididas em dois grupos (pré e pós-parto). Foi determinado a infiltração lipídica mediante a técnica de extração química de lipídeos hepáticos. Simultaneamente foram realizadas amostragens de sangue para avaliação dos indicadores bioquímicos. Ocorrência de lipidose severa encontrada no estudo foi de 20% das vacas no pré e pós-parto. Foram encontradas correlações positivas entre os dias ao leite (DIM) e aspartato aminotransferase (AST), entre colesterol e triglicerídeos plasmáticos (TRp), entre triglicerídeos hepáticos (TG) e AST, entre NEFA e AST, e entre creatina quinase (CK) e AST, e correlações negativas entre TRp e DIM, assim como entre TG e TRp. Conclui-se que a incidência da lipidose hepática leve atinge as vacas leiteiras alterando o perfil bioquímico de forma discreta, tendo o controle do ECC das vacas um dos fatores chave para minimizar esta patologia e suas consequências.

Palavras chave: Biopsia hepática, balanço energético negativo, infiltração lipídica, período de transição.

Degree of liver lipid infiltration relative to blood indicators of liver function and variation of body condition score in dairy cows

Author: Chester Patrique Batista

Advisor: Félix Hilário Díaz González

ABSTRACT

Impaired liver function is frequently observed in dairy herds, and directly and indirectly account for performance losses. It usually affects cows at the end of gestation and beginning of lactation. The high energy requirements of cows during this transition stage are often not met due to their low feed intake, resulting in low milk yield, poor reproductive efficiency, increased incidence of diseases, and involuntary culling. In order to cope with this energy deficit, body fat is mobilized, increasing serum levels of non-esterified fatty acids (NEFA) and beta-hydroxybutyrate (BHB). Increased NEFA and BHB levels indicate negative energy balance, which may result in the accumulation of triglycerides (TG) and total lipids in the liver leading to hepatic lipidosis. The objectives of the present study were: (1) to establish a possible association of blood metabolites with the degree of liver lipid infiltration and body condition score (BCS), evaluated both objectively (score camera) and subjective (Ferguson visual scale), as well as to compare the degree of agreement between these two BCS evaluation methods; (2) to correlate the degree of lipid infiltration with liver function index (LFI); (3) to compare biochemical indicator values with the degree of lipid infiltration during the pre- and postpartum periods. Two studies were carried out. In the first study, 51 Holstein multiparous dairy cows were evaluated during the first 28 days of lactation. Liver lipid infiltration degree was determined by histopathology. At the time of liver biopsy, blood samples were collected to evaluate liver lesion and function indicators (AST, GGT, AF, albumin, bilirubin, cholesterol) and BCS was evaluated. Unexpectedly, no significant liver lipid infiltration degree differences were detected between cows pre- or postpartum; only a few animals presented a slight degree of infiltration. Body condition losses of 0.19 and 0.17 points between 3 and 28 days postpartum were determined using the objective and subjective methods, respectively. Blood BHB, NEFA, GGT, AST, FA, and bilirubin levels were reduced between both periods, while albumin and cholesterol levels increased. Independently of the group, all

cows presented hypocholesterolemia in the immediate postpartum period. There was a positive and significant correlation between the subjective and objective BCS evaluation methods. All evaluated metabolites of cows with and without lipidosis were within the reference intervals, except for the blood cholesterol of cows with hepatic lipidosis. Cows with hepatic lipidosis during postpartum period presented lower liver function index (-3.46) compared with those without lipidosis (-1.02), suggesting that this index may be used as an indicator of hepatic lipidosis. In the second study, 54 multiparous Holstein dairy cows were divided into two groups (prepartum and postpartum). Liver lipid infiltration was determined by the chemical extraction of liver lipids. Blood samples were collected at the time of liver biopsy to evaluate the biochemical indicators. The overall incidence of severe liver lipidosis was 20%. Positive correlations between days in milk (DIM) and aspartate aminotransferase activity (AST), between plasma cholesterol and plasma triglyceride (TGp) levels, between liver triglyceride (TGl) levels and AST, between NEFA and AST, and between creatine kinase (CK) and AST activities were determined, whereas negative correlations between TGp and DIM, and between TGl and TGp were detected. It is concluded that mild hepatic lipidosis in dairy cows promotes moderate changes in their biochemical profile, and the control of BCS is one of the key factors to minimize this disorder and its consequences.

Keywords: liver biopsy, negative energy balance, fat infiltration, transition period.

LISTA DE FIGURAS

Figura Artigo Científico 1

- Figura 1** Mostra a correlação entre o escore de condição corporal (ECC) obtido de forma subjetiva (visual) e objetiva (camera) no 3° e 28° dia pós-parto..... 47
- Figura 2** Mostra a correlação entre a diferença (Δ) obtida pela forma subjetiva e objetiva de avaliação. 47

Figuras Artigo Científico 2

- Figure 1** Correlation of days in milk (DIM) with:(A) plasma triglycerides (TRp) and (B) with AST plasma activity..... 72
- Figure 2** Correlation between: (A) plasma triglycerides (TRp) and liver triglycerides (TG), (B) plasma triglycerides (TRp) and free fatty acids (NEFA) and (C) plasma triglycerides (TRp) and cholesterol (COL)..... 72
- Figure 3** Correlation between: (A) aspartate aminotransferase (AST) and liver triglycerides (TGI), (B) aspartate aminotransferase (AST) and free fatty acids (NEFA), and (C) aspartate aminotransferase (AST) and creatine kinase (CK)..... 73

LISTA DE TABELAS

Tabelas Artigo Científico 1

Tabela 1-	Valores médios e desvio padrão dos metabólitos, escore de condição corporal (ECC) no terceiro e vigésimo oitavo dia pós-parto (N= 51)..	47
Tabela 2-	Valores médios e desvio padrão dos metabólitos e escore de condição corporal (ECC), no terceiro e vigésimo oitavo dia pós-parto das vacas com lipidose (N= 5).....	47
Tabela 3	Valores médios e desvio padrão dos metabólitos das vacas com sem lipidose hepática.....	48

Tabela Artigo Científico 2

Table 1-	Mean values and of standard deviation of liver triglycerides and plasma biochemical indicators in pre-calving and postpartum dairy cows.....	74
Table 2	Mean values and of standard deviation of liver triglycerides and plasma biochemical indicators in cows with lipidoses and without lipidoses hepatic.....	75

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	15
2.OBJETIVOS	17
2.1 Objetivos geral	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 BEN e Lipomobilização	20
3.2 Lipidose hepática	22
3.3 Estudo do escore de condição corporal.....	24
4.RESULTADOS	26
4.1 Artigo científico 1.....	27
4.1.1 Resumo	27
4.1.2 Introdução	28
4.1.3 Materiais e Métodos.....	29
4.1.4 Resultados.....	33
4.1.5 Discussão	34
4.1.6 Conclusão.....	40
4.1.7 Referências.....	41
4.1.8 Figuras	46
4.1.9 Tabelas	47
4.2 Artigo científico 2.....	49
4.2.1 Abstract.....	49
4.2.2 Introduction.....	51
4.2.3 Materials and Methods.....	52
4.2.4 Results.....	56
4.2.5 Discussion.....	57
4.2.6 Conclusions.....	63
4.2.7 References.....	64
4.2.8 Figures	72
4.2.9 Tables.....	74
5.CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

1. INTRODUÇÃO

O consumo de leite e seus derivados tem acompanhado o homem desde os primórdios das civilizações conhecidas. Por volta de 10.000 anos atrás surgiram os primeiros homens com genes que codificaram para lactose, tendo assim capacidade de digestão deste importante açúcar que compõe o leite (MISRA & GANDA, 2007). A partir de então esta importante fonte de nutrientes vem acompanhando o desenvolvimento da sociedade humana.

De acordo com a Food and Agriculture Organization (FAO, 2019), a demanda por proteína de origem animal irá crescer 70% até 2050. Sendo assim, o leite aparece como uma fonte para complementar a demanda do mundo, não só por proteína, mas também por minerais, vitaminas e energia.

Ainda segundo a FAO, apesar de o Brasil ter o segundo maior rebanho comercial de bovinos leiteiros do mundo, isso não se converte em maior produção, nem produtividade, pois ele só aparece como quinto maior produtor de leite total com 33,5 milhões de toneladas, e com produtividade média muito ruim, ficando na casa dos 1.963 litros/vaca/ano. Ao que indicam estes dados, as vacas leiteiras brasileiras têm uma produção de base extensiva, com baixo aprimoramento genético na média das propriedades rurais. De acordo com Vilela (2015), com os investimentos que vêm sendo realizados no setor, o Brasil seguirá aumentando a produção de leite, e em 2025 produzirá algo em torno de 47,5 milhões de toneladas de leite ao ano.

Segundo o IBGE (2017), o maior estado produtor de leite no Brasil é Minas Gerais com 8.971.000 de litros de leite, seguido pelo Rio Grande do Sul com 4.552.000 litros e do Paraná com 4.438.000 litros. Estes três estados juntos respondem por mais da metade da produção brasileira de lácteos. Os estados da região Sul têm grandes potencialidades capazes de assumir o protagonismo da produção láctea do Brasil no futuro. Na região Noroeste do Rio Grande do Sul, a atividade leiteira está se intensificando nos últimos anos e já responde por mais da metade da produção leiteira do estado. Este crescimento se deve a alguns fatores, como solos férteis, boa produção de grãos e forrageiras e mão de obra especializada na atividade. No entanto, com o aumento da produtividade e, por consequência, da produção desta região, houve

algumas consequências, como o aumento da demanda energética por parte dos animais, e por consequente o aumento dos problemas metabólicos. De acordo com González & Silva (2017), a principal forma que o organismo tem para equilibrar o déficit energético dos bovinos leiteiros é através do aumento da oxidação dos lipídeos de reserva, mas se este processo não ocorrer de forma equilibrada pode trazer algumas consequências, como a cetose e a esteatose hepática. Nos Estados Unidos, a esteatose hepática é um transtorno metabólico que causa grande dispêndio econômico direto e indireto na indústria leiteira (McART, 2012).

Neste contexto global e regional, o presente trabalho vem a contribuir com mais informações clínicas, metabólicas e epidemiológicas desta importante patologia, que acomete os rebanhos leiteiros no mundo todo, causando severas perdas à pecuária leiteira. O presente estudo aborda aspectos metabólicos da esteatose hepática e suas correlações metabólicas, bem como suas variações em função do escore de condição corporal (ECC).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos geral

Estudar a relação entre a infiltração lipídica no fígado com os indicadores metabólicos sanguíneos de lesão e função hepática, bem como com a condição corporal.

2.2 Objetivos específicos

1. Associar os metabólitos com o grau de infiltração lipídica e com a perda de condição corporal avaliada de forma objetiva (câmera de escore) e subjetiva (escala visual de Ferguson), bem como comparar o grau de concordância dos dois métodos de avaliação.
2. Correlacionar o grau de infiltração lipídica com o índice de função hepática (IFH).
3. Comparar os valores dos indicadores bioquímicos com o grau de infiltração lipídica no pré e pós-parto.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A bovinocultura de leite possui um papel de destaque no agronegócio brasileiro. Nos últimos anos houve um aumento expressivo da produtividade de leite por vaca (ALVARENGA, 2015), o que está diretamente relacionado ao aumento do potencial genético dos rebanhos. Além de fornecer um alimento de alto valor nutricional que atende as demandas de segurança alimentar, a bovinocultura de leite desempenha uma função social no que diz respeito à geração de empregos, tendo um forte impacto na distribuição de renda no país (VEIGA, 2001).

Com o aumento do potencial genético dos rebanhos, as vacas leiteiras são selecionadas para ter cada vez maior produção. Entretanto, as vacas geralmente apresentam um ajuste metabólico muito estreito, com demandas nutricionais e de ambiente variáveis durante a lactação (GONZÁLEZ *et al.*, 2000; ALVARENGA, 2015). O período de transição, compreendido entre a 3ª semana pré-parto até a 3ª semana pós-parto, é decisivo para a máxima produção leiteira durante a lactação (GRUMMER, 1995; SMITH & RISCO, 2005; MOTA, 2006), sendo o momento em que os animais sofrem alterações endócrinas, nutricionais e de manejo que interagem entre si, impactando direta e indiretamente na saúde e na produção (SHORT & ADAMS, 1988; MOTA, 2006).

Durante o período pré-parto a queda no consumo de matéria seca é a alteração mais significativa, culminando em um balanço energético negativo (BELL, 1995; HAYIRLI *et al.*, 2002). De acordo com Hayirli *et al.* (2002) e Drackley *et al.* (2005) nas semanas que antecedem ao parto as concentrações de corticoides e estrógenos aumentam drasticamente contribuindo para a queda da ingestão de matéria seca em até 30%. No pós-parto, o consumo de matéria seca se eleva, mas não chega a compensar o aumento da demanda energética exigida pelo início da lactação (DRACKLEY, 2005, SANTOS, 2011), levando a um estado de balanço energético negativo (BEN). Quando esse déficit se instala, os animais utilizam-se de recursos intrínsecos para equalizar essa diferença.

O principal mecanismo compensatório é a mobilização de lipídeos de reserva e a oxidação dos ácidos graxos para formar precursores energéticos (GONZÁLEZ & SILVA, 2017, CORASSIN *et al.*, 2011). Durante esta fase, o tecido adiposo sofre a

ação da lipase hormônio-sensível, liberando ácidos graxos e o glicerol (BREUKINK & WENSING, 1997). De acordo com González & Silva (2017), as vacas híidas possuem intensa variação de lipólise do tecido adiposo, apresentando níveis sanguíneos de ácidos graxos livres (NEFA) que podem ultrapassar 400 $\mu\text{mol/L}$, considerado o ponto de corte que indica moderada lipomobilização.

Durante os períodos de escassez energética ocorre a elevação dos hormônios que estimulam a lipólise como a adrenalina, o glucagon e o hormônio do crescimento (GH), além do cortisol que atuam de forma indireta ativando enzimas que promovem o mesmo efeito (SANTOS, 2011). Desta forma, o influxo de ácidos graxos livres provenientes do tecido adiposo para o fígado aumenta sensivelmente, fazendo com que uma parte destes ácidos seja incorporada na síntese do leite (PALMQUIST *et al.*, 1993).

No fígado, parte destes ácidos graxos é removida de acordo com a proporção circulante. Conforme González & Silva (2017), concentrações de NEFA acima de 650 $\mu\text{mol/L}$ são um forte indício de que está ocorrendo uma intensa lipomobilização. Posterior a isso, os ácidos graxos podem sofrer oxidação completa no fígado, serem convertidos em corpos cetônicos, ou ainda reesterificados e depositados na forma de triglicerídeos (TG), os quais devem de unir às lipoproteínas (VLDL) para serem exportados aos tecidos periféricos (GONZÁLEZ & SILVA 2017; OSPINA *et al.*, 2010).

Ainda durante esta fase de baixa ingestão energética, há uma redução nas concentrações séricas de insulina, fato que compromete a entrada de glicose nas células insulino-dependentes, o que intensifica ainda mais a lipomobilização (GALLO *et al.* 1996). Por outro lado, o maior grau de BEN pode contribuir para a imunossupressão das vacas (GALVÃO *et al.*, 2010). Essa demanda ocorre para suprir parte das exigências de tecidos importantes como o músculo esquelético, cardíaco e o fígado.

Devido a excessiva lipomobilização e a baixa capacidade do fígado em exportar as lipoproteínas contendo triglicerídeos, em casos de intenso BEN, ocorre um acúmulo significativo de lipídeos no fígado, superando os índices de degradação metabólica ou de liberação nas lipoproteínas transportadoras (AROEIRA, 1998; McLACHLAN & CULLEN, 1998). Segundo Jorritsma *et al.* (2001) esta patologia conhecida como esteatose ou lipidose hepática pode afetar até 50% das vacas leiteiras no pós-parto. Esta situação, mesmo com índices moderados de lipomobilização, causa a perda de milhões

de dólares anualmente, pois afeta significativamente de forma direta e indireta as taxas reprodutivas, comprometendo a fertilidade da vaca (WITTWER, 2000).

Diversos estudos demonstram que o BEN induz a altas concentrações séricas de NEFA e baixos de insulina, que estão associados com retardo na primeira ovulação após o parto e redução das taxas de prenhez (PRYCE *et al.*, 2004; BUTLER, 2005). Também afeta a produção, havendo uma redução de 60 a 300 litros de leite por lactação (ROSSI, 2005), além de promover o aumento da incidência de doenças do pós-parto (TREACHER *et al.*, 1986), e a elevação da taxa de descarte precoce dos animais acometidos.

3.1 BEN e Lipomobilização

Ao se referir ao BEN em ruminantes, há uma particularidade no que tange a energia, pois estes animais absorvem apenas uma fração muito pequena de glicose pela via entérica e, com isso, a taxa de lipogênese hepática é muito baixa nos animais bem nutridos (SANTOS, 2011). Isso se deve ao fato evolutivo de que os ruminantes raramente necessitam absorver e metabolizar grandes quantidades de ácidos graxos de cadeia longa e glicose, pois a maior parte dos componentes alimentares são consumidos e posteriormente processados no rúmen na forma de ácidos graxos voláteis de cadeia curta (GOFF & HORST, 1997). Sendo assim, o fígado dos ruminantes tem baixa capacidade de armazenar glicose na forma de glicogênio hepático, e de incorporar os triglicerídeos nas lipoproteínas VLDL para sua exportação a outros tecidos (SANTOS, 2011). No periparto, fase de grande demanda energética decorrente do desenvolvimento final do feto e do início da lactação, as vacas podem entrar em um estado de BEN acentuado devido a um consumo alimentar que pode não suprir suas exigências nutricionais (WITTWER, 2000) levando a distúrbios metabólicos.

A cetose e a lipidose hepática são transtornos metabólicos decorrentes de desordens de cunho energético que afetam a utilização dos ácidos graxos, acometendo vacas leiteiras no periparto, influenciando assim, diretamente no desempenho reprodutivo e na produção de leite (GRUMMER, 1995; BOBE, 2004; SCHILD, 2007). Em ruminantes, devido a que os carboidratos ingeridos são fermentados até ácidos graxos voláteis pelos microrganismos do rúmen, a maior parte da glicose deve ser sintetizada pelo fígado via propionato (GONZÁLEZ & SILVA, 2017). A glicose é

fundamental para a lactogênese, podendo determinar a quantidade de leite a ser produzido, e para alguns órgãos extritamentos dependentes dela (MEPHAM, 1993).

Logo após o parto, há uma diminuição da produção de insulina pelo pâncreas, levando a um racionamento da utilização de glicose por alguns tecidos sensíveis à insulina, além de ocorrer uma intensa resposta lipolítica. Esses eventos permitem que a glândula mamária tenha glicose suficiente para a produção de leite (DRACKLEY, 2001; HERDT, 2000, HOLTENIUS, 2003). Para compensar a falta de glicose em alguns tecidos, se desencadeia uma intensa lipólise como resposta alternativa para a produção de energia, liberando assim NEFA (McNAMARA, 1991; HERDT, 2000). Os NEFA podem ser utilizados diretamente por alguns tecidos ou até mesmo pela glândula mamária para a produção de leite, ou ainda absorvidos pelo fígado e sofrerem oxidação ou esterificação (PALMQUIST, 1969; HERDT, 2000). O fígado oxida aproximadamente de 15 a 20% dos NEFA absorvidos, produzindo energia para si mesmo e corpos cetônicos, ou os esterifica, convertendo os NEFA em TG que são exportados na forma de VLDL de volta ao tecido adiposo ou simplesmente são armazenados como TG (McART, 2013).

Animais saudáveis apresentam concentração sérica de NEFA inferior a 400 $\mu\text{mol/L}$, enquanto na cetose clínica estas concentrações podem estar acima de 1.000 $\mu\text{mol/L}$ (SANTOS, 2011). Quando há uma sobrecarga de NEFA no fígado, sua capacidade de oxidação é oprimida, levando ao aumento da via de reesterificação causando acúmulo de TG dentro do fígado. Como os ruminantes têm capacidade limitada de exportar TG nas lipoproteínas, os NEFA reesterificados se acumulam em forma de gordura no fígado, o que leva a lipidose e conseqüentemente à perda da função hepática normal (RUKKWAMSUK, 1999; JORRITSMA, 2001) e ao acúmulo de corpos cetônicos, principalmente beta-hidroxibutirato (BHB), no sangue (HERDT, 2000). Os corpos cetônicos atuam como fonte energética alternativa para os diferentes tecidos, sendo metabolizados em presença de oxalacetato (SCHILD, 2007). A concentração elevada de NEFA e BHB no sangue indicam um excesso de BEN, que está associado a distúrbios metabólicos prejudiciais para a saúde e a produção das vacas, afetando a função imune e levando a diminuição do apetite (DALE, 1979; HAMMON 2006).

Em todos os tipos de cetose, ocorre acidose metabólica, pelo acúmulo de corpos cetônicos (cetoacidose). O diagnóstico é realizado através dos sinais clínicos,

epidemiologia e determinação de corpos cetônicos na urina, sangue ou leite. O acetoacetato e a acetona são muito voláteis, assim, os testes que levam mais tempo devem ser específicos para BHB. O teste de BHB pode ser realizado com leite, urina ou sangue, entretanto o teste no sangue possui uma maior especificidade e sensibilidade quando comparados aos demais (OETZEL, 2004). Os valores de referência de BHB no sangue situam-se abaixo de 1,2 a 1,4 mmol/L (OETZEL, 2004).

3.2 Lipidose hepática

A lipidose caracteriza-se pelo desequilíbrio entre a captação de NEFA e sua utilização pelo fígado, levando ao excesso de lipídeos hepáticos (SILVA & GONÇALVES, 2008). Os principais fatores de risco para a lipidose hepática são as causas nutricionais, de manejo e genéticas. Dos fatores nutricionais, destaca-se a obesidade, onde vacas com escore corporal superior a 4,0 possuem maior lipomobilização em situação de BEN, quando comparadas com vacas com escore corporal menor (RUKKWAMSUK *et al.*, 1998; STOCKDALE, 2001).

Outros fatores nutricionais são mudanças na dieta, restrição alimentar e dietas com grandes quantidades de concentrados, incrementando o risco de acidose ruminal e endotoxemia bacteriana, ambas relacionadas com a aparição de lipidose hepática (GOFF & HORST, 1997; AMETAJ, 2005). Em relação ao manejo, a manutenção de vacas velhas no plantel, a falta de espaço, limpeza insuficiente, alta umidade e elevadas temperaturas favorecem a aparição de patologias que levam ao BEN, gerando consequentemente a lipomobilização (KHALPHALLAH *et al.*, 2017).

De acordo com Van Den Top (1995) e Jorritsma (2000), vacas acometidas por lipidose hepática têm seu desempenho reprodutivo diminuído, pois há redução da colesterolemia, devido ao comprometimento de sua síntese no fígado, levando consequentemente ao atraso do estro, probabilidade de apresentar um intervalo maior entre o parto e o estro e redução em até 30% das chances de ficar gestante no início da lactação.

O grau de lipidose hepática proporcionalmente ao grau de lipomobilização pode ser classificada de acordo com a quantidade de TG armazenados no fígado, sendo considerada leve entre 1 a 5% de TG, moderado entre 5 a 10% de TG e severa quando é maior a 10% de TG (BOBE, 2004). Em casos severos, pode-se observar hipoglicemia,

cetonemia, aumento das concentrações de NEFA e BHB, assim como da atividade sérica das enzimas hepáticas (AST e GGT), em conjunto com a queda das concentrações séricas de colesterol, albumina e insulina (GONZÁLEZ & SILVA, 2017), perda considerável de peso, redução da ingesta e menor ou insuficiente produção de leite (SANTOS, 2011). Segundo Hocquette & Bauchart (1999), a lipídose hepática ocorre em 20 a 60% das vacas leiteiras de alta produção, podendo alcançar uma taxa de até 25% de mortalidade em animais não tratados (BRUSS, 1993; AMETAJ, 2005).

Para diagnóstico de lipídose hepática e sua classificação, pode-se utilizar perfis metabólicos, onde é necessário medir parâmetros que avaliem a condição energética (glicose, NEFA, BHB, colesterol), proteica (albumina, ureia), e de lesão hepática (enzimas AST, GGT, FA) para avaliar o grau de lesão e função hepática (GONZÁLEZ & SILVA, 2017, KHALPHALLAH *et al.*, 2017). Contudo, o método mais preciso de diagnóstico é a quantificação de lipídeos totais mediante estudo histopatológico realizado em amostras obtidas por biópsia hepática (AMETAJ, 2005), técnica que é considerada padrão-ouro e pode ser conduzida em qualquer parte do órgão com uma variação de representatividade inferior a 2% (GERSPACH *et al.*, 2017). Pode-se ainda realizar o diagnóstico através de ultrassonografia, em que à medida que há o acúmulo de gordura ocorre alteração do parênquima hepático, tornando-o mais ecogênico e brilhante. A quantificação objetiva de ecogenicidade vem sendo aperfeiçoada através da análise digital de imagens ultrassonográficas (BANZATO *et al.*, 2015). De acordo com Banzato *et al.* (2016) o conteúdo de TG no fígado pode ser avaliado de forma mais eficiente pela diferença de textura, através da formação de imagens ultrassonográficas digitais em modo B, que são avaliadas por um software. As técnicas mais novas têm permitido superar parcialmente os erros de sobreposição, reverberação e fantasmas de imagens, que ainda proporcionam vários falsos positivos no exame (ACHARYA, 2015). As técnicas ultrassonográficas mais novas, podem ser no futuro ferramentas de diagnóstico complementar e promissoras para a lipídose hepática (FIORE *et al.*, 2017).

A lipídose vem se tornando cada vez mais frequente nos animais de alta produção, principalmente aqueles criados em sistemas intensivos de produção. Assim, é importante o conhecimento aprofundado da doença, seu diagnóstico e sua prevenção, o que contribuirá para redução de prejuízos econômicos e da saúde animal.

3.3 Estudo do escore de condição corporal

Um dos fatores determinantes para a lipidose hepática é a variação no escore de condição corporal (ECC). De acordo com Santos (2011) as vacas que chegam próximas ao parto com ECC acima de 3,5 (escala de 1 a 5, sendo 1= caquética e 5= obesa) têm maior probabilidade de desenvolver lipidose hepática e cetose. Esta situação é difícil de ser bloqueada, pois o metabolismo da vaca está programado para promover a lipomobilização (GARNSWORTHY, 2013).

Animais que chegam ao pré-parto obesos têm menor consumo de matéria seca que aqueles com condição corporal adequada (BOBE *et al.*, 2004). Foi estabelecido que a leptina mediante mecanismo de *feedback* inibe a atividade do neuropeptídeo Y, o qual tem a função de estimular o apetite ao atuar de forma direta no centro da fome e saciedade (VERNON *et al.*, 2001), de forma que vacas com maiores concentrações de leptina no pré-parto têm o seu apetite reduzido. Também foi verificado que a leptina modula a transferência e a partição de nutrientes através da sua interação com outros hormônios, incluindo insulina, glucagon, glicocorticoides, GH, fator de crescimento I semelhante à insulina, citocinas e hormônios da tireoide (HILL, 2004).

Pesquisas demonstram que outros fatores secretados pelo tecido adiposo como o fator de necrose tumoral α interagem com a leptina na regulação do próprio tecido (VERNON *et al.*, 2001). Além disso, o excesso de gordura corporal pode predispor ao tecido adiposo a induzir maior resistência a insulina, o que contribuiria para aumentar as concentrações de NEFA no sangue, os quais também contribuem para a diminuição do consumo de matéria seca (SANTOS, 2011).

De acordo com Garnsworthy (2013) cada vaca tem um ECC alvo geneticamente programado, que ela objetiva alcançar cerca de 10 a 12 semanas depois do parto. Sendo assim, se o seu ECC estiver acima deste alvo, o consumo de ração será reduzido e conseqüentemente ela perderá condição corporal. Porém, se o seu ECC estiver abaixo da meta, o consumo de ração estará aumentado e ela conseqüentemente ganhará condição corporal.

A incidência de vacas obesas ao parto geralmente é reflexo do plano nutricional da fase de lactação anterior, e de lactações extremamente longas, o que, por sua vez, é decorrente da ineficiência reprodutiva e de outros fatores, dentre eles a cetose e esteatose hepática, constituindo assim um ciclo vicioso de problemas (SANTOS, 2011). Porém, segundo Garnsworthy (2013), ainda não está claro quais são os fatores mais

determinantes no ECC, pois ele também poderia aumentar no final da lactação em função da variação do ECC alvo de acordo com o estágio da lactação. Com a evolução da lactação, ocorre uma diminuição na produção láctea, concomitante a um consumo relativamente elevado de matéria seca, balanço energético positivo que poderia levar a aumento da insulina para promover a lipogênese (CHILLIARD *et al.*, 2001). Sendo assim, para reduzir o impacto do BEN sobre o desempenho produtivo, reprodutivo e a saúde dos animais, torna-se necessário o monitoramento do ECC, para evitar ao máximo os extremos e as suas variações bruscas.

4. RESULTADOS

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de dois artigos científicos. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se nos artigos. Onde o Artigo 2 está escrito sob as normas de submissão da revista científica.

4.1 Artigo científico 1

Lipidose hepática e sua correlação a indicadores sanguíneos de função, lesão hepática e variação da condição corporal em vacas leiteiras

4.1.1 Resumo

Durante o período de transição as vacas leiteiras passam por balanço energético negativo. Com isso elas mobilizam as reservas corporais, levando assim a uma elevada lipomobilização, podendo ter como consequência diferentes graus de lipidose hepática. O presente estudo teve como objetivo determinar a relação entre a infiltração lipídica no fígado com os indicadores metabólicos sanguíneos de função e lesão hepática, bem como com a condição corporal em vacas leiteiras de alta produção. Foram utilizadas 51 vacas leiteiras multíparas da raça Holandesa em um sistema confinado na região noroeste do Rio Grande do Sul, durante os meses de julho e agosto. Realizou-se a coleta de amostras hepáticas, sanguíneas e a mensuração do escore de condição corporal (ECC), no terceiro e vigésimo oitavo dia pós-parto. Através da amostra de tecido hepático foi determinado o grau de infiltração lipídica por técnica histológica. Nas amostras sanguíneas foram determinados os metabólitos aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA) e gama-glutamil transferase (GGT), além de beta-hidroxiacetil-CoA (BHB), ácidos graxos não esterificados (NEFA), albumina, bilirrubina total e colesterol. Simultaneamente foi feita a mensuração do ECC de forma objetiva (câmera) e subjetiva (observação visual). Foi encontrada uma incidência de infiltração lipídica de 3,92% dos animais no terceiro dia pós-parto e de 5,88% dos animais no vigésimo oitavo dia pós-parto, em ambos os casos de grau leve. As concentrações de BHB, NEFA, GGT, AST, FA e bilirrubina se apresentaram mais elevadas no terceiro dia pós-parto quando comparado com os valores do vigésimo oitavo dia pós-parto, mas ambos dentro dos valores de referência. No dia 28, os valores de albumina e colesterol foram maiores que no dia 3, ainda assim dentro da referência. As vacas, com ou sem lipidose hepática apresentaram hipocolesterolemia no pós-parto imediato, já quando comparamos somente as vacas com e sem lipidose juntas o único metabólito alterado foi o colesterol de vacas com lipidose hepática, os demais estavam dentro dos intervalos

de referência. As vacas apresentaram uma média de ECC subjetivo de 3,10 e objetivo de 3,16 no terceiro dia pós-parto e de 2,91 de forma subjetivo e de 2,99 de forma objetiva no vigésimo oitavo dia pós-parto. Quando avaliada a relação entre o ECC subjetivo e objetivo ao terceiro e vigésimo oitavo dia pós-parto houve uma correlação positiva nos métodos de avaliação em ambas as datas.

Palavras chave: Lipidose hepática, escore de condição corporal, metabólitos, e função hepática.

4.1.2 Introdução

O período de transição das vacas de leite é o momento mais desafiador da vida produtiva do animal. Durante esta fase, o animal sai de um momento de baixo consumo e demanda de alimentos, de forma abrupta, a uma fase de intensa produção de leite, necessitando de uma dieta de alta densidade de nutrientes, para suprir a demanda da lactação (DIVERS & PEEK, 2018). Durante o período pré-parto a queda no consumo de matéria seca é a alteração mais significativa, culminando em um balanço energético negativo (BELL, 1995; HAYIRLI *et al.*, 2002). Nas semanas que antecedem ao parto as concentrações de corticoides e estrógenos aumentam drasticamente contribuindo para a queda da ingestão de matéria seca em até 30% (DRACKLEY *et al.*, 2005). No pós-parto, o consumo de matéria seca se eleva, mas não chega a compensar o aumento da demanda energética exigida pelo início da lactação (SANTOS, 2011), levando a um estado de balanço energético negativo (BEN).

O metabolismo dos lipídeos é a chave biológica para um correto período de transição (DRACKLEY, 1999), sendo que o principal mecanismo compensatório para regular o BEN é a mobilização de lipídeos de reserva e a oxidação dos ácidos graxos para formar precursores energéticos (CORASSIN *et al.*, 2011). Durante esta fase, o tecido adiposo sofre a ação da lipase hormônio-sensível, liberando ácidos graxos livres (NEFA) e glicerol (DIVERS & PEEK, 2018). As vacas híbridas possuem intensa variação de lipólise do tecido adiposo, apresentando níveis sanguíneos de NEFA que podem ultrapassar 400 $\mu\text{mol/L}$, considerado o ponto de corte que indica moderada lipomobilização (GONZÁLEZ & SILVA, 2017).

Durante os períodos de escassez energética ocorre a elevação dos hormônios que estimulam a lipólise como a adrenalina, o glucagon e o hormônio do crescimento, além do cortisol que atuam de forma indireta ativando enzimas que promovem o mesmo efeito (SANTOS, 2011). Desta forma, o influxo de NEFA provenientes do tecido adiposo para o fígado aumenta sensivelmente, fazendo com que uma parte destes ácidos seja incorporada na síntese do leite (PALMQUIST *et al.*, 1993).

No fígado, parte destes ácidos graxos são removidos de acordo com a proporção circulante. Concentrações de NEFA acima de 700 $\mu\text{mol/L}$ são um forte indício de que está ocorrendo uma intensa lipomobilização (GONZÁLEZ & SILVA, 2017). Posterior a isso, os ácidos graxos podem sofrer oxidação completa no fígado, serem convertidos em corpos cetônicos, ou ainda reesterificados e depositados na forma de triglicerídeos (TG), os quais devem se unir às lipoproteínas VLDL para serem exportados aos tecidos periféricos (OSPINA *et al.*, 2010).

Devido a excessiva lipomobilização e a baixa capacidade do fígado em exportar as lipoproteínas contendo triglicerídeos, em casos de intenso BEN, ocorre um acúmulo significativo de lipídeos no fígado, superando os índices de degradação metabólica ou de liberação nas lipoproteínas transportadoras (MACLACHLAN & CULLEN, 1998). Esta patologia conhecida como esteatose ou lipidose hepática pode afetar até 50% das vacas leiteiras no pós-parto (JORRITSMA *et al.*, 2001) e pode causar a perda de milhões de dólares anualmente (McART, 2012).

Doenças no periparto, como cetose, deslocamento de abomaso, retenção de placenta e mastite, estão intimamente ligados à esteatose hepática (LEBLANC *et al.*, 2005). Diversos estudos demonstram que o BEN induz a altas concentrações séricas de NEFA e baixos de insulina, estando associados com retardo na primeira ovulação após o parto e redução das taxas de prenhez (BUTLER, 2005; PRYCE *et al.*, 2004), e perda na produção entre 60 a 300 litros de leite por lactação (ROSSI, 2005).

Desta forma, o presente estudo tem por objetivo estudar a relação entre a infiltração lipídica no fígado com os indicadores metabólicos sanguíneos de lesão e função hepática, bem como sua relação com a condição corporal.

4.1.3 Materiais e Métodos

Animais e local do estudo

O experimento foi realizado em uma fazenda comercial da região noroeste do estado do Rio Grande do Sul, Brasil, em um sistema confinado. Os animais avaliados durante o estudo eram vacas multíparas da raça Holandesa (n= 51), entre 2 e 4 lactações, com produção média diária de 32,91 kg de leite, na lactação prévia em 305 dias. Os animais eram ordenhados 3 vezes ao dia em sistema carrossel. A coleta dos dados foi realizada nos meses de julho e agosto de 2017 (inverno austral). O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética no uso de animais sob o número do protocolo 32692.

A dieta total fornecida aos animais foi balanceada para atender a produção leiteira de 40 kg/dia, 3,5% de gordura, 3,2% de proteína e 4,7% de lactose, sendo composta por silagem de milho, silagem de aveia, palha de trigo, grão de milho moído, farelo de soja, casca de soja, núcleo mineral e vitaminas. A composição bromatológica da dieta era a seguinte: 38,0% de fibra em detergente neutro (FDN), 1,6 Mcal/dia de energia metabolizável (EM), 18% de proteína bruta (PB), visando atender os requisitos de vacas leiteiras (NRC, 2001). Foram incluídas no estudo apenas vacas nas quais não foi realizado qualquer procedimento cirúrgico no momento do parto.

Biopsia hepática

Foram realizadas biopsias hepáticas no 3º e no 28º dia pós-parto utilizando o método descrito por Braga *et al.* (1985). O ponto de eleição para a introdução da agulha (tipo tru-cut) foi o 11º espaço intercostal direito, aproximadamente 20 cm abaixo da linha do dorso, no cruzamento de uma linha imaginária entre a tuberosidade externa do íleo e a escápula e outra linha perpendicular ao 11º espaço intercostal; esse ponto corresponde à posição topográfica do lobo direito do fígado. Após tricotomia, anestesia local e antissepsia do campo com álcool iodado, a agulha era introduzida no fígado por acesso percutâneo e transtorácico. Os fragmentos de fígado obtidos eram de aproximadamente 0,5-1,5 cm de comprimento por 0,1 cm de espessura em formato cilíndrico. Esses fragmentos imediatamente após a coleta foram fixados em formol a 10%. Posteriormente foram realizados cortes histológicos corados com *OilRed* e com ácido periódico *Schiff* (PAS), para estudo histopatológico através da microscopia de luz em 40x, onde foi quantificada a proporção (%) de lipídeos totais dispostos por campo de luz. Os fragmentos hepáticos dos animais foram classificados para a deposição de lipídeos segundo a técnica descrita por Bobe *et al.* (2004), sendo considerada infiltração

leve entre 1 a 5% de TG, moderada entre 5 a 10% de TG, e severa quando maior a 10% de TG por campo de luz.

Indicadores metabólicos

Coletas de sangue foram realizadas nos dias 3 e 28 pós-parto. As amostras de sangue foram coletadas de todos os animais (n= 51) por punção venosa ou arterial coccígea, utilizando tubos tipo *vacutainer* de 10 mL com heparina (Becton Dickinson, Brasil), os quais foram conservados em caixa térmica refrigerada. Após a coleta, as amostras foram imediatamente centrifugadas a 2.500 rpm por 10 minutos para obtenção de plasma, o qual foi fracionado e conservado a -20°C, em microtubo tipo *ependorf*, para as posteriores determinações bioquímicas (BHB, NEFA, albumina, bilirrubina, colesterol, AST, FA, GGT). As determinações bioquímicas foram realizadas utilizando equipamento automático (Analisador bioquímico automático CM-200, Wiener) com kits diagnóstico comerciais (Labtest, Brasil, para albumina, bilirrubina, colesterol, AST, FA, GGT e Randox, Irlanda, para BHB e NEFA).

Pontos de corte para diagnóstico de alterações metabólicas

Animais que apresentaram concentrações de BHB acima de 1,4 mmol/L foram considerados em cetose subclínica e animais que apresentaram níveis acima de 3,0 mmol/L foram considerados em cetose clínica (GONZÁLEZ & SILVA, 2017). Vacas que apresentaram concentrações de NEFA acima de 700 µmol/L foram consideradas com risco de excessiva lipomobilização no pós-parto (GONZÁLEZ & SILVA, 2017). Vacas que apresentaram albuminemia abaixo de 27 g/L foram considerados em hipoalbuminemia (GONZÁLEZ & SILVA, 2017). Vacas que apresentarem bilirrubina total acima de 0,54 mg/dL foram consideradas hiperbilirrubinêmicas (GOZZI *et al.* 2011). Animais que apresentaram colesterolemia inferior a 80 ou superior a 120 mg/dL foram consideradas hipo ou hipercolesterêmicas, respectivamente (GONZÁLEZ & SILVA, 2017). Vacas que tiveram atividade enzimática de AST superior a 132 U/L foram consideradas em risco de lesão hepática (GONZÁLEZ & SILVA, 2017). Vacas que apresentaram atividade de GGT superior a 39 U/L ou de fosfatase alcalina superior a 196 U/L foram consideradas com colestase hepática e consideradas como grupo de risco para disfunção hepática (GOZZI *et al.* 2011).

Escore de condição corporal

O escore corporal foi avaliado nos dias 3 e 28 pós-parto, mediante duas técnicas. A primeira é uma técnica objetiva que utiliza uma câmera com registro de imagens 3D (BCS DeLaval). O sistema avalia a conformação angular da parte posterior das vacas, através da captura de imagens, posteriormente registra os dados no software (Kinect Sensor for Windows version 2, Microsoft, Redmond, WA) e classifica na escala de 1 a 5, onde 1 são vacas muito magras e 5 são vacas muito gordas, com intervalo de 0,10 pontos de referência. O segundo método foi o subjetivo, mediante a escala desenvolvida por Ferguson *et al.* (1994). A avaliação da condição corporal, foi feita por um único avaliador, utilizando uma escala de 1 (muito magra) a 5 (muito gorda), com intervalo de 0,25 pontos de referência.

Índice de função hepática

O índice de função hepática (IFH) desenvolvido por Bertoni & Trevisi (2013), inclui concentrações de albumina, colesterol e bilirrubina, dosadas nos dias 3 e 28 pós-parto, dispostas pelo método abaixo, onde V3 e V28 correspondem aos valores nos dias 3 e 28 pós-parto, respectivamente:

Passo 1: cálculo de sub-índices

Sub-índice de albumina (Alb-I) = 50% V3 + 50% (V28 - V3)

Sub-índice de colesterol (Col-I) = 50% V3 + 50% (V28 - V3)

Sub-índice de bilirrubina (Bil-I) = 67% V3 + 33% (V3 - V28)

Passo 2: cálculo do IFH

$IFH = (Alb-I - 17,71)/1,08 + (Col-I - 2,57)/0,43 - (Bil-I - 6,08)/2,17$

Os valores finais se situam de -12 a +5, sendo que valores superiores a 0 indicam boa funcionalidade hepática.

Análise estatística

Os dados foram tabulados no Excel e transferidos para o Software SPSS, SAS, onde foram analisados em quanto à normalidade mediante Shapiro-Wilk, e homoscedasticidade pelo teste de Bartlett. A associação entre os metabolitos e os animais que apresentaram infiltração lipídica com a perda de ECC pelos métodos objetivo e subjetivo foi comparada mediante o teste de Fisher e Qui-quadrado. O grau de concordância entre o escore de condição corporal objetivo e subjetivo foi comparado pelo teste de Kappa. A comparação entre o grau de infiltração lipídica e os valores dos

indicadores de lesão e função hepática, foi realizada mediante teste de Fisher e Qui-quadrado considerando os dias de lactação (3 e 28) como efeito fixo. A correlação entre o grau de infiltração lipídica e o índice de função hepática foi avaliada pelo teste Anova. O nível de significância usado foi de 5%.

4.1.4 Resultados

No presente estudo houve infiltração lipídica em 2/51 vacas no terceiro dia pós-parto e em 3/51 vacas no vigésimo oitavo dia pós-parto, sendo que em ambas ocasiões a lipidose hepática foi de grau leve (1 a 5% de triglicerídeos hepáticos). Quando avaliada a associação entre infiltração lipídica e perda de condição corporal não observou-se nenhuma diferença entre os animais do presente estudo. Os animais avaliados apresentaram uma produção láctea média no vigésimo oitavo dia pós-parto de 38 litros, com um agregado total médio na lactação em 305 dias de 10.398 litros.

A Tabela 1 apresenta os valores dos indicadores bioquímicos plasmáticos das vacas no terceiro e vigésimo oitavo dias pós-parto. As concentrações de BHB, NEFA, GGT, AST, FA, e bilirrubina estavam mais elevadas no terceiro dia pós-parto quando comparado com os valores do vigésimo oitavo dia pós-parto. No dia 28, os valores de albumina e colesterol foram maiores que no dia 3. Dentre as alterações nos valores de referência, o único metabólito que apresentou níveis inferiores ao valor descrito como fisiológico foi o colesterol com 54,6 mg/dL, os demais estavam dentro dos valores de referência descritos por Gozzi *et al.*, (2011).

Na Tabela 2 estão dispostos os metabólitos grupo de vacas que tiveram grau leve de lipidose hepática no terceiro ou vigésimo oitavo dia pós-parto, podemos perceber que elas apresentaram albumina, colesterol, GGT mais baixos no terceiro dia pós-parto em relação ao vigésimo oitavo dia pós-parto, e AST, BHB, bilirrubina, FA e NEFA mais elevados no terceiro dia em relação ao vigésimo oitavo dia pós-parto. Repetindo o comportamento do colesterol da Tabela 1, os animais que apresentaram alterado o seu valor, que foi de 52,3 mg/dL em relação a referência mínima de 80mg/dL, o restante dos metabolitos se manteve dentro dos valores de referência.

A tabela 3 apresenta os valores dos indicadores bioquímicos plasmáticos das vacas com e sem lipidose hepática. As concentrações de BHB, NEFA, AST, e

bilirrubina estavam mais elevadas para as vacas com lipidose hepática, já as concentrações de albumina, colesterol, FA e GGT estavam mais elevadas para as vacas sem lipidose hepática, o único metabólito que estava fora do padrão de referência foi o colesterol das vacas com lipidose hepática que estava abaixo do valor mínimo, os demais metabólitos estavam dentro dos valores citados por Gozzi *et al.*, (2011).

As vacas apresentaram uma média de ECC subjetivo (visual) de 3,10 e objetivo (câmera) de 3,16 no terceiro dia pós-parto e de 2,91 de forma subjetiva e de 2,99 de forma objetiva no vigésimo oitavo dia pós-parto, com uma perda média de ECC entre o terceiro e o vigésimo oitavo dia pós-parto de 0,19 pontos para o método subjetivo e 0,17 pontos para o método objetivo. Quando avaliada a relação entre o ECC subjetivo e objetivo (Figuras 1 e 2) ao terceiro dia pós parto houve uma correlação positiva ($r=0,72$; $P<0,0001$), e no vigésimo oitavo dia positiva ($r=0,76$; $P<0,0001$), com um delta da relação entre o escore subjetivo (visual), e objetivo (câmera) de ($r=0,34$; $P=0,01$).

No índice de função hepática (IFH) de Bertoni & Trevisi (2013), considera-se animais com valores próximos ou acima de zero com boa funcionalidade hepática, tendo os animais do presente estudo apresentado IFH médio de -1,26 ($P=0,49$). As vacas com lipidose hepática tiveram um IFH mais baixo (-3,46), comparado com vacas sem lipidose (-1,02) ($P=0,002$).

4.1.5 Discussão

Apesar da literatura se referir a uma incidência de lipidose hepática em vacas leiteiras de alta produção em torno de 40% (BOBE *et al.*, 2004), ou mais (JORRITSMA *et al.*, 2001), os animais avaliados no presente trabalho apresentaram baixa incidência (3,92% no terceiro dia pós-parto e 5,88% no vigésimo oitavo dia pós-parto). De acordo com Bobe *et al.* (2004) as vacas de alta produção estão predispostas a sofrerem com esteatose hepática, o que nos chama atenção, visto que as vacas do presente trabalho apresentaram produção média de 38 litros de leite em 305 dias, produtividade compatível com vacas de alta produção (GUIROZ-ROCHA, *et al.*, 2010; MORAIS, *et al.*, 2017).

Quando analisado o grupo total de animais incluídos no estudo, podemos perceber que as concentrações de BHB, NEFA, GGT, AST, FA, e bilirrubina estavam

mais elevadas no terceiro dia pós-parto quando comparado com os valores do vigésimo oitavo dia pós-parto, e albumina e colesterol se mantiveram mais baixos no terceiro dia pós-parto em relação ao vigésimo oitavo dia, mas ambos os valores ainda assim estão dentro dos valores reportados por Gozzi *et al.* (2011), apenas com a exceção do colesterol que estava abaixo dos valores de referência tanto para todas as vacas do experimento quanto para o grupo com lipidose hepática. Estes resultados são compatíveis com o período inicial da lactação, na qual as vacas têm elevada demanda metabólica e baixa ingestão de matéria seca. Desta forma, passam por um período de balanço energético negativo, demandando das reservas energéticas para suprir as demandas metabólicas (BAUMAN, 1980; DRACKLEY, 1999). Este perfil se apresentou da mesma forma para vacas com lipidose hepática, somente com a exceção da GGT, a qual esteve mais baixa no terceiro dia pós-parto em relação ao vigésimo oitavo.

Quando analisados os valores de AST tanto para o grupo total, quanto para as vacas com lipidose hepática, percebe-se que os valores estão dentro dos padrões de referência e não sofreram grandes alterações. De acordo com Divers & Peek (2018), AST é uma enzima de fase aguda encontrada na mitocôndria e em menor quantidade no citosol dos hepatócitos, que é liberada em caso de lesões hepáticas, acúmulo de lipídeos hepáticos, inflamações, ou em lesões musculares. Esta afirmação corrobora com os achados das vacas do grupo total, no qual não houve diferenças significativas, e também corrobora com o grupo de vacas com lipidose hepática, pois estes animais apresentaram apenas um grau leve de acúmulo de lipídeos, sendo assim incapaz de liberar grandes quantidades desta enzima na corrente sanguínea. Para Thrall *et al.* (2015) AST é uma enzima que detecta lesões hepáticas, mas que deve ser avaliada em conjunto com os demais metabólitos para convergir a um diagnóstico, devido ao seu caráter inespecífico de liberação.

As concentrações de BHB e NEFA que as vacas apresentaram no terceiro dia pós-parto e as vacas com lipidose hepática foram superiores as encontradas no vigésimo oitavo para ambos os grupos. Segundo Piñeiro *et al.* (2019) este fato está relacionado com a menor ingestão de matéria seca durante o periparto, sendo bem demarcado em vacas com lipidose hepática, o que leva o organismo a mobilizar uma maior quantidade de NEFA das reservas, e por consequência aumento também de BHB para poder

suportar a lactação vigente. Segundo Grummer *et al.* (2004) o período ao redor do parto leva a baixa no consumo de alimentos, levando os animais ao BEN. O NEFA tem sido relatado como um ótimo marcador de metabolismo energético de pré-parto (DUFFIELD, 2004). Bem como o BHB tem sido relatado como um bom marcador energético do pós-parto (PUSHPAKUMARA, *et al.*, 2003). Esses dois indicadores do metabolismo energético são os mais utilizados atualmente.

Geralmente o NEFA, é liberado ao sangue a partir da lipomobilização, e o BHB encontra-se associado à oxidação dos NEFA demandados pelo BEN, fornecendo assim grande parte da energia faltante ao organismo (BOBE *et al.*, 2004). Segundo Quiroz-Rocha *et al.* (2010) à medida que o consumo de alimentos vai se reestabelecendo com o passar dos dias no pós-parto, há tendência da estabilização dos níveis de NEFA e BHB, fato esse semelhante ao encontrado no presente estudo onde os níveis dos metabólitos para ambos os grupos estavam mais baixos no vigésimo oitavo dia pós-parto, em relação ao terceiro dia pós-parto, indicando a estabilização da demanda energética e o incremento do consumo alimentar dos animais do presente estudo.

A FA é uma enzima de membrana inespecífica, com várias isoformas, dentre elas a hepática, sendo que a maior parte da FA sérica é de origem hepática, geralmente presente nas células do epitélio biliar e nas membranas caniculares dos hepatócitos (THRALL, *et al.*, 2015). Quando analisado os resultados desta enzima, podemos observar que, tanto para o grupo total de animais quanto para o grupo com lipidose hepática, seguiram o mesmo padrão de elevação enzimática no terceiro dia e baixa no vigésimo oitavo dia pós-parto, mas sempre dentro dos valores de referência. Segundo Lacetera *et al.* (2004), a enzima FA tem relação com a mobilização lipídica que leva a deposição de lipídeos na região periportal, comprimindo os canalículos biliares, o que gera a liberação desta enzima. Como as vacas no pós-parto geralmente passam por um período inicial de intensa mobilização lipídica, pode ter se refletido no aumento dos níveis de FA no terceiro dia em relação, ao vigésimo oitavo, onde o consumo e as demandas já estão mais estabilizados. Segundo Divers & Peek (2018), a inflamação do parênquima também pode levar a obstrução de pequenos canalículos biliares e a liberação de FA de forma indireta, o que leva a FA em ruminantes a ter valores de referência amplos, podendo dificultar a interpretação nos resultados nestas espécies, justificando a menor discrepância de valores entre o grupo total de animais e o grupo

com lipídose hepática. A enzima GGT teve os valores dentro do intervalo de referência, sendo mais elevados no terceiro dia e mais baixos no vigésimo oitavo pós-parto para o grupo total. GGT é uma enzima encontrada nas membranas e no citosol de células, especialmente no epitélio dos ductos biliares e túbulos renais (GONZÁLEZ & SILVA, 2017). As vacas com lipídose hepática apresentaram valores de GGT mais elevados no vigésimo oitavo dia em relação ao pós-parto. Isso pode ser fruto do maior tempo de lipídose em relação às vacas no terceiro dia pós-parto, levando ao aumento desta enzima nesta fase. Isso pode ser corroborado por Thrall *et al.* (2015) que afirma que esta enzima tem maior concentração dos túbulos biliares hepáticos.

Os valores de bilirrubina, no presente estudo se apresentaram estatisticamente mais elevados no terceiro dia em relação ao vigésimo oitavo dia pós-parto, tanto para o grupo total de vacas, quanto para o grupo com lipídose hepática, já quando olhamos só para as vacas que apresentaram lipídose estes valores estavam mais altos, mas ambas estavam dentro dos valores de referência citados por Gozzi *et al.* (2011). De acordo com González & Silva (2017), doenças que levem a perda da função do sistema hepático, doenças de cunho inflamatório ou infeccioso que comprometam o sistema biliar, levam ao acúmulo do pigmento biliar, podendo levar ao aumento da bilirrubina total. A bilirrubina é um metabólito que naturalmente está mais elevado na semana que antecede o parto e se mantém por 4 a 5 semanas pós-parto. De acordo com Bertoni *et al.* (2010) durante o periparto o fígado geralmente passa por um processo inflamatório, levando a diminuição da produção de algumas enzimas que fazem a depuração da bilirrubina, promovendo a sua elevação durante este período. Sendo assim, podemos afirmar que o grupo total de vacas apresentou bilirrubina mais alta no início da lactação em função do processo inflamatório sistêmico que as vacas sofrem no pós-parto. De acordo com Bionaz *et al.* (2007), a bilirrubina tipicamente se eleva no pós-parto e pode ser consequência do processo inflamatório do pós-parto ou por alguma patologia como lipídose hepática. Nos ruminantes a hiperbilirrubinemia geralmente não é compatível com doença hepática, mas sim com lipídose, ou insuficiência hepática crônica (THRALL, *et al.*, 2015). Dessa forma, podemos afirmar que a bilirrubina mais elevada das vacas pós-parto com lipídose hepática pode ter sido ocasionada em função da deposição de lipídeos no fígado, mesmo que de forma leve.

As concentrações de albumina e colesterol se apresentaram mais baixas no terceiro dia em relação ao vigésimo oitavo dia pós-parto, tanto para o grupo total de vacas quanto para o grupo com lipidose hepática (estatisticamente diferentes os dados de colesterol para vacas do grupo total). Já quando avaliamos todas as vacas com ou sem lipidose hepática as que apresentaram lipidose tinham hipocolesterolemia. Além disso as vacas do grupo total, e as do grupo com lipidose hepática apresentaram hipocolesterolemia no terceiro dia pós-parto seguindo a referência de González & Silva (2017). Segundo Thrall *et al.* (2015), o colesterol sanguíneo pode ser proveniente da dieta, ou originário da metabolização do acetil-CoA pelo fígado. Em casos de insuficiência hepática os animais podem apresentar hipocolesterolemia, podendo estar ligado ao consumo de matéria seca. Um estudo realizado com vacas leiteiras durante o período de transição demonstrou que a colesterolemia mimetizou a curva de ingestão de matéria seca (GURETZKY *et al.*, 2006). O colesterol reflete a concentração da produção de colesterol de origem hepática e do consumo alimentar, que geralmente na última semana do pré-parto até a 6 semana pós-parto se mantém mais baixo, mas pode aumentar dependendo da fonte alimentar de lipídeos (BERTONI, *et al.* 1984). De acordo com Burfeind *et al.* (2010) a produção do colesterol tem uma forte relação com o consumo de matéria seca, que neste período inicial encontra-se reduzindo. De acordo com um estudo realizado por Kim *et al.* (2013), verificou-se que vacas que perderam mais de 1 ponto de condição corporal por período apresentaram maior chance de desenvolver doenças no período pós-parto, e o colesterol correlacionou-se negativamente com a perda de condição corporal e com o consumo de matéria seca. Sepulveda *et al.* (2015) correlacionaram as concentrações de colesterol com o risco das vacas desenvolver doenças, dentre elas a lipidose hepática, fato este que pode ser percebido no presente estudo onde as vacas com lipidose hepática tinha menor nível de colesterol. Eles associaram a hipocolesterolemia com lipidose hepática e também com baixo consumo de matéria seca que é afetado no pós-parto imediato, mas que com o passar dos dias vai se reestabelecendo, refletindo no presente estudo em níveis mais elevados no vigésimo oitavo dia pós-parto, tanto para o grupo total de animais quanto para o grupo com lipidose, podendo se afirmar também que o colesterol além de ter relação com a lipidose hepática, tem uma forte relação com o consumo de alimentos.

A menor concentração de albumina no início da lactação pode indicar que as vacas de ambos os grupos podem ter passado por um processo inflamatório durante o

período estudado. Segundo Bertoni & Trevisi (2013), a albumina se mantém mais elevada até o final da gestação com níveis que se situam ao redor de 36 a 37 g/L, mas no pós-parto apresentam uma pequena baixa, pois nesta fase há um processo inflamatório, e por ela se tratar de uma proteína de fase aguda negativa tem a tendência a diminuir durante os processos inflamatórios. De acordo com Thrall *et al.* (2015) a concentração de albumina pode ser afetada além da função hepática, pelos processos inflamatórios orgânicos, pois a albumina é uma proteína que leva cerca de 21 dias para ser sintetizada e ter seus níveis reestabelecidos. Isto sugere que as vacas do presente estudo sofreram algum processo inflamatório no período periparto, mas que foi reestabelecido com o decorrer da lactação.

Ao avaliarmos o IFH das vacas do presente estudo (-1,26), podemos perceber um bom nível de função hepática, pois situa-se muito próximo a 0. Segundo Leblanc (2012) as vacas no pós-parto geralmente enfrentam um período de inflamação sistêmica, por consequente também hepática que pode levar à diminuição da função deste importante órgão. Trevisi *et al.* (2013) afirmam que geralmente as vacas no pós-parto que apresentam boa função hepática tem o seu IFH ao redor de -1,5 ou acima. Ainda, segundo o mesmo autor, as vacas que apresentam inflamação ou alguma patologia hepática têm a tendência de apresentarem um IFH extremamente baixo, o que corrobora com os dados do presente estudo onde as vacas com lipídose hepática pós-parto apresentaram o IFH mais baixo ($r = -3,46$), se comparado com vacas sem lipídose ($r = -1,02$). Isto indica que há uma alta relação entre a confirmação da lipídose hepática e o índice de função hepática. Este fato era esperado devido ao IFH levar em conta a variação dos valores de albumina, colesterol e bilirrubina que sofrem influência da lipídose hepática.

No presente estudo ambas as formas de avaliação de ECC tiveram valores médios no período próximo ao parto muito semelhantes entre si, sendo que o método subjetivo foi de 3,10 e objetivo de 3,16 no terceiro dia pós-parto e de 2,91 de forma subjetiva e de 2,99 de forma objetiva no vigésimo oitavo dia pós-parto, com a perda média de ECC entre o terceiro e o vigésimo oitavo dia pós-parto de 0,19 pontos para o método subjetivo e 0,17 pontos para o método objetivo. No estudo de Graugnard *et al.* (2013) as vacas que pariram com ECC médio de 3,5 tiveram maior incidência de infiltração hepática e apresentaram ECC igualado aos 28 dias as vacas que pariram com

ECC médio de 3,0 e o mantiveram. Isto é corroborando por Reid *et al.* (1986), na qual afirma que as vacas excessivamente gordas têm uma maior probabilidade de desenvolverem esteatose hepática comparado com as mais magras. A predisposição de ter lipidose hepática aumenta quando as vacas apresentam ECC acima de 3,5 (TREACHER *et al.*, 1986; JORRITSMA *et al.*, 2001). Durante o presente estudo, os animais apresentaram ECC ao parto ao redor de 3,0 e podemos observar que, em ambas as formas de avaliação do ECC, os animais perderam ECC, convergindo para um escore mais baixo aos 28 dias pós-parto, mas sem apresentar grandes perdas. De acordo com Garnsworthy (2013) o ideal é que as vacas apresentem um escore ao redor de 3,25 no parto para minimizar os problemas desta fase. Quando observamos o ECC médio por ambas as formas de avaliação, podemos perceber que eles estão muito próximo do ideal citado pela literatura para diminuir o risco de doenças como a lipidose hepática, o que pode ter sido decisivo para a baixa incidência desta patologia em nosso estudo. Além disso a perda de ECC apresentada no vigésimo oitavo dia pós-parto para ambos os métodos de avaliação foi muito pequena o que pode ter contribuído para a baixa incidência de lipidose hepática em nosso estudo, dados estes que corroboram com Bobe *et al.* (2004), o qual afirma que o principal fator predisponente para desencadear a lipidose hepática é a perda de ECC de forma demasiada.

Quando avaliada a relação entre o ECC subjetivo (visual) e objetivo (câmera) ao terceiro dia pós-parto ($r= 0,72$), e ao vigésimo oitavo dia pós-parto ($r= 0,76$), podemos perceber uma boa relação entre as duas formas de mensuração. Ambos os métodos têm uma boa semelhança entre resultados apresentados (VANROBAYS *et al.*, 2015). Quando olhamos o delta da relação ($r= 0,34$) podemos perceber que há espaço ainda para se melhorar a relação de semelhança dos dois métodos de avaliação. De acordo com Song *et al.* (2018) o método objetivo de avaliação do ECC tem efeito e propósito similar aos métodos manuais e semi-automáticos disponíveis para uso, também apresenta boa avaliação morfométrica, mas carece de um sistema de interpretação destes dados mais eficiente, aumentando assim a sua precisão.

4.1.6 Conclusão

Pode se concluir que vacas com infiltração lipídica tem hipocolesterolemia em relação as vacas híginas, também no 28º dia têm maiores concentrações de BHB e

menores concentrações de colesterol que o grupo controle no mesmo período. O índice de avaliação da função hepática tem boa relação com a alteração dos parâmetros sanguíneos, sendo assim um bom indicador de lipidose hepática no pós-parto. O método de avaliação do ECC objetivo tem boa relação com o método subjetivo, mas carece ainda de ajustes para melhorar a performance.

4.1.7 Referências

BAUMAN, D. E.; CURRIE, W. B. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. **Journal of Dairy Science**. V.63, p. 1514–1529. 1980.

BELL, A. W. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. **J. Anim. Sci.** v. 73, p. 2804-2819. 1995

BERC, M. A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. 2 ed., GUANABARA KOOGAN, Rio de Janeiro, p. 439 a 520. 2011.

BERTONI, G.; LOMBARDELLI, R.; PICCIOLI-CAPPELLI, F. et al. Main endocrine-metabolic differences between 1st and 2nd lactation of the dairy cows around calving. **Journal of Animal Science**. V. 88, 2010.

BERTONI, G.; MAIANTI, M. G.; CAPPÀ, V. Variazioni nel metabolismo lipidico e glucidico nelle fasi terminali della gravidanza ed iniziali della lattazione nelle bovine. In: Proceedings of Soc. Ital. Buiatria. Modena (Italy). **Società Italiana di Buiatria**. v. 16; p. 223–36. 1984.

BERTONI, G., TREVISI, E. Use of the Liver Activity Index and Other Metabolic Variables in the Assessment of Metabolic Health in Dairy Herds. **Vet. Clin. Food Anim.** v. 29, p. 413–431. 2013.

BIONAZ, M.; TREVISI, E.; CALAMARI, L.; LIBRANDI, F.; FERRARI, A.; BERTONI, G. Plasma Paraoxonase, Health, Inflammatory Conditions, and Liver Function in Transition Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**. V. 90, p. 1740– 1750. 2007.

BOBE, G., YOUNG, J. W., BEITZ, D. C. Invited Review: Pathology, Etiology, Prevention, and Treatment of Fatty Liver in Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**. v. 87; p. 3105–3124. 2004.

BURFEIND, O.; SEPULVEDA, P., VON KEYSERLINGK, M. A.; WEARY, D. M.; VEIRA, D. M.; HEUWIESER, W. Technical note: Evaluation of a scoring system for rumen fill in dairy cows. **Journal of Dairy Science**.v.93 (8), p. 3635– 3640. 2010.

BUTLER, W.R. Nutrition, negative energy balance and fertility in the postpartum dairy cow. **Cattle Practice**.v.13, p. 13-18. 2005.

BRAGA, M. M., CASTILHOS, L. M. L., SANTOS, M. N. Biópsia hepática em bovinos: proposta de nova técnica. **Revista Centro Ciências Rurais**. Santa Maria, v. 15; p. 79-88. 1985.

CORASSIN, C. H. Importância das desordens do periparto e seus fatores de risco sobre a produção de leite de vacas Holandesas. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**. v. 32, n. 3, p. 1101-1110. 2011.

COZZI, G.; RAVAROTTO, L.; GOTTARDO, F.; STEFANI, A. L.; CONTIERO, B.; MORO, L.; BRSCIC, M.; DALVIT, P. Short communication: Reference values for blood parameters in Holstein dairy cows: Effect soft parity, stage of lactation, and season of production. **Journal of Dairy Science**. v.94, p. 3895-3901. 2011.

DIVERS, T., J.; PEEK, S., F. **Rebhun's diseases of dairy cattle**. 3^a ed.; St. Louis; Editora Elsevier; 837 p. 2018.

DRACLEY, J. K. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? **Journal of Dairy Science**. V.82, p. 2259–2273. 1999.

DRACKLEY, J. K., HEATHER, M. D., DOUGLAS, G. N., GURETZKY, N. A. J., LITHERLAND, N. B., UNDERWOOD, J. P., LOOR, J. J. Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. **Italian Journal of Animal Science**. v. 4, p. 323-344. 2005.

DUFFIELD, T. Monitoring strategies for metabolic disease in transition dairy cows. in *Le Medicin Veterinaire du Quebec*. **Proc. 23th World Buiatrics Congress**. Quebec, Canada. P. 34–35. 2004.

FERGUSON, J. D., BYERS, D., FERRY, J. Round table discussion: body condition of lactating cows. **Agric. Practice**. v. 15 (4); p. 17-21. 1994.

GARNSWORTHY, P. Manipulação nutricional do balanço energético pós-parto e o impacto sobre a fertilidade; *IV: Curso Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos*; XVII; 2013; Uberlandia. **Anais**. Uberlandia; Conapec JR.; 2013; p 13.

GONZÁLEZ F. H. D.; SILVA S. C. **Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária**. 3^a ed.; Porto Alegre; Editora da UFRGS; 538 p. 2017.

GOZZI, G.; RAVAROTTO, L.; GOTTARDO, F.; STEFANI, A. L.; CONTIERO, B.; MORO, L.; BRSCIC, M.; DALVIT, P. Short communication: Reference values for blood parameters in Holstein dairy cows: Effects of parity, stage of lactation, and season of production. **Journal of Dairy Science**. v. 94, p. 3895–3901. 2011.

GURETZKY, N. A.; CARLSON, D. B.; GARRETT, J. E.; DRACKLEY, J. K. Lipid metabolite profiles and milk production for Holstein and Jersey cows fed rumen-protected choline during the periparturient period. **Journal of Dairy Science**. v.89(1), p. 188– 200. 2006.

GRAUGNARD, D.E; MOYES, K.M; TREVISI, E ; KHAN.M.J; KEISLER, D; DRACKLEY, J.K; BERTONI, G; LOOR, J.J. Liver lipid content and inflammatory metabolic indices in peripartal dairy cows are altered in response to prepartal energy intake and postpartal intramammary inflammatory challenge. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 918 – 935. 2013.

GRUMMER, R. R.; MASHEK, D. G.; HAYIRLI, A. Dry matter intake and energy balance in the transition period. **Vet Clin. North Am Food Anim. Pract.** v. 20, p. 447-470. 2004.

HAYIRLI, A. R., GRUMMER, R.R., NORDHEIM, E.V., CRUMP, P.M. Animal and dietary factors affecting feed intake during the prefresh transition period in Holsteins. **Journal of Dairy Science**. v. 85, p. 3430–3443. 2002.

JORRITSMA, R., JORRITSMA, H., SCHUKKEN, Y. H., BARTLETT, P. C., WENSING, T., WENTINK, G. H. Prevalence and indicators of post partum fatty infiltration of the liver in nine commercial dairy herds in the Netherlands. **Livestock Production Science**. v. 68, p. 53–60. 2001.

KIM, I. H.; SUH, G. H. Effect of the amount of body condition loss from the dry to near calving periods on the subsequent body condition change, occurrence of postpartum diseases, metabolic parameters and reproductive performance in Holstein dairy cows. **Theriogenology**. v. 60, p 1445–1456. 2003.

LACETERA, N.; SCALIA, D.; FRANCI, O.; BERNABUCCI, U.; RONCHI, B.; NARDONE, A. Short communication: effects of nonesterified fatty acids on lymphocyte function in dairy heifers. **Journal of Dairy Science**. v.87, p. 1012–1014. 2004.

LEBLANC, S. J.; LESLIE, K. E.; DUFFIELD, T. F. Metabolic predictors of displaced abomasum in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**.v.88, p. 159–170. 2005.

LEBLANC, S. J. Interactions of metabolism, inflammation, and reproductive tract health in the postpartum period in dairy cattle. **Reprod. Domest. Anim.** v.47, p. 18–30. 2012.

MAcLACHLAN, N. J., CULLEN, J. M. Fígado, Sistema Biliar e Pâncreas Exócrino. *In:* CARLTON, W. W., Mc GAVIN, M. D. **Patologia Veterinária Especial de Thonson**. 2 ed., Porto Alegre: ARTMED. p. 434. 1998.

McART, J. A., NYDAM D. V., AND OETZEL, G. R. Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle. **Journal of Dairy Science**. v. 95, p. 5056–5066. 2012.

MORAIS, J. P. G.; CRUZ, A. P. S.; MINANI, N. S.; VERONESE, L. P.; DEL VALLE, T. A.; ARAMINI, J. Lactation performance of Holstein cows treated with 2 formulations of recombinant bovine somatotropin in a large commercial dairy herd in Brazil. **Journal of Dairy Science**. v. 100, p. 1–12. 2017.

OSPINA, P.; NYDAM, D.; STOKOL, T.; OVERTON, T. Evaluation of nonesterified fatty acids and hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. **Journal of Dairy Science**. v.93, p. 546–554. 2010.

PALMQUIST, D. L.BEAULIEU, A. D., BARBANO, D. M. Adsa foundation symposium: milk fat synthesis and modification. **Journal of Dairy Science**. v. 76, p. 1753-1771. 1993.

Pennsylvania StateUniversity -**Veterinary and BiomedicalSciences (Penn State)** 2017. Metabolicprofilingresource page: referencevalues. <http://extension.psu.edu/animals/health/metabolic-profiling/reference-values>.

PIÑEIRO, J. M.; MENICHETTI, B. T.; BARRAGAN, A. A.; RELLING, A. E.; WEISS, W. P.; BAS, S.; SCHUENEMANN, G. M. Associations of pre- and postpartum lying time with metabolic, inflammation, and health status of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 102, p. 1-14. 2019.

PRYCE, J. E., ROYAL, M. D, GARNSWORTHY, P. C., MAO, I. L. Fertility in the high producing dairy cow. **Livestock Production Science**.v.86, p. 125-135. 2004.

PUSHPAKUMARA, P. G. A.; GARDNER, N. H.; REYNOLDS, C. K.; BEEVER, D. E.; WATHES, D. C. Relationships between transition period diet, metabolic parameters and fertility in lactating dairy cows. **Theriogenology**. v. 60, p. 1165–1185. 2003.

QUIROZ-ROCHA, G. F.; LEBLANC, S. J.; DUFFIELD, T. F.; JEFFERSON, B.; WOOD, D.; LESLIE, K. E.; JACOBS, R. M. Short communication: Effect of sampling time relative to the first daily feeding on interpretation of serum fatty acid and β -hydroxybutyrate concentrations in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**. V. 93, p. 2030– 2033. 2010.

REID, I. M.; ROBERTS, C. J.; TREACHER, R. J.; WILLIAMS, L.A. Effect of body condition at calving on tissue mobilization, development of fatty liver and blood chemistry of dairy cows. **Animal Production**, v.43, p. 7–15. 1986.

ROSSI, C. A. R., FILAPPI, A. R., PRESTES, D. S., NORO, M., ROSSATO, F. G., LISTON, M. A. ABREU, C., COSTA, S. T., CECIM, M. Insuficiência funcional e lipídose hepática em ovinos: protocolo para indução experimental. **Revista da FZVA – Uruguaiana**. v. 12, n.1, p. 123-134. 2005.

SANTOS, J. E. P. Distúrbios metabólicos. *In*: BERCHIELLI, T. T., PIRES, V. A., OLIVEIRA, G. S. **Nutrição de Ruminantes**. 2ª ed.; Jaboticabal. Funesp; 2011; cap. 15; p. 439-513.

SEPULVEDA-VARAS, P; WEARY D. M; NORO M; VON KEYSERLINGK M. A. Transition diseases in grazing dairy cows are related to serum cholesterol and other analytes. **PLoS One**. v.10, n.3 p 0122317. 2015.

SONG, X.; BOKKRS, E. A. M; VAN DER TOL, P. P. J.; GROOT KOERKAMP, P. W. G.; VAM MOURIK, S. Automated body weight prediction of dairy cows using 3-dimensional vision. **Journal of Dairy Science**. v. 101, p. 4448– 4459. 2018.

THRALL M. A. et. al. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**, 2 ed., GUANABARA KOOGAN, Rio de Janeiro, p. 349 a 360, 2015.

TREACHER, R. J., REID, I. M. ROBERTS, C. J. Effect of body condition at calving on the health and performance of dairy cows. **Animal Production**. v. 43, p. 1–6. 1986.

TREVISI, E.; BERTONI, G.; LOMBARDELLI, R.; MINUTI, A. Relation of inflammation and liver function with the plasma cortisol response to adrenocorticotropin in early lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 96, p. 5712– 5722. 2013.

VANROBAYS, M. L.; VANDENPLAS, J.; HAMMAMI, H.; FROIDMONT, E.; GENGLER, N. Short communication: Novel method to predict body weight of primiparous dairy cows throughout the lactation. **Journal of Dairy Science**. v.98, p. 692– 697. 2014.

4.1.8 Figuras

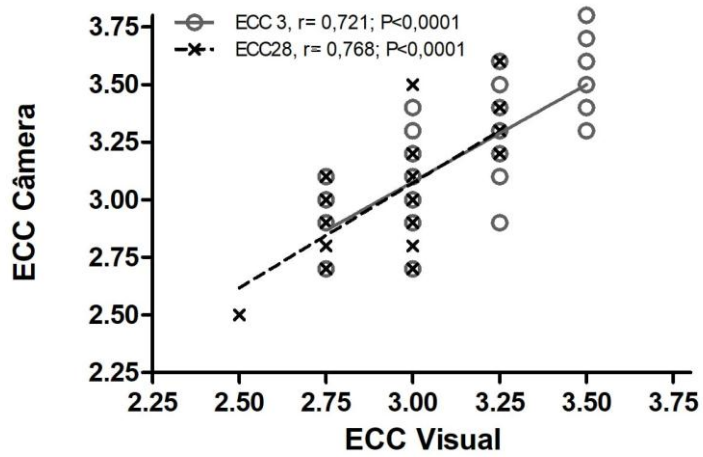


Figura 1: Mostra a correlação entre o escore de condição corporal (ECC) obtido de forma subjetiva (visual) e objetiva (camera) no 3º e 28º dia pós-parto.

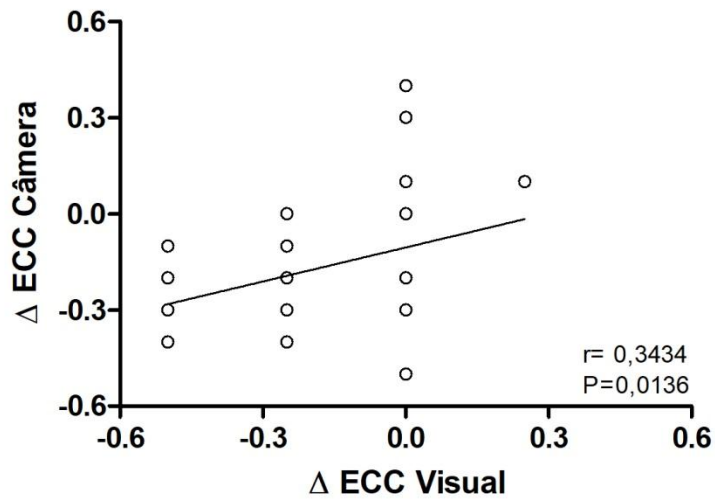


Figura 2: Mostra a correlação entre a diferença (Δ) obtida pela forma subjetiva e objetiva de avaliação.

4.1.9 Tabelas

Tabela 1. Valores médios e desvio padrão dos metabólitos e escore de condição corporal (ECC) no terceiro e vigésimo oitavo dia pós-parto (N= 51).

Indicador (unidades)	Valor de referência	Terceiro dia pós-parto	Vigésimo oitavo dia pós-parto
AST (U/L)	<132*	49,74 ± 17,34	48,68 ± 19,78
Albumina (g/L)	27 - 35*	32,94 ± 2,49	34,04 ± 2,18
BHB (mmol/L)	<1,4*	0,51 ± 0,20	0,47 ± 0,17
Bilirrubina (mg/dL)	<0,54**	0,11 ^a ± 0,07	0,06 ^b ± 0,02
Colesterol (mg/dL)	80 - 120*	54,57 ^b ± 11,43	109,90 ^a ± 26,47
FA (U/L)	<196**	138,01 ± 51,58	81,13 ± 24,55
GGT (U/L)	<39**	27,60 ± 9,79	26,96 ± 5,34
NEFA (µmol/L)	<700*	577 ± 371	364 ± 234
ECC objetivo (câmera)	1-5	3,16 ± 0,24	2,99 ± 0,24
ECC subjetivo (visual)	1-5	3,10 ± 0,20	2,91 ± 0,20

*GONZÁLEZ & SILVA, (2017); ** GOZZI et al. (2011). Letras diferentes indicam diferença significativa para o indicador ($P < 0,05$)

Tabela 2. Valores médios e desvio padrão dos metabólitos e escore de condição corporal (ECC), no terceiro e vigésimo oitavo dia pós-parto das vacas com lipidose (N= 5).

Indicador (unidades)	Valor de referência	Terceiro dia pós-parto	Vigésimo oitavo dia pós-parto
AST (U/L)	<132*	52,0 ± 15,12	49,60 ± 14,04
Albumina (g/L)	27-35*	32,04 ± 2,06	32,78 ± 2,47
BHB (mmol/L)	<1,4*	0,51 ± 0,22	0,50 ± 0,21
Bilirrubina (mg/dL)	<0,54**	0,13 ^a ± 0,03	0,08 ^b ± 0,03
Colesterol (mg/dL)	80-120	52,26 ± 12,98	82,95 ± 22,71
FA (U/L)	<196**	114 ± 42,33	94,60 ± 35,59
GGT (U/L)	<39**	26,77 ± 11,44	27,35 ± 7,13
NEFA (µmol/L)	<700*	692 ± 391	386 ± 346

*GONZÁLEZ & SILVA, (2017); ** GOZZI et al. (2011). Letras diferentes indicam diferença significativa para o indicador ($P < 0,05$).

Tabela 3. Valores médios e desvio padrão dos metabólitos das vacas com sem lipidose hepática (N= 102).

Indicador (unidades)	Valor de referência	Vacas sem lipidose hepática	Vacas com lipidose hepática
N=		92	10
AST (U/L)	<132*	49,36 ± 39,99	50,80 ± 19,06
Albumina (g/L)	27-35*	33,61 ± 5,77	32,41 ± 4,68
BHB (mmol/L)	<1,4*	0,49 ± 0,03	0,50 ± 0,04
Bilirrubina (mg/dL)	<0,54**	0,08 ± 0,04	0,10 ± 0,01
Colesterol (mg/dL)	80-120*	83,83 ± 32,77	67,61 ± 26,92
FA (U/L)	<196**	110,15 ± 56,91	104,30 ± 64,45
GGT (U/L)	<39**	27,31 ± 6,48	27,06 ± 8,01
NEFA (µmol/L)	<700*	463 ± 105	538 ± 125

*GONZÁLEZ & SILVA, (2017); ** GOZZI et al. (2011). Letras diferentes indicam diferença significativa para o indicador ($P < 0,05$)

4.2 Artigo científico 2

Relation Between Liver Lipid Content and Plasma Biochemical Indicators in Dairy Cows

Chester Patrique Batista¹, Sandra Marcela Castro², Héctor Jairo Correa², Rodrigo Schallenger Gonçalves¹, Stella de Faria Vale¹ & Félix Hilario Diaz González¹

¹Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil;

²Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín.

Author for correspondence: C. Batista [batista_chester@hotmail.com - Tel.: +55(55)991669482].

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

4.2.1 ABSTRACT

Introduction: Milk is one of the six most important animal products produced in Brazil and plays an important role in the economic sustainability of many rural areas. The incidence of metabolic disorders in dairy cows has increased as a result of intensive production practices and genetic selection for high milk yield. Among such disorders, liver lipodosis is very frequently observed and has significant negative effects on cow health and milk yield. Severe energy supply deficit causes high fat mobilization, resulting in rapid body condition loss and liver lipid infiltration, which cannot always be detected by blood biochemical indicators. The main objective of the study was to determine possible associations of blood biochemical parameters with liver lipid infiltration severity in high-yield multiparous Holstein cows between prepartum and postpartum periods.

Materials and Methods: Fifty-four high-yield Holstein cows from a herd managed in a free-stall system in the northwest region of the state of Rio Grande do Sul, Brazil were evaluated. Cows divided in two groups according to their physiological status. Group 1

included 19 prepartum cows, with an average milk yield of 44.7 L/d in the previous lactation, and 2.8 average parity, and group 2, 35 postpartum cows, with an average milk yield of 46.8 L/d in the previous lactation, and 2.5 average parity. Total cholesterol (CH), triglyceride (TGp), beta-hydroxybutyrate (BHB), albumin (ALB), non-esterified free fatty acids (NEFA) levels, and aspartate aminotransferase (AST) and creatine kinase (CK) activities were analyzed in the plasma and triglyceride (TGI) levels in liver tissue samples.

Results: An overall incidence of 20% severe hepatic lipidosis was determined both in prepartum and postpartum cows. Positive correlations between days in milk (DIM) and AST ($r= 0.43, P<0.01$), CH and TGp ($r= 0.44; p<0.01$), TGI and AST ($r=0.32; P<0.05$), NEFA and AST ($r= 0.45; P<0.01$) and CK and AST ($r= 0.447; P<0.01$) were determined. Negative correlations between TGp and DIM ($r= -0,45; P<0,01$), and between TGI and TGp ($r= -0.30; P<0.05$) were detected.

Discussion: Prepartum cows showed moderate fat infiltration in the liver, while 25.7% of postpartum cows and 20% of all cows presented severe lipidosis, and their TGp values suggested higher degree of fat infiltration and lipolysis in the liver. AST values increased as lactation progressed, suggesting a greater tendency of liver damage, at least immediately postpartum. The obtained CK values were within the reference range, except for the cows with hepatic lipidosis, indicating that the measured AST originated from the liver and non-muscle tissues. Plasma TG, NEFA and AST values indicate the degree of fat mobilization and TG infiltration in the liver. Although negative energy balance (NEB) may trigger lipolysis and some degree of hepatic lipidosis, plasma BHB values did not significantly increase. The obtained results show that the evaluated plasma parameters may be useful to establish guidelines for the identification of

changes in the metabolic profile of dairy cows during different production stages, as well as measures for the prevention and control of metabolic disorders.

Keywords: dairy cows, free fatty acids, liver lipidosiis, triglyceride levels.

4.2.2 INTRODUCTION

Milk production is an important economic activity worldwide [17]. In Brazil, it is one of the largest animal industries, and accounts for the economic sustainability of many rural areas. Today, Brazil has approximately 1,300,000 dairy farms, employing at least 3.6 million people and contributing 34.3 billion Brazilian reais to GDP (Gross Domestic Product), with an average growth of 5% per year [15].

Due to intensive management practices and genetic selection for high milk yield, a higher incidence of metabolic disorders, known as production diseases, has been observed [22]. In dairy farms with high milk production, metabolic diseases can affect more than 50% of the herd [11]. Such disorders are generally caused by severe energy supply deficits on the onset of lactation, which lead to accelerated body condition loss as a result of excessive body fat mobilization and lipid oxidation, consequently increasing lipid deposition in the liver [24,34]. Friggen et al. [21] suggest that the process of lipid mobilization is a natural phenomenon in most mammals, and it is part of an orchestrated internal activity between energy demand and supply to support the onset of the new lactation.

The adipose tissue is the largest energy reserve of mammals and it used as an energy source when dietary energy availability is low [1]. Although several tissues are involved in the process of fatty acid utilization, the liver is the most important organ for

the maintenance of metabolic homeostasis during periods of nutrient imbalance, particularly of blood glucose levels. When body reserves are mobilized, the liver receives a high amount of fatty acids from the adipose tissue, which must be oxidized to supply the animal's energy requirements [20].

Hepatic lipidosis, also referred as hepatic steatosis or fatty liver, is a common condition in dairy cows, and it is considered as one of the most detrimental metabolic disorders [43]. Bobe et al. [8] defined hepatic lipidosis as the level of liver triglycerides (TG) that causes negative effects on health, welfare, productivity and reproductive performance of dairy cows. In the long term, high TG levels negatively affect reproductive performance and milk production, as they disrupt the normal metabolic functions of the liver tissue, and have been associated with dystocia, infectious puerperal diseases, and inflammation [23,24,25]. Jorritsma et al. [30] performed a study with 218 dairy cows and observed a 54.1% prevalence of hepatic lipidosis, defined as TG levels higher 50 mg/g of fresh liver tissue.

Due to difficulty of evaluating the degree of hepatic lipidosis in dairy cows in the field, this study aimed at evaluating the relation between liver TG levels and those of several common blood biochemical parameters, such as triglycerides, total cholesterol, free fatty acids, beta-hydroxybutyrate, albumin, and the activities of the enzymes aspartate aminotransferase and creatine kinase, in order to obtain information that may allow diagnosing this type of metabolic disorder in high-yield dairy cows under practical conditions.

4.2.3 MATERIALS AND METHODS

Location and animals

This study was carried out on a commercial dairy farm, located in Condor, state of Rio Grande do Sul, Brazil. The cows were housed in a free-stall system.

Fifty-four Holstein cows were evaluated. Cows were classified, according to their physiological status as prepartum cows (N= 19) and postpartum cows (N= 35). Prepartum cows were multiparous, with 2.8 average parity (2 to 6 calvings), average milk yield of 44.7 L/d in the previous lactation (100 days) and were evaluated, on average, on day -7.5 before calving (-1 to -13 days). Postpartum cows had 2.5 average parity (1 to 5 calvings), average milk yield of 46.8 L/d (100 days of lactation), were evaluated, on average, on day 6.6 of lactation (1 to 17 days). The farm produced 10,000 kg milk per year, containing 3.5% of fat, 3.2% of protein and 4.7% of lactose.

All cows were fed balanced diets to meet the nutritional requirements of Holstein cows during the dry period and lactation as recommended by the NRC (2001). The prepartum diet was composed of corn silage, wheat straw, corn meal, wheat meal, soybean meal, minerals and vitamins. The postpartum diet was composed of corn silage, wheat silage, wheat straw, corn meal, soybean meal, soybean hulls, cottonseed meal, minerals and vitamins.

Sample collection

All cows were submitted to liver biopsy using a Tru-Cut® needle through a 1-cm long incision in the 11th intercostal space, according to the methodology described by Van den Top [51]. Samples of approximately 35 mg of tissue were collected in duplicate, and stored in 2-mL microtubes containing Hartman solution (130 meq of sodium, 4 meq of potassium, 3 meq of calcium, 109 meq of chloride, and 28 meq of lactate per L). Tubes were maintained at -10°C until and during transportation to the laboratory (Lacvet, School of Veterinary Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil), where they were frozen at -20°C until analyses.

Blood samples were collected in 10-mL heparinized vacuum tubes (Vacutainer®, Becton Dickinson, Brazil), and maintained in a cooler until arrival at the lab. In the lab, blood samples were centrifuged at 2,500 rpm for 10 min, and the obtained plasma was immediately placed into microcentrifuge tubes and frozen until analyses.

Biochemical analyses

Plasma levels of free fatty acids (non-esterified fatty acids; NEFA)², beta-hydroxybutyrate (BHB)¹, triglycerides, total cholesterol², albumin², and the activities of the enzymes aspartate aminotransferase (AST)², and creatine kinase (CK)² were measured [42] using an automatic analyzer³.

In liver samples, a lipid extract was obtained using the method described by Starke et al. [49]. The Hartmann solution tubes containing liver samples were thawed at room temperature. The liver sample was removed from the tube using tweezers, and placed on absorbent paper for 10 seconds in order to remove excessive humidity and fibrin residues. Samples were then placed in a round bottom, duly-identified tube, capped, and weighed on analytical scale (0.1-mg precision). The samples were then manually homogenized inside the tube for 2 min. Both liver homogenates and their respective empty tubes were weighed. Total liver fresh homogenate weight was calculated as liver homogenate weight minus empty tube weight.

Total lipid extraction was based on the technique described by Starke et al. [49] with the modifications introduced by Galvis et al. [25]. Two mL of a 3:2 mixture of hexane at 95% and isopropanol were added to the tube containing the liver homogenate. Tubes were tightly sealed, and placed in a vertical rotor at 30 rpm at room temperature for 24 hours, after which 1 mL of sodium sulfate solution (Na₂SO₄) at 0.455 mmol/L was added to each tube. The tubes were vortexed at 2,000 rpm for 2 min, and then centrifuged at 2,500 rpm for 5 min. The supernatant was transferred to a duly-labeled

and weighed tube. In order to ensure complete rinsing of the sample residue, 1 mL of hexane was added again to the precipitate, which was vortexed at 2,000 rpm for 2 min, and then centrifuged at 2,500 rpm for 10 minutes at room temperature. The supernatant was removed and added to the tube containing the previously-obtained supernatant. The open tubes were then allowed to evaporate until reaching room temperature to ensure the complete removal of the solvents, weighed, and their respective empty tube weight was subtracted to obtain total extracted lipid weight. Total lipid content was gravimetrically calculated as mg of total lipids per g of liver tissue, considering the initial weight of the fresh liver homogenate.

The tubes containing the lipid extract were capped and refrigerated at 3°C until triglyceride quantification, according to the technique described by Galvis et al. [25]. A volume of 500 µL of hexane at 95% was added to the tubes containing an average of 4.4 mg lipid extract in order to achieve sufficient volume to allow the determination of triglycerides and to dilute total lipids to the concentration range required for these determinations. The method previously described by Starke [49] with modifications was applied. As the obtained volume of liver homogenate was low, the resulting volume of total lipids extracted was low. The determination of triglycerides in the extract was performed by spectrophotometry using the same methodology applied for triglyceride determination in the plasma (Labtest, Brazil).

Lipidosis was classified as a function of lipid deposition in the liver samples, according to the method described by Bobe et al. [8]. Lipidosis was considered mild when samples presented between 1 to 5% TG infiltration, moderate between 5 and 10% TG infiltration, and severe with TG infiltration than 10% of the liver tissue.

Statistical analysis

The SPSS statistical software [54] was used for the statistical analyses. obtained data were analyzed for normality by the Shapiro-Wilk test and for homoscedasticity by Bartlett test. Data were submitted to analysis of variance, and means were compared by the t-test (PROC TTEST). Pearsons' correlation test (PROC CORR) was used to compare the results between prepartum and postpartum cows, and between those with and without lipidosis.

4.2.4 RESULTS

Table 1 shows the liver triglyceride and plasma biochemical results obtained in prepartum and postpartum cows. Prepartum cows presented higher plasma triglyceride levels ($P < 0.05$) than postpartum cows, while higher liver triglyceride and NEFA levels and AST and CK activities ($P < 0.05$) were determined in postpartum cows than in prepartum cows. Liver triglyceride levels in prepartum cows was 50 to 100 mg/g of tissue, while 25.7% (9 out of 35 cows) of postpartum cows presented triglyceride levels higher than 100 mg/g tissue.

Table 2 shows liver triglyceride values and plasma biochemical indicators of cows with hepatic lipidosis and without lipidosis. Despite the lack of statistical significance, cows with lipidosis showed numerically higher TGI, NEFA, BHB levels and AST and CK activities compared with those without lipidosis, which plasma TG, CH and ALB levels were numerically higher than those with lipidosis. Overall, 20% of cows with lipidosis presented liver TG levels higher than to 100 mg/g tissue. The values of all parameters were within the reference ranges, except for CH, which values were lower both in cows with and without lipidosis, and CK activity, which were higher in cows with lipidosis.

The analysis of the correlations among metabolic parameters showed significant negative correlation between days in milk (DIM) and plasma triglycerides (TRp) (Figure 1a), and significant positive correlation between DIM and plasma AST activity (Figure 1b). A negative correlation between plasma and liver TG levels, indicating that plasma TG levels increased as liver TG levels decreased (Figure 2a). Figure 2b shows the negative correlation between plasma TG and NEFA. On the other hand, during the peripartum period, plasma CH levels period were positively correlated with plasma TG levels (Figure 2c). Figures 3a and 3b show a significant positive correlation between AST activity and liver TG and plasma NEFA levels, despite the high variability. Figure 3c show a positive correlation between AST and CK enzyme activities.

4.2.5 DISCUSSION

The obtained biochemical indicator values were within the reference ranges reported for dairy cows [42], except for cholesterol in both groups, and CK activity in postpartum cows with lipidosis, and TG levels in prepartum cows. Liver TG levels determined in prepartum cows (50 to 100 mg/g of tissue) indicate the presence of moderate liver lipidosis [8]. On the other hand, severe liver lipidosis was detected in 25.7% of postpartum cows and 20% of both prepartum and postpartum cows presenting liver lipidosis, corresponding to liver TG levels higher 100 mg/g of tissue, according to the classification of Bobe et al. [8]. During the transition period, cows typically start mobilizing their body reserves [38]. Some authors, such as Friggens et al. [21], state that it is a natural phenomenon, commonly observed in most mammals, and part of an orchestrated internal activity to support the onset of the new lactation [4]. When cows mobilize adipose tissue, their fatty acid oxidation capacity [54] may be overwhelmed,

resulting in the accumulation of liver TG, increased activity of plasma enzymes such as AST, and increased production of ketone body [29,54], which may lead to metabolic disorders such as ketosis and liver lipidosi [31,54].

The extensive physiological and metabolic changes that occur during the peripartum period may cause metabolic disorders due to the limited ability of the liver to synthesize and secrete very low-density lipoproteins (VLDL), compromising TG liver export during periods of great liver uptake of NEFA [6], resulting in TG accumulation in the liver. The production of NEFA and ketone bodies, which serve as alternative energy sources, are a result of the body adaptation to the negative energy balance (NEB) observed during the transition period [44]. Undoubtedly, an excessive increase in the production of these metabolites indicates poor adaptive response to NEB [44], and has a direct negative effect on animal health and welfare [39].

The negative correlation between days in milk (DIM) and plasma TG levels (TRP) detected in the present study is consistent with the reports of several authors on plasma TG levels around calving [3,13,39,53]. This finding is very frequent during the transition period, particularly during prepartum, as also detected in the present study in both prepartum and postpartum cows, which plasma TG levels were higher than the reference values. During peripartum, cows experience several metabolic changes in preparation for lactation, including a decrease in plasma glucose levels concurrent with the mobilization of body reserves [5,7,16]. As the cow is not able to consume enough feed to supply its energy requirement, it mobilizes body fat reserves as an alternative energy source to maintain glycemia [18].

The positive correlation between DIM and plasma AST activity results of the present study are in agreement with the study of Stojević et al. [50], who also found variable AST activities during the peripartum. Van den Top [51] determined that AST activity

was highest during the first days of lactation, whereas the lowest values were detected during the dry period. AST is an acute-phase enzyme found in the mitochondria and in a smaller amount in the hepatocyte cytosol, and it is released when there are liver lesions, accumulation of lipids in the liver, inflammation, and muscle lesions [50]. The AST values obtained in the present study are higher compared to those reported by Van den Top [51], and were statistically higher in cows with liver lipidosis than those without lipidosis, although within the reference range for cows during the transition period [42]. AST activity shows slight and irregular changes during pregnancy and early lactation due to changes in the cow's energy status due to several metabolic changes that produce an immediate response. As a consequence, changes in plasma AST activity may be a result of cell activity degree, mainly in the liver, but also a reflection of possible damage of the cell structure [51]. This explains the higher AST activity presented by cows with liver lipidosis than those without lipidosis due to the cell damage as a result of fat accumulation in hepatocytes.

The negative correlation between liver and plasma TG levels suggests that plasma TG levels may be used as an indicator of liver lipidosis severity. In the present study, all cows showed higher liver TG levels than those reported by Starke et al. [48] and Contreras et al. [12]. Liver TG levels of 20-50 mg/g of tissue indicate moderate degree of fat infiltration, whereas levels higher 100 mg/g of liver indicate high degree [32,44]. Among the several indicators currently used to determine the presence of different metabolic disorders in dairy cows, liver TG levels are used to identify cows with hepatic lipidosis [49], a frequent disorder during peripartum related to the mobilization of body reserves [52]. During the peripartum period, nutritional imbalance is frequent, and one of the main consequences is the presence of high blood fatty acid levels [12]. The negative correlation between plasma TG and NEFA levels also support an inverse

relationship between plasma TG levels and lipolysis. NEFA are the blood metabolites most directly associated with energy balance, with the highest levels determined during in the late dry period (close-up), particularly between calving day and the first week postpartum [30]. On the other hand, Fioreet al. [19] mentioned that under NEB (usually in the first three postpartum weeks), both growth hormone and glucagon expression and tissue response increase, promoting lipolysis, resulting in an elevation of circulating NEFA levels. The NEFA values obtained in 90.7% of the cows of the present study were lower than 500 $\mu\text{mol/L}$, indicating low fat mobilization. These results are in agreement with those reported by Diaz-Gonzalez et al. [13], who found NEFA values between 237 and 536 $\mu\text{mol/L}$ in cows with low and high lipid mobilization, respectively.

Plasma cholesterol results were positively correlated with plasma TG levels, but were lower than the reference values in cows with and without hepatic lipidosis and those in peripartum [42]. In general, both cows in peripartum and those with hepatic lipidosis have low cholesterol levels due to their low dry matter intake during this period [32]. Plasma cholesterol values reflect feed intake and endogenous cholesterol production [35]. These factors may have contributed to the low cholesterol levels determined in both groups. The obtained cholesterol levels were lower than those reported by Mohebbi-Fani et al. [40] in Holstein cows immediately postpartum, but higher than those reported by Carlson et al. [10] and by Piccione et al. [42], who also studied Holstein cows in the peripartum period. The concomitant increase in plasma cholesterol and TG values are consistent with those reported by Seif et al. [47] who determined a rapid increase in plasma cholesterol values in early lactation. Kessler et al. [32] mentioned that, in addition to glucose and lipid metabolism, cholesterol metabolism should adapt to the beginning of the new lactation. The liver synthesis of cholesterol

and other metabolites occurs mainly as a response to mammary gland needs and as a result of the changes that occur during homeorhesis and metabolic adaptation of the liver during early lactation [26].

The positive correlation between AST activity and liver TG levels suggests the presence of liver injury as lipid infiltration increases, albeit with high variability. This variability suggests the capacity of individual cows to maintain liver tissue integrity in response to liver TG accumulation. In the present study, AST values were within the reported reference values (<132 U/L) [42] in most of the cows, and consistent with those reported by Galvis et al. [25], who found high AST values during postpartum, probably due to the continuous metabolic load imposed the onset of lactation. Djokovic et al. [14] found positive correlations between the liver lipid infiltration degree and fat mobilization markers (NEFA, BHB, and AST) as in the present study. According to those authors, AST activity expression in the liver tissue indicates liver injury and to a great extent contributes to evaluate possible tissue damage [35,37,41]. On the other hand, Ahmadi et al. [2] mentioned that the analysis of AST is not sufficiently reliable to diagnose liver changes, mainly due to the wide variation of AST serum levels among individuals, in addition of not being sufficiently sensitive in ruminants to be used as an indication of liver function. The positive correlation between AST and liver TG levels clearly indicates a disorder, since liver TG levels increase due to the high NEFA amounts received by the liver in response to lipolysis as a result of the mobilization of fat reserves accumulated as triglycerides [27, 33].

The physiological variation of CK and AST enzymes estimated for dairy cows is above 200 U/L and 132 U/L, respectively [48]. Sattler & Fürll [46] determined a CK activity of 309 U/L in cows in 1-3 weeks postpartum, which values are higher than those obtained in the present study. On the other hand, Marutsova [37] reported CK values of 148-171

U/L and AST values of 105-108 U/L in dairy cows between 0 and 45 days postpartum, which values are close to those determined in this study. Most of the values CK and AST values determined in the present study are within the reference values reported by Bobe et al. [8] and Contreras et al. [12], except for CK in cows with hepatic lipidosis [42]. Plasma AST activity provides information on liver damage, as it is found in the cytosol (40%) and mitochondria (60%) of cells [8,13]. Changes in AST plasma activity occur as a result of increased tissue activity (mainly of the liver) and as a reflection of damage of the cell structure [51]. We hypothesize that several of the evaluated cows presented hepatic lipidosis as AST values were higher than the physiological value. Undoubtedly, it may be assumed that this condition may change, because NEFA, BHB and plasma TG values were within the normal reference values for Holstein cows during the initial lactation period. On the other hand, plasma CK activity remained within the reference values. This enzyme of muscular origin is analyzed to differentiate possible increases of AST of non-hepatic origin [28]. Therefore, in the present study, it is possible to assert that the observed AST changes reflect liver and not muscle lesions, except for those with hepatic lipidosis, which presented high AST activity and CK activity higher than the reference value, which may indicate liver injury. In general, hepatic lipidosis tends to increase muscle proteolysis. As cows have low dry matter intake, muscle-derived amino acids are need to supply protein requirements, which increases CK activity [51].

The obtained plasma albumin levels were within the reference value in all evaluated cows [42]. Despite the lack of statistical difference, the numerically lower albumin levels at the onset of lactation in postpartum cows presenting hepatic lipidosis may indicate that these animals may have experienced an inflammatory process during postpartum. Albumin levels remain high until the end of gestation; however, they

slightly decrease postpartum as there is an inflammatory process, because albumin is a negative acute phase protein [13]. According Van Den Top et al. [51] in addition to liver function, albumin levels may be affected by inflammatory processes, because albumin is a protein that takes about 21 days to be synthesized and to reestablish its normal levels. This suggests that postpartum cows with hepatic lipidosis suffered from an inflammatory process but recovered during lactation, which is in agreement with the literature [42].

BHB levels were within the reference value for all evaluated cows [42]. The finding of BHB values not indicative of ketosis status reinforces the notion that NEB may trigger lipolysis and even some degree of hepatic lipidosis without necessarily increasing BHB levels if NEFA are completely oxidized, thereby reducing the production of intermediate metabolites [13,36]. Undoubtedly, BHB levels should continue to be used as NEB indicators because their applicability under field conditions [9].

4.2.6 CONCLUSIONS

The evaluation of the metabolic profile of dairy cows continues to be an invaluable tool to evaluate specific changes experienced during specific stages of their production cycle. Establishing the degree of hepatic lipidosis of postpartum cows in the field is still difficult; however, the results of this study showed that blood indicators were closely correlated with liver evidences of hepatic lipidosis. The significant negative correlations between liver and plasma TG levels and between NEFA and plasma TG levels, as well as the positive correlations between liver TG levels and AST activity and NEFA levels and AST activity indicate that plasma TG and NEFA levels and AST activity can be used as indicators of the degree of fat mobilization and liver TG infiltration. BHB

values seem to be useful as indicators of negative energy balance, but not of hepatic lipidosis.

MANUFACTURERS

¹Randox, Ireland

²Labtest, Brazil

³Metrolab CM200, Argentina

Ethical approval. All procedures, treatments and animal care were in compliance with the guidelines of the Ethical Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Project n° 32692).

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of paper.

4.2.7 REFERENCES

- 1 **Aeberhard K., Bruckmaier R.M. & Blum J.W. 2001.** Metabolic, enzymatic and endocrine status in high-yielding dairy cows. Part 2. *Journal of Veterinary Medicine A: Physiology, Pathology, Clinical Medicine*. 48: 111,127.
- 2 **Ahmadi M., Safi S., Mortazavi P. & Rokni N. 2016.** Evaluation of the enzyme changes in different grades of fatty liver syndrome in dairy cows. *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences*, 5: 476–488.

- 3 **Ayad M.A., Benallou B., Saim M.S., Smadi M.A. & Meziane T. 2013.** Impact of feeding yeast culture on milk yield, milk components, and blood components in Algerian dairy herds. *Journal of Veterinary Science & Technology*. 4: 2-5.
- 4 **Bauman D.E & Currie W.B. 1980.** Partitioning of Nutrients during Pregnancy and Lactation: A Review of Mechanisms Involving Homeostasis and Homeorhesis. *Journal of Dairy Science* 63 (9): 1514–29.
- 5 **Bell A.W. 1995.** Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of Animal Science*. 73: 2804-2819.
- 6 **Bisinotto R.S., Greco L.F., Ribeiro E.S., Martinez N., Lima F.S., Staples C.R. & Santos J.E.P. 2012.** Influences of nutrition and metabolism on fertility of dairy cows. *Animal Reproduction*. 9: 260–272.
- 7 **Block E. & Sanchez W. 2000.** Special nutritional needs of the transition cow. In: *Middle South Nutrition Conference*, Dallas, TX. pp. 1-16.
- 8 **Bobe G., Young J.W. & Beitz, D.C. 2004.** Invited review: pathology, etiology, prevention and treatment of fatty liver in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 87: 3124.
- 9 **Campos R., González F., Coldebella A., & Lacerda L. 2007.** Indicadores do metabolismo energético no pós-parto de vacas leiteiras de alta produção e sua relação com a composição do leite. *Ciência Animal Brasileira*. 8: 241-249.
- 10 **Carlson D.B., McFadden J.W., D'Angelo A., Woodworth J.C. & Drackley J.K. 2007.** Dietary L-Carnitine affects periparturient nutrient metabolism and lactation in multiparous cows. *Journal of Dairy Science*. 90: 3422–3441.
- 11 **Ceballos A., Gómez P.M., Vélez M.L., Villa N.A, & López L.F. 2002.** Variación de los indicadores bioquímicos del balance de energía según el estado productivo en

- bovinos lecheros de Manizales, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 15: 12-25.
- 12 **Contreras G.A., O'Boyle N.J., Herdt T.H., & Sordillo L.M. 2010.** Lipomobilization in periparturient dairy cows influences the composition of plasma non esterified fatty acids and leukocyte phospholipid fatty acids. *Journal of Dairy Science*. 93: 2508–2516.
- 13 **Diaz-Gonzalez F., Muiño R., Pereira V., Campos R, & Benedito J. 2011.** Relationship among blood indicators of lipomobilization and hepatic function during early lactation in high-yielding dairy cows. *Journal of Veterinary Science*. 12: 251-255.
- 14 **Djoković R., Samanc H., Jovanović M., Fratrić N., Dosković V. & Stanimirović Z. 2013.** Relationship among blood indicators of hepatic function and lipid content in the liver during transitional period in high-yielding dairy cows. *Acta Scientiae Veterinariae*. 41: 1-6.
- 15 **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2012.** Balanço Social. 21 ed. 21p.
- 16 **Esposito G., Irons P.C., Webb E.C. & Chapwanya A. 2014.** Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. *Animal Reproduction Science*. 144: 60-71.
- 17 **Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2016.** Biannual report on global food markets. Available at: <<http://www.fao.org/3/a-I5703E.pdf>>. [Accessed on line in July 2017].
- 18 **Farman M., Nandi S., Girish V., Tripathi S.K. & Gupta P.S. 2016.** Effect of metabolic stress on ovarian activity and reproductive performance of dairy cattle: A review. *Iranian Journal of Applied Animal Science*. 6: 1–7.
- 19 **Fiore E., Piccione G., Perillo L., Barberio A., Manuali E., Morgante M. &**

- Gianesella M. 2017.** Hepatic lipidosis in high-yielding dairy cows during the transition period: haematochemical and histopathological findings. *Animal Production Science*. 57: 74–80.
- 20 **Frayn K.N., Arner P. & Yki-Järvinen H. 2006.** Fatty acid metabolism in adipose tissue, muscle and liver in health and disease. *Essays in Biochemistry*. 42: 82-103.
- 21 **Friggens N.C., Andersen J.B., Larsen T., Aaes O. & Dewhurst R.J. 2004.** Priming the dairy cow for lactation: a review of dry cow feeding strategies. *Animal Research*. 53: 453–473.
- 22 **García A., Cardoso F.C., Campos R., Thedy D.X. & González F. 2011.** Metabolic evaluation of dairy cows submitted to three different strategies to decrease the effects of negative energy balance in early postpartum. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 31(Supl.1):11-17.
- 23 **Gaviria B.G., Gutiérrez H.N., Molina S.E., Ruiz M.I. & Tamayo P.C. 1999.** Estudio de la infertilidad bovina en las zonas lecheras de Antioquia. Universidad de Antioquia, Instituto Colombiano Agropecuario, Colanta, 100 p.
- 24 **Galvis R.D., Correa H. & Ramírez N.F. 2003.** Interacciones entre el balance nutricional, los indicadores del metabolismo energético y proteico y las concentraciones plasmáticas de Insulina, e IGF-1 en vacas en lactancia temprana. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 16: 237–248.
- 25 **Galvis R.D., Ramirez N.F. & Giraldo A.M. 2016.** Extraction, quantification and distribution of the major lipid fractions in small liver biopsies of cows in transition period. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*. 11: 26-38.
- 26 **Gross J.J., Kessler E.C., Albrecht C. & Bruckmaier R.M. 2015.** Response of the cholesterol metabolism to a negative energy balance in dairy cows depends on the lactational stage. *PLoS One* 10, e0121956. doi:10.1371/ journal. pone.0121956.

- 27 **Gürgöze S.Y., Zonturlu A.K., Özyurtlu N. & İçen, H. 2009.** Investigation of some biochemical parameters and mineral substance during pregnancy and post partum period in Awassi ewes. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 15: 957-963.
- 28 **Han van der Kolk J. H., Gross J. J., Gerber V. & Bruckmaier R.M. 2017.** Disturbed bovine mitochondrial lipid metabolism: a review. *Veterinary Quarterly*. 37: 262–273.
- 29 **Hoff, B. & Duffield T. 2015.** Nutritional and metabolic profile testing of dairy cows. Animal Health Laboratory, *Laboratory Notes*. 4: 1-3.
- 30 **Jorritsma R., Jorritsma H., Schukken H. & Went G.H. 2000.** Relationships between fatty liver and fertility and some periparturient diseases in commercial Dutch dairy herds. *Theriogenology*. 54: 1065-1074.
- 31 **Kalaitzakis E., Panousis N., Roubies N., Giadinis N., Kaldrymidou E., Georgiadis M. & Karatzias H. 2010.** Clinicopathological evaluation of downer dairy cows with fatty liver. *Canadian Veterinary Journal*. 51: 615–622.
- 32 **Kessler E.C., Bruckmaier R.M. & Gross J.J. 2014.** Milk production during the colostral period is not related to the later lactational performance in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 97: 2186–2192.
- 33 **Kuhla B., Metges C. C. & Hammon H. M. 2016.** Endogenous and dietary lipids influencing feed intake and energy metabolism of periparturient dairy cows. *Domestic Animal Endocrinology*. 56: S2–S10.
- 34 **Kupczynski R. & Chudoba-Drozdowski B. 2002.** Values of selected biochemical parameters of cow blood during their drying-off and the beginning of lactation. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*. 55: 225-231.

- 35 **Kurpínska A.K, Jarosz A, Ozgo M & Skrzypczak W.F. 2015.** Changes in lipid metabolism during last month of pregnancy and first two months of lactation in primiparous cows – analysis of apolipoprotein expression pattern and changes in concentration of total cholesterol, HDL, LDL, triglycerides. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 18: 291–298
- 36 **Lubojacka V., Pechova A., Dvorak R., Drastich P., Kummer V. & Poul J. 2005.** Liver steatosis following supplementation with fat in dairy cow diets. *Acta Veterinaria Brno*. 74: 217-224.
- 37 **Marutsova V. 2016.** Investigations on blood enzyme activities in cows with subclinical and clinical ketosis. *International Journal of Advanced Research*. 4: 1040-1045.
- 38 **McArt J.A., Nydam D.V., Oetzel G.R., Overton T.R. & Ospina P.A. 2013.** Elevated non-esterified fatty acids and β -hydroxybutyrate and their association with transition dairy cow performance. *The Veterinary Journal*. 198: 560–570.
- 39 **Mohebbi-Fani M., Nzaifi S., Shekarforoush S.S. & Rahimi M. 2006.** Effect of monensin on serum lipoproteins, triglycerides, cholesterol and total lipids of periparturient dairy cows. *Veterinary Research Communications*. 30: 7-17.
- 40 **Pechova A., Llek J. & Halouzka R. 1997.** Diagnosis and control of the development of hepatic lipidosis in dairy cows in the peri-parturient period. *Acta Veterinaria Brno*. 66: 235-243.
- 41 **Pennsylvania State University-Veterinary and Biomedical Sciences. 2017.** Metabolic profiling resource page: reference values. Available at: <<http://extension.psu.edu/animals/health/metabolic-profiling/reference-values>>. [Accessed online in July 2017].

- 42 **Piccione G., Messina V., Marafioti S., Casella S., Giannetto C. & Fazio F. 2012.** Changes of some haematochemical parameters in dairy cows during late gestation, post-partum, lactation and dryperiods. *Veterinarija ir Zootechnika*. 58: 59-64.
- 43 **Rukkwamsuk T., Rungruang S. & Wensing T. 2004.** Fatty liver in high producing dairy cows kept in evaporative cooling system in a commercial dairy herd in Thailand. Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Thailand.
- 44 **Ruoff J., Borchardt S. & Heuwieser W. 2017.** Short communication: Associations between blood glucose concentration, onset of hyperketonemia, and milk production in early lactation dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 100: 5462–5467.
- 45 **SAS Institute Inc. 2004.** SAS/STAT 9.1 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- 46 **Sattler T. & Fürll, M. 2004.** Creatine kinase and aspartate amino transferase in cows as indicators for endometritis. *Journal of Veterinary Medicine A: Physiology, Pathology, Clinical Medicine*. 51:132-137.
- 47 **Seifi H.A., Gorji-Dooz M., Mohri M., Dalir-Naghadeh B. & Farzaneh N. 2007.** Variations of energy-related biochemical metabolites during transition period in dairy cows. *Comparative Clinical Pathology*. 16: 253–258.
- 48 **Starke A., Haudum A., Weijers G., Herzog K., Wohlsein P., Beyerbach M., de Korte C.L., Thijssen J.M. & Rehage J. 2010.** Noninvasive detection of hepatic lipidosis in dairy cows with calibrated ultrasonographic image analysis. *Journal of Dairy Science*. 93: 2952–2965.
- 49 **Starke A., Schmidt S., Haudum A., Scholbach T., Wohlsein P., Beyerbach M. & Rehage. J. 2011.** Evaluation of portal blood flow using transcutaneous and intraoperative Doppler ultrasonography in dairy cows with fatty liver. *Journal of Dairy Science*. 94: 2964–2971.

- 50 **Stojević Z., Piršljin 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*. 75: 67-73.
- 51 **Van Den Top A.M., Wensing T., Geelen M.J., Wentink G.H., Van Klooster A.T. & Beynen A.C. 1995.** Time trends of plasma lipids and enzymes synthesizing hepatic triacylglycerol during postpartum development of fatty liver in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 78: 2208-2220.
- 52 **Weber C., Hametner C., Tuchscherer A., Losand B., Kanitz E., Otten W., Singh S.P., Bruckmaier R.M., Becker F., Kanitz W. & Hammon H.M. 2013.** Variation in fat mobilization during early lactation differently affects feed intake, body condition, and lipid and glucose metabolism in high-yielding dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 96: 165–180.
- 53 **White H.M. 2015.** The role of TCA cycle anaplerosis in ketosis and fatty liver in periparturient dairy cows. *Animals*. 5: 793–802.
- 54 **Zarrin M., Gossen-Rösti L., Bruckmaier R. M. & Gross J. J. 2017.** Elevation of blood β -hydroxybutyrate concentration affects glucose metabolism in dairy cows before and after parturition. *Journal of Dairy Science*. 100: 2323–2333.

4.2.8 FIGURES

Figure 1. Correlation of days in milk (DIM) with: (A) plasma triglycerides (TGp) and (B) aspartate aminotransferase (AST).

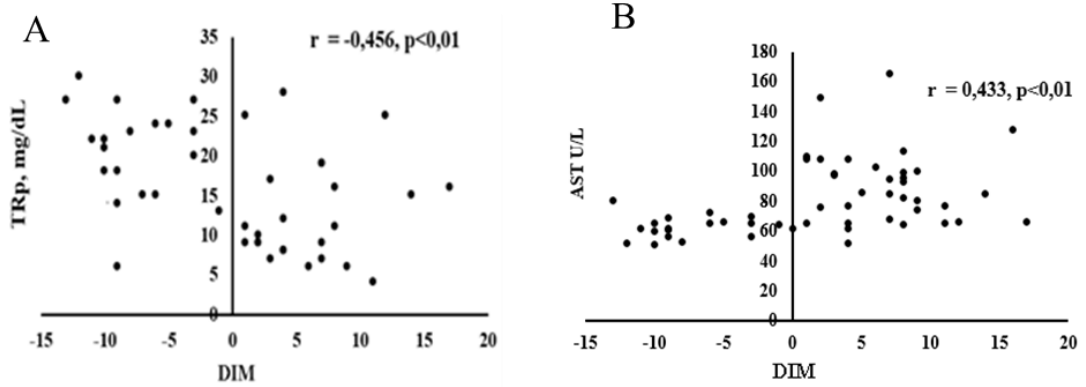


Figure 2. Correlation between: (A) plasma triglycerides (TRp) and liver triglycerides (TG), (B) plasma triglycerides (TRp) and free fatty acids (NEFA) and (C) plasma triglycerides (TRp) and cholesterol (COL).

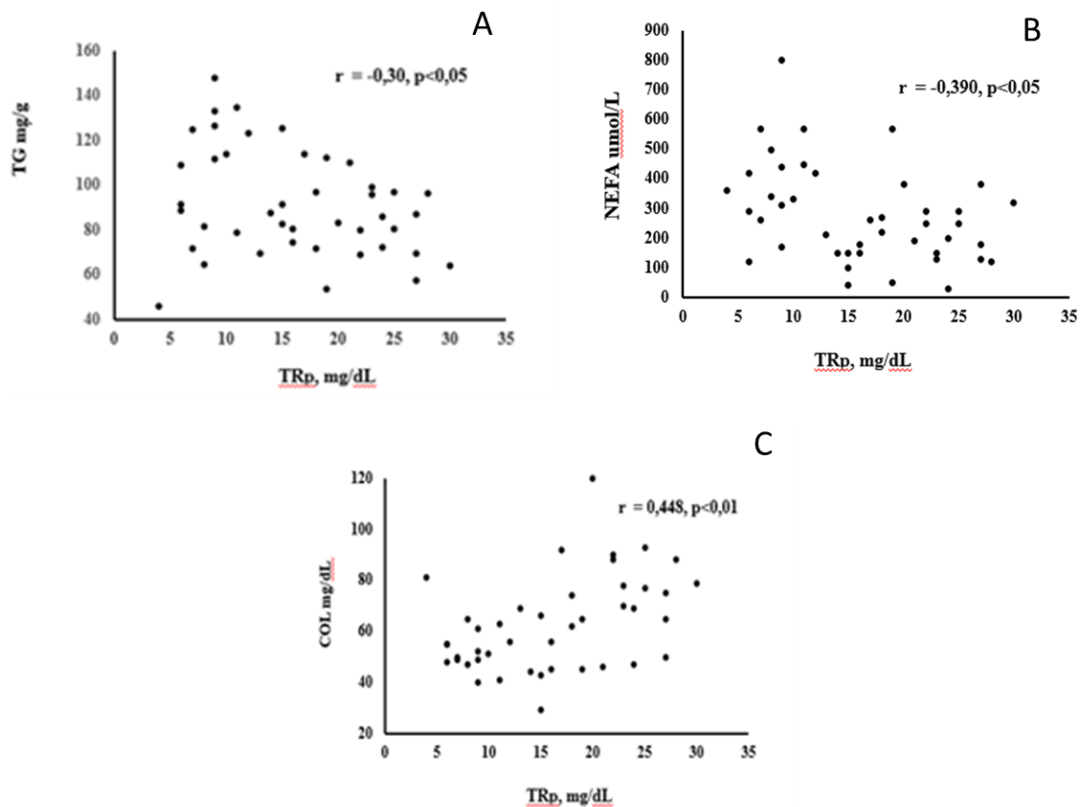
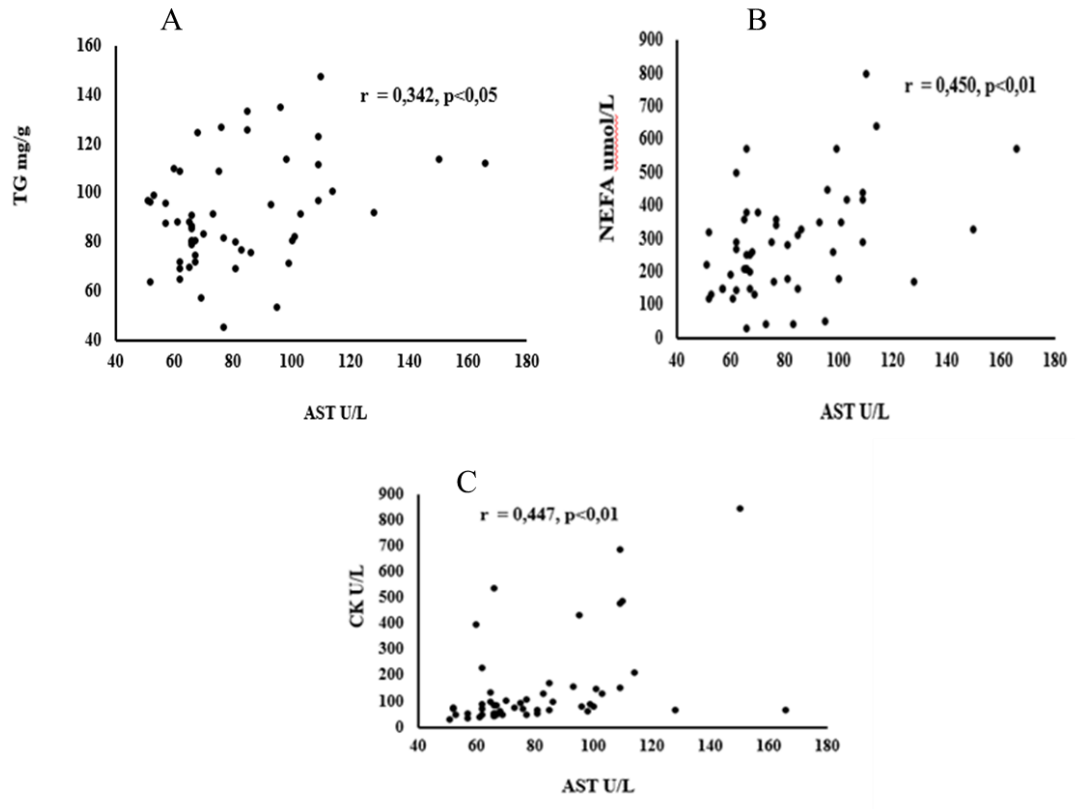


Figure 3. Correlation between: (A) aspartate aminotransferase (AST) and liver triglycerides (TGI), (B) aspartate aminotransferase (AST) and free fatty acids (NEFA), and (C) aspartate aminotransferase (AST) and creatine kinase (CK).



4.2.9 TABLES

TITLES

Table 1. Mean and standard deviation of liver triglyceride levels and plasma biochemical indicator values of prepartum and postpartum cows.

Indicators (units)	Reference	Prepartum	Postpartum
Liver triglycerides (mg/g of tissue)	< 50*	82.2 ^b ± 13.6	96.2 ^a ± 23.8
Plasma triglycerides (mg/dL)	0 - 14*	20.4 ^a ± 6.1	8.8 ^b ± 8.1
Cholesterol (mg/dL)	80 - 120*	66.8 ± 20.6	58.7 ± 15.2
Free fatty acids (µmol/L)	< 500*	197 ^b ± 100	334 ^a ± 1470
Beta-hydroxybutyrate (mmol/L)	<1.4*	0.53 ± 0.15	0.60 ± 0.20
Albumin (g/L)	27 - 35*	33.5 ± 2.1	32.2 ± 3.0
Aspartate aminotransferase (U/L)	< 132*	60 ^b ± 16	90 ^a ± 25
Creatine kinase (U/L)	< 200*	77 ^b ± 82	184 ^a ± 203

*[42]. Means followed by different superscripts letters indicate significant difference at P< 0.05.

Table 2. Mean values and of standard deviation of liver triglycerides and plasma biochemical indicators in cows with lipidoses and without lipidoses hepatic.

Indicators (units)	Reference	Without Lipidosis	With lipidosis
N=		45	9
Liver triglycerides (mg/g of tissue)	< 50*	86.23 ± 39.72	116.56 ± 110.69
Plasma triglycerides (mg/dL)	0 - 14*	13.44 ± 9.61	10.11 ± 4.36
Cholesterol (mg/dL)	80 - 120*	63.06 ± 27.38	53.77 ± 43.69
Free fatty acids (µmol/L)	< 500*	264.88 ± 237.19	350.55 ± 341.28
Beta-hydroxybutyrate (mmol/L)	<1.4*	0.57 ± 0.33	0.63 ± 0.41
Albumin (g/L)	27 - 35*	32.77 ± 4.99	32.22 ± 23.44
Aspartate aminotransferase (U/L)	< 132*	73.95 ^b ± 46.67	106 ^a ± 113.19
Creatine kinase (U/L)	< 200*	122.75 ^b ± 168.37	258.11 ^a ± 89.61

*[42]. Means followed by different superscripts letters indicate significant difference at P< 0.05.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção de leite no Brasil vem passando por uma grande revolução produtiva nos últimos anos, e nesta esteira as técnicas produtivas cada vez mais vêm sendo exigidas para garantir a menor incidência de doenças e a melhor produtividade dos rebanhos, potencializando a lucratividade dos produtores rurais, seja eles pequenos ou grandes.

Para entender melhor como as alterações bioquímicas clínicas se comportam, em especial a lipidose hepática foi desenvolvido este estudo, a fim de dar um enfoque bioquímico clínico que seja aplicável no dia-dia da rotina dos veterinários no trato com as vacas.

A biopsia hepática confirmou-se no presente estudo como a técnica ouro para revelar os casos de lipidose hepática, sendo o método histológico de quantificação dos lipídios no fígado, o mais plausível e confiável para fazer esta mensuração quando comparado ao método químico de extração e quantificação dos lipídios, o qual está sujeito a muitas variações de avaliação. A incidência de lipidose hepática leve atinge as vacas leiteiras alterando o perfil bioquímico de forma discreta, mas quando aplicado o índice de função hepática podemos ver diferenças de funcionalidade hepática mais palpáveis deste grupo em relação as vacas saudáveis.

Independente do perfil bioquímico a que pertenciam as vacas, elas tiveram a tendência de apresentarem o colesterol baixo no pós-parto imediato. Se conseguirmos adequar o ECC das vacas ao parto podemos minimizar as alterações bioquímicas e amenizar a severidade e os efeitos da lipidose hepática e suas consequências diretas e indiretas nos animais. Também podemos afirmar que as novas técnicas automatizadas para avaliar o ECC são boas ferramentas de avaliação, e no futuro poderão ser usadas em larga escala para dar agilidade e praticidade nas avaliações de ECC nas fazendas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHARYA, U. R.; FAUST, O.; MLINARI, F.; SREE, S. V.; JUNNARKAR, S. P.; Ultra-sound based tissue characterization and classification of fatty liver disease: a screening and diagnostic paradigm **Knowl.-Based Syst.** v. 75, p. 66-77. 2015.
- ALVARENGA, E., MOREIRA, G. H. F. A., FACURY, E. J. F., LEME, F. O. P., COELHO, S. G.; Avaliação do perfil metabólico de vacas da raça Holandesa durante o período de transição. **Pesq. Vet. Bras.** v. 35 (3); p. 281-290. 2015.
- AMETAJ, B. N.; A new understanding of the causes of fatty liver in dairy cows. **Advances in Dairy Technology.** v. 17, p. 97-112. 2005.
- AROEIRA, L. J. M.; Cetose e infiltração gordurosa no fígado em vacas leiteiras. Juiz de Fora: **EMBRAPA-CNPGL.** 1998; p. 23. (Documento 51).
- BANZATO, T., GELAIN, M. E., ARESU, L., CENTELLEGHE, C., BENALI, S. L., ZOTTI, A.; Quantitative analysis of ultrasonographic images and cytology in relation to histopathology of canine and feline liver: an ex-vivo study. **Research in Veterinary Science.** v. 103, p. 164-169. 2015.
- BANZATO, T., FIORE, E., MORGANTE, M. A., MANUALI, E., ZOTTI, A.; Texture analysis of B-mode ultrasound images to stage hepatic lipidosisin the dairy cow: A methodological study. **Research in Veterinary Science.** v. 108, p. 71-75. 2016.
- BELL, A. W.; Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. **Journal Animal Science.** v. 73, p. 2804-2819. 1995.
- BERTONI, G., TREVISI, E.; Use of the Liver Activity Index and Other Metabolic Variables in the Assessment of Metabolic Health in Dairy Herds. **Vet. Clin. Food Anim.** v. 29, p. 413-431. 2013.
- FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. The statistic division: dairy cattle in the world. Disponível em: Acesso em: 3 Nov. 2019.
- BOBE, G., YOUNG, J. W., BEITZ, D. C.; Invited Review: Pathology, Etiology, Prevention, and Treatment of Fatty Liver in Dairy Cows. **Journal of Dairy Science.** v. 87; p. 3105-3124. 2004.
- BRAGA, M. M., CASTILHOS, L. M. L., SANTOS, M. N.; Biópsia hepática em bovinos: proposta de nova técnica. **Revista Centro Ciências Rurais.** Santa Maria, v. 15; p. 79-88. 1985.
- BREUKINK, H. J., WENSING, T.; Pathophysiology of the liver in high yielding dairy cows and its consequences for health and production. **Israel Journal of Veterinary Medicine,** v. 52, n. 1, p. 66- 71. 1997.

BRUSS, M. L.; Metabolic fatty liver of ruminants. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**. v. 37, p. 417-449. 1993.

BUTLER, W.R.; Nutrition, negative energy balance and fertility in the postpartum dairy cow. **Cattle Practice**. v.13, p. 13-18. 2005.

CHILLIARD, Y., BONNET, M., DELAVAL, C., FAULCONNIER, Y., LEROUX, C., DJIANE, J., BOCQUIER, F.; Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. **Domestic Animal Endocrinology**. v. 21, p. 271–295. 2001.

CORASSIN, C. H.; Importância das desordens do periparto e seus fatores de risco sobre a produção de leite de vacas Holandesas. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**. v. 32, n. 3, p. 1101-1110. 2011.

DALE, H., VIK-MO, L., FJELLHEIM, P.; A field survey of fat mobilization and liver function of dairy cows during early lactation. Relationship to energy balance, appetite and ketosis. **Nordisk Veterinärmedicin**. v.31; p. 97–105. 1979.

DRACKLEY, J. K., OVERTON, T. R., DOUGLAS, N.G.; Adaptations of glucose and long chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. **Journal of Dairy Science**. v. 84, p. 100–112. 2001.

DRACKLEY, J. K., HEATHER, M. D., DOUGLAS, G. N., GURETZKY, N. A. J., LITHERLAND, N. B., UNDERWOOD, J. P., LOOR, J. J.; Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. **Italian Journal of Animal Science**. v. 4, p. 323-344. 2005.

FERGUSON, J. D., BYERS, D., FERRY, J.; Round table discussion: body condition of lactating cows. **Agric. Practice**. v. 15 (4); p. 17-21. 1994.

FIGLIARO, E., PICCIONE, G., PERILLO, L., BARBEIRO, A., MANUALI, E. D., MORGANTE, M., GIANESELLA, M.; Hepatic lipidosis in high-yielding dairy cows during the transition period: haematochemical and histopathological findings. **Animal Production Science**. v. 57, p 74–80. 2017.

GALLO, L.; CARNIER, P.; CASSANDRO, M.; Change in body condition score of Holstein cows as affected by parity and mature equivalent milk yield. **Journal of Dairy Science**. v.79, n.6, p. 1009-1015. 1996.

GALVÃO, K. N., FLAMINIO, M. J. B. F., BRITTIN, S. B., SPER, R., FRAGA, M., CAIXETA, L., RICCI, A., GUARD, C. L., BUTLER, W. R., GILBERT, R. O.; Association between uterine disease and indicators of neutrophil and systemic energy status in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**. v. 93, n. 7, p. 2926-2937. 2010.

GARNSWORTHY, P.; Manipulação nutricional do balanço energético pós-parto e o impacto sobre a fertilidade; *IN*: Curso Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos; XVII; 2013; Uberlândia. **Anais. Uberlândia; Conapec JR.**; 2013; p 13.

GERSPACH, C.; IMHASLY, S.; KLINGLER, R.; HILBE, M.; HARTNACK, S.; RUETTEN, M.; Variation in fat content between liver lobes and comparison with histopathological scores in dairy cows with fatty liver. **BMC Veterinary Research**. DOI 10.1186/s12917-017-1004-9.2017.

GOFF, J. P., HORST, E R. L. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. **Journal of Dairy Science**.v. 80, p. 1260–1268. 1997.

GONZÁLEZ, F. H. D., BARCELLOS, J. O., PATINÕ, O. H., RIBEIRO, L. A.; **Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais**. Porto Alegre, 2000. p. 106.

GONZÁLEZ F. H. D.; SILVA S. C.; **Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária**. 3ª ed.; Porto Alegre; Editora da UFRGS; p. 538. 2017.

GRUMMER, R. R.; Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow.**Journal Animal Science**. v. 73, p. 2820-2833. 1995.

HAMMON, D. S., EVJEN, I. M., DHIMAN, T. R., GOFF, J. P.,WALTERS, J. L.; Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders.**Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 113, p. 21–29. 2006.

HAYIRLI, A. R., GRUMMER, R.R., NORDHEIM, E.V., CRUMP, P.M.; Animal and dietary factors affecting feed intake during the prefresh transition period in Holsteins.**Journal of Dairy Science**. v. 85, p. 3430–3443. 2002.

HERDT, T. H.; Ruminant adaptation to negative energy balance.Influences on the etiology of ketosis and fatty liver.**Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice**. v. 16, p. 215–230. 2000.

HILL, R. A.; The role of the leptin axis in modulating energy partitioning and nutrient utilisation in livestock species; **In: Recent Advances in Animal Nutrition ;Nottingham. proceedings**. Nottingham; P.C.; p. 149-184. 2004.

HOCQUETTE, J. F., BAUCHART, D.; Intestinal absorption, blood transport and hepatic and muscle metabolism of fatty acids in preruminant and ruminant animals. **Reproduction Nutritional Development**. v. 39, p. 27-48. 1999.

HOLTENIUS, K., AGENAS, S., DELAVAUD, C., CHILLIARD, Y.; Effects of feeding intensity during the dry period, metabolic and hormonal responses.**Journal of Dairy Science**. v. 86, p. 883–891. 2003.

IBGE.Pesquisa da pecuária municipal e censoagropecuário. Rio de Janeiro: Sidra,2016. Disponível em:<<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/ listabl.asp?z=p&o=29>>. Acesso em: 1 jan. 2018.

JORRITSMA, R., JORRITSMA H., SCHUKKEN, Y. H., WENTINK, G. H.; Relationships between fatty liver and fertility and some periparturient diseases in commercial Dutch dairy herds. **Theriogenology**. v. 54, p. 1065–1074. 2000.

JORRITSMA, R., JORRITSMA, H., SCHUKKEN, Y. H., BARTLETT, P. C., WENSING, T., WENTINK, G. H.; Prevalence and indicators of post partum fatty infiltration of the liver in nine commercial dairy herds in the Netherlands. **Livestock Production Science**. v. 68, p. 53–60. 2001.

KHALPHALLAH, A., AAMMER, A. A., ABDELALL, T., ELMELGIY, E., OIKAWA, S., NAKADA, K.; Changes in clinical and blood lipid metabolism parameters in Holstein dairy cattle during the transition period. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**. v. 10, p. 1311-1477. 2017.

MACLACHLAN, N. J., CULLEN, J. M.; Fígado, Sistema Biliar e Pâncreas Exócrino. In: CARLTON, W. W., MCGAVIN, M. D.; **Patologia Veterinária Especial de Thonson**. 2 ed., Porto Alegre: ARTMED. p. 434. 1998.

MCART, J. A., NYDAM, D. V., AND OETZEL, G. R.; Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle. **Journal of Dairy Science**. v. 95, p. 5056–5066. 2012.

MCART, J. A., NYDAM, D. V., OETZEL, G. R., OVERTON, T. R., OSPINA, P. A.; Elevated non-esterified fatty acids and β -hydroxybutyrate and their association with transition dairy cow performance. **The Veterinary Journal**. v. 198, p. 560–570. 2013.

MCMANARA, J. P.; Regulation of adipose tissue metabolism in support of lactation. **Journal of Dairy Science**. v. 74, p. 706–719. 1991.

MEPHAM, T. B.; The development of ideas on the role of glucose in regulating milk secretion. **Australian Journal of Agricultural Research**. v. 44, p. 509–522. 1993.

MISRA, A., GANDA, O. P.; Migraç o and its impact on adiposity and type 2 diabetes. **Nutrition**. v. 23, p. 696–708. 2007.

MOTA, M. F., PINTO-NETO, A., SANTOS, G. T., FONSECA, J. F., CIFFONI, E. M. G.; Período de transição na vaca leiteira. **Arq. ci n. vet. zool. UNIPAR, Umuarama**, v. 9, n. 1, p. 77-81. 2006.

NRC. Exig ncias nutricionais do gado leiteiro. 7 rev. **Natl. Acad. Sci.**; Washington, DC; 2001.

OETZEL, G. R. Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**. v. 20, p. 651-674. 2004.

OSPINA, P. A., NYDAM, D. V., STOKOL, T., OVERTON, T. R.; Evaluation of Nonesterified Fatty Acids and β -hydroxybutyrate in Transition Dairy Cattle in the Northeastern United States: Critical Thresholds for Prediction of Clinical Diseases. **Journal of Dairy Science**. v. 93, n. 2, p. 546-549. 2010.

PALMQUIST, D. L., DAVIS, C. L., BROWN, R. E., SACHAN, D. S.; Availability and metabolism of various substrates in ruminants. V. Entry rate into the body incorporation into milk fat of β -hydroxybutyrate. **Journal of Dairy Science**. v. 52, p. 633–638. 1969.

PALMQUIST, D. L., BEAULIEU, A. D., BARBANO, D. M.; Adsa foundation symposium: milk fat synthesis and modification. **Journal of Dairy Science**. v. 76, p. 1753-1771. 1993.

PRYCE, J. E., ROYAL, M. D., GARNSWORTHY, P. C., MAO, I. L.; Fertility in the high producing dairy cow. **Livestock Production Science**. v. 86, p. 125-135. 2004.

ROSSI, C. A. R., FILAPPI, A. R., PRESTES, D. S., NORO, M., ROSSATO, F. G., LISTON, M. A., ABREU, C., COSTA, S. T., CECIM, M.; Insuficiência funcional e lipídose hepática em ovinos: protocolo para indução experimental. **Revista da FZVA – Uruguiana**. v. 12, n.1, p. 123-134. 2005.

RUKKWAMSUK, T., WENSING, T., GEELLEN, M. J. H. Effect of overfeeding during the dry period on regulation of adipose tissue metabolism in dairy cows during the periparturient period. **Journal of Dairy Science**. v. 81, p. 2904–2911. 1998.

RUKKWAMSUK, T., WENSING, T., GEELLEN, M. J. Effect of fatty liver on hepatic gluconeogenesis in periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 82, p. 500–505. 1999.

SANTOS, J. E. P.; Distúrbios metabólicos. *In*: BERCHIELLI, T. T., PIRES, V. A., OLIVEIRA, G. S.; **Nutrição de Ruminantes**. 2ª ed.; Jaboticabal. Funesp; 2011; cap. 15; p. 439-513.

SCHILD A.L.; Cetose. *In*: RIET-CORREA F., SCHILD A. L., LEMOS R. A. A. & BORGES J. R. J.; **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. 2ª ed.; Santa Maria. Pallotti; 2007. p. 281-286.

SHORT, R. D., ADAMS, D. C.; Nutritional and hormonal interrelations in beef cattle reproduction. **Can. J. Anim. Sci.**; v. 68, p. 29. 1988.

SILVA, L. B., GONÇALVES, P. Degeneração Gordurosa (Lipídose Hepática). **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. Ano VI, n.10. 2008.

SMITH, B. I.; RISCO, C. A.; Management of periparturient disorders in dairy cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. v. 21, p. 503-521. 2005.

STOCKDALE, C. R.; Body condition at calving and the performance of dairy cows in early lactation under Australian conditions: A review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**. v. 41, p. 823–839. 2001.

THARWAT, M.; Ultrasonography as a diagnostic and prognostic approach in cattle and buffaloes with fatty infiltration of the liver. **Pol. J. Vet. Sci.** v.15, p. 83-93. 2012.

TREACHER, R. J., REID, I. M., ROBERTS, C. J.; Effect of body condition at calving on the health and performance of dairy cows. **Animal Production**. v. 43, p. 1–6. 1986.

VAN DEN TOP, A. M., WENSING, T., GEELLEN, M. J. H., WENTINK, G. H., VANT, K., A. T., BEVNEN, A. C.; Time trends of plasma lipids and enzymes

synthesizing hepatic triacylglycerol during postpartum development of fatty liver in dairy cows. **Journal of Dairy Science**.v. 78, p. 2208-2220. 1995.

VEIGA, J. E.; O Brasil ainda não encontrou seu eixo de desenvolvimento. **Estudos avançados**. v.15, p.101-119. 2001.

VERNON, R. G., DENIS, R G. P., SORENSEN, A.; Signals of adiposity; **Domestic Animal Endocrinology**. v. 21; p. 197–214. 2001.

VILELA, D.; RESENDE, J. C. de. Cenário para a produção de leite no Brasil na próxima década. In: SIMPÓSIO SOBRE SUSTENTABILIDADE DA PECUÁRIA LEITERIA NA REGIÃO SUL DO BRASIL, 6. SEMINÁRIO DOS CENTROS MESORREGIONAIS DE EXCELÊNCIA EM TECNOLOGIA DO LEITE, 2., 2014, Maringá. Anais... Maringá: UEM, 2014.

WITTEWER, F.; Diagnóstico dos desequilíbrios metabólicos de energia em rebanhos bovinos. In: Gonzalez, F. H. D., BARCELOS, J. O. O, OSPINA, H.; **Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais**. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p. 9-22. 2000.