

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**INDICADORES DE BALANÇO ENERGÉTICO NEGATIVO
EM VACAS LEITEIRAS NO INÍCIO DE LACTAÇÃO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Alsiane Simone Capelesso

Santa Maria, RS, Brasil

2015

INDICADORES DE BALANÇO ENERGÉTICO NEGATIVO EM VACAS LEITEIRAS NO INÍCIO DE LACTAÇÃO

Alsiane Simone Capelesso

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal/Nutrição de Ruminantes, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Zootecnia**.

Orientador: Dr. Gilberto Vilmar Kozloski

Coorientador (a): Dr. Maria Cecilia Cajarville

Santa Maria, RS, Brasil

2015

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Capelesso, Alsiane Simone
INDICADORES DE BALANÇO ENERGÉTICO NEGATIVO EM VACAS
LEITEIRAS NO INÍCIO DE LACTAÇÃO / Alsiane Simone
Capelesso.-2015.
56 p.; 30cm

Orientador: Gilberto Vilmar Kozloski
Coorientadora: Maria Cecília Cajarville
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia, RS, 2015

1. corpos cetônicos 2. mensurações corporais 3.
metabólicos sanguíneos 4. primíparas 5. uma ordenha diária
I. Kozloski, Gilberto Vilmar II. Cajarville, Maria
Cecília III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**


**A comissão examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado**

**INDICADORES DE BALANÇO ENERGÉTICO NEGATIVO EM
VACAS LEITEIRAS NO INÍCIO DE LACTAÇÃO**

Elaborada por
Alsiane Simone Capelesso

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia

COMISSÃO EXAMINADORA:


Fernando Luiz Ferreira De Quadros (UFSM)
(Presidente de Banca)


Dimas Estrasulas de Oliveira, Dr. (UDESC)


Julio Viégas, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 26 de Fevereiro de 2015.

Aos meus pais, pela formação moral, exemplo de vida e
aos irmãos Luís, Fabi e Nena pelo apoio incondicional,
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Família...

Aos Amigos...

Aos momentos...

Ao Professor Gilberto Kozloski, pelo exemplo de caráter e confiança.

A Cecília Cajarville, José Luis Repeto, Alejandro Mendoza e Marcelo Pla pela oportunidade, amizade, experiência e ensinamentos.

Aos integrantes dos departamentos de Bovinos e Nutrición Animal da UdelaR e Labrumen da UFSM.

A INIA.

A CAPES.

Aos amigos que estiveram do meu lado; Martin, Gabi, Erne, Elsa, Enrique, Nico, Andrea, Lobo e Tomi.

Agradecer as pessoas que a vida me oportunizou em conhecer, em especial Solana, uma irmã; Carlitos, um irmão; A los Sebas, por mostrar sempre o lado bom da vida; a Analía, por estar do meu lado e a Emi... Por tudo.

Enfim.... A todos deixo meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade Federal de Santa Maria

INDICADORES DE BALANÇO ENERGÉTICO NEGATIVO EM VACAS LEITEIRAS NO INÍCIO DE LACTAÇÃO

AUTORA: ALSIANE SIMONE CAPELESSO

ORIENTADOR: GILBERTO VILMAR KOZLOSKI

COORIENTADOR (a): MARIA CECÍLIA CAJARVILLE

Local e data de defesa: Santa Maria, 26 de Fevereiro de 2015.

Período inicial da lactação em vacas leiteiras envolve várias modulações a nível metabólico, sendo mobilização de reservas corporais característico neste momento. Portanto, o objetivo com este trabalho é estudar indicadores de balanço energético negativo em vacas leiteiras em período inicial de lactação, mantidas sob dois níveis de balanço energético. Para isso, 20 vacas foram arranjadas em um delineamento blocos ao acaso, sendo aplicados dois tratamentos: T1 – uma ordenha diária durante oito semanas iniciais de lactação; T2 – duas ordenhas diárias durante oito semanas iniciais de lactação. Nos animais foi determinado peso vivo, escore de condição corporal, espessura de gordura subcutânea; sendo ainda coletadas amostras de sangue, para análise de ácidos graxos não esterificados, ureia, glicose, acetoacetato e *Dβ*-Hidroxiacetato. Técnica de diluição de ureia também foi realizada. Consumo de matéria seca não diferiu entre os grupos. Produção de leite e kilogramas de sólidos foram menores para T1. Pelas análises das diferenças T1 apresentou melhor balanço energético em período de tratamento ($P = 0,0002$), invertendo a relação para o período residual ($P = 0,0423$). Para as características corporais, proteína corporal diferiu no período residual sendo maior para T1 ($P = 0,0463$), já das mensurações sanguíneas, ácidos graxos não esterificados ($P = 0,0352$) e *Dβ*-Hidroxiacetato ($P = 0,0004$) foram menores no período de tratamento em T1. *Dβ*-Hidroxiacetato não apresentou relação com balanço energético, assim mais estudos deverão ser realizados.

Palavras Chave: Corpos cetônicos. Mensurações corporais. Metabólicos sanguíneos. Primíparas. Uma ordenha diária.

ABSTRACT

Master Degree Dissertation
Post-Graduate Program in Animal Science
Federal University of Santa Maria

NEGATIVE ENERGY BALANCE INDEXES IN DAIRY COWS IN THE BEGINNING OF LACTATION

AUTHOR: ALSIANE SIMONE CAPELESSO

ADVISOR: GILBERTO VILMAR KOZLOSKI

COADVISOR (a): MARIA CECÍLIA CAJARVILLE

Place and date of evaluation: Santa Maria, 26th of February of 2015.

Early lactation in dairy cows involves metabolic changes, being mobilization of corporal reserves very common. So the objective of this work is to study indexes of negative energetic balance in dairy cows on early lactation, in two different energy levels. For this, 20 cows were distributed in a randomized complete block design, resulting in 2 treatments: T1 one milking per day for 8 weeks on the beginning of lactation and T2 two milkings for the same period of time. In animals, it was measured live weight, body condition scoring, skinfold thickness, being also collected blood samples for non-esterified fatty acids, urea, glucose, acetoacetate and *Dβ*-Hydroxybutirate analyses. It was also realized urea dilution measurements. As a result dry matter intake wasn't different between treatments, milk production and milk solids in kg were lower for T1. For differences analyses T1 resulted in a better energy balance for the treatment period ($P = 0.0002$), obtaining the opposite result for residual period ($P = 0.0423$). Talking about corporal characteristics, corporal protein was statistically different between the treatments only for residual period, being higher for T1 ($P = 0.0463$), meanwhile in blood measures, non-esterified fatty acids ($P = 0.0352$) and *Dβ*-Hydroxybutirate ($P = 0.0004$), were lower for T1, for treatment period. *Dβ*-Hydroxybutirate didn't show relation with energy balance, so more studies must be done.

Key words: Once-daily milking. Corporal measurements. Ketonic bodys. Metabolites in blood. Primiparous.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3-MH, 3-metilhistidina
ACAC, acetoacetato
ACT, acetona
AG, ácidos graxos
ATP, adenosina tri-fosfato
BE / BEN, balanço energético / balanço energético negativo
BPM, balanço de proteína metabolizável
CC, corpos cetônicos
CMS, consumo de matéria seca
CV, coeficiente de variação
DP, desvio padrão
Dβ-HB, *Dβ*-Hidroxitirato
ECC, escore de condição corporal
EGS, espessura de gordura subcutânea
FADH, flavina adenina dinucleótido
GC, gordura corporal
Gli, glicose
LCG 4%, produção de leite em litros corrigida para 4% de gordura
NAD⁺, nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
NADH, nicotinamida adenina dinucleótido reduzido
NEFAs, ácidos graxos não esterificados
NH₄, amônio
PC, proteína corporal
PL/L, produção de leite em litros por dia
PMR, ração parcialmente misturada
PV, peso vivo
RNA_m, ácido ribonucleico mensageiro
T1, uma ordenha diária (AM)
T2, duas ordenhas diárias (AM/PM)
TMR, ração totalmente misturada
VLDL, lipoproteínas de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 HIPÓTESE CIENTÍFICA.....	12
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
4 OBJETIVOS	18
4.1 Objetivos Específicos.....	18
5 MATERIAL E MÉTODOS	19
5.1 Animais, Desenho Experimental e Tratamentos	19
5.2 Dados e Amostras, Coletas e Análises.....	20
5.3 Cálculos e Estimativas.....	23
5.3.1 Consumo aparente de pasto	23
5.3.2 Balanço energético e Balanço Proteico	23
5.3.3 Composição corporal.....	25
5.4 Análises Estatística	26
6 RESULTADOS	28
6.1 Consumo, produção e composição de leite	28
6.2 Balanço energético e balanço de proteína metabolizável.....	33
6.3 Mensurações corporais.....	36
6.4 Mensurações sanguíneas	40
6.4 Correlações.....	44
7 DISCUSSÃO	46
7.1 Efeito do número de ordenhas diárias no período inicial de lactação	46
7.2 Estudo da relação da mobilização de reservas corporais e metabólitos sanguíneos com efeito tratamento.....	49
8 CONCLUSÕES.....	51
9 AJUSTES PARA TRABALHOS FUTUROS	52
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1 INTRODUÇÃO

Em condição de balanço energético negativo (BEN) acontece mobilização de reservas corporais, acompanhado e/ou em decorrência da alteração na concentração de alguns metabólitos a nível sanguíneo. Das reservas energéticas corporais, tecido adiposo é o principal componente e para este em rotas catabólicas, aumentos da concentração sanguínea de ácidos graxos não esterificados (NEFAs) são evidentes.

NEFAs sanguíneos podem seguir distintas vias no organismo. NEFAs podem ser captados e oxidados como fonte de energia por tecidos extra-hepáticos; podem ser captados pelo fígado onde são completamente oxidados a CO_2 e/ou parcialmente oxidados a corpos cetônicos (CC) ou podem ser reesterificados na forma de triglicerídeos e estocados e/ou transportados para tecidos extra-hepáticos na forma de VLDL. Mais especificamente da oxidação parcial de NEFAs a CC, a concentração de *Dβ*-Hidroxiacetato (*Dβ*-HB) vem sendo usado como indicador de BEN e/ou cetose. Contudo *Dβ*-HB, pode ser oriundo de outras vias no organismo animal *e.g.*, butirato ruminal, bem como pode não ser o CC predominante em animais em BEN.

Assim, ao se estudar *Dβ*-HB como único indicador de BEN em vacas leiteiras, resultados incoerentes podem ser descritos. Desta forma, visando contribuir para melhor descrição e entendimento do status energético nestes animais, através deste trabalho se objetiva estudar simultaneamente características de mobilização corporal e de alterações metabólicas como preditores de BEN em vacas no período inicial de lactação.

2 HIPÓTESE CIENTÍFICA

Vacas primíparas, mantidas em uma ordenha diária em período inicial de lactação apresentarão melhor status energético e metabólico que animais mantidos em duas ordenhas diárias, mantidas em igual regime alimentar.

O estudo de indicadores de mobilização corporal e/ou de alterações metabólicas serão melhores preditores de balanço energético em vacas no período inicial de lactação, que a avaliação única da concentração sanguínea de *Dβ*-Hidroxiacetato.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Período periparto em vacas leiteiras, de acordo com Drackley (1999) compreende três semanas antes e três semanas depois do parto. Geralmente nesta fase e em todo período inicial de lactação, estes animais têm a capacidade de ingestão de matéria seca diminuída, com aumento das exigências para produção de leite, o que frequentemente leva ao BEN; sendo este fator pré-requisito para o aparecimento de desordens metabólicas. Animais em BEN apresentam o metabolismo alterado e especificado tanto para vias catabólicas como anabólicas. Pelo catabolismo, ocorre hidrólise de triglicérides do tecido adiposo e de proteínas do tecido esquelético, resultando respectivamente na liberação de ácidos graxos não esterificados (NEFAs) e aminoácidos livres. Tal mobilização ocorre a fim de aportar energia, que será degradada e/ou convertida a outro metabólito (em vias anabólicas) a fim de contornar a falta de nutrientes exigida neste momento pelo animal. Seguindo a via anabólica gliconeogênese se torna de grande importância nesta fase, pois a demanda de glicose pelo ruminante é aumentada, para a síntese da lactose do leite (NORO & WITTEWER, 2012).

Havendo hidrólise e mobilização, conseqüentemente há perda de reservas corporais que pode ser avaliada pela concentração de alguns metabólitos sanguíneos, bem como pode ser mensurada por variações corporais, como perda de peso e escore de condição corporal. Neste sentido, Schröder & Staufienbiel (2006) descreveram que um único indicador destes pode não mostrar a real situação metabólica do animal, pois avaliações sanguíneas descrevem um status momentâneo; em contraste, características corporais podem não refletir o momento atual, por serem influenciadas em longo prazo. Portanto o uso combinatório de variáveis corporais e metabólicas indicativas de mobilização descrevem mais detalhadamente a condição metabólica do animal.

Das características corporais, Schröder & Staufienbiel (2006) descrevem várias formas de avaliar e estimar reservas de energia corporal em vacas leiteiras. Para os autores, o uso da calorimetria é o melhor *standard* para se determinar metabolismo energético, contudo pouco viável. Assim, características de peso vivo (PV), escore de condição corporal (ECC) e espessura de gordura subcutânea (EGS) vêm sendo usadas amplamente.

Alterações em PV no animal podem refletir em mudanças nas quantidades de proteína e gordura corporal, contudo, o uso desta variável como indicador carrega inúmeras

desvantagens. Schröder & Staufenbiel (2006) reportaram que a variação de energia contida por quilograma (kg) de peso vivo é altamente variável. Além de toda a variação por conteúdo gastrointestinal e presença do feto, líquidos e placenta, vacas leiteiras em início de lactação ao perderem reservas corporais, substituem parcialmente o tecido mobilizado por água, assim a quantidade de tecido mobilizado pode ser maior que a diferença em PV. Diferenças entre raças também são citadas em relação à quantidade de reservas corporais por PV. ECC é uma estimativa subjetiva de reservas de energia no tecido adiposo. Esta, por ser uma medida subjetiva pode carrear erros, principalmente por avaliadores destreinados; e mesmo para avaliadores experientes mudanças de 0,25 pontos entre duas medidas consecutivas não são observadas em 40% dos casos (SCHRÖDER & STAUFENBIEL, 2006).

EGS em vacas leiteiras é determinada principalmente pela distância em milímetros (mm), na maioria das vezes medida por ecografia, entre a pele e a *fascia trunci profunda*, localizada acima dos músculos *glúteo médio* e *longíssimos dorsi*, correspondendo à região sacral. Schröder & Staufenbiel (2006) descreveram a medição da gordura subcutânea como o método mais sensível ao detectar variações em reservas corporais. Contudo nesta avaliação, posição e ângulo de inserção da *probe* podem contribuir para erros, tendo em vista que EGS não é homogênea. Reservas corporais podem ser estimadas ainda pela análise da água corporal total. O princípio do método se baseia na diluição de algum componente (óxido de deutério, água tritiada ou ureia) na água corporal. Neste método, o conteúdo de água corporal estimado é usado para prever proteína e gordura corporal e assim a quantidade de energia corporal (AGNEW *et al.*, 2005). Contudo, diversos fatores como gestação e alimentação podem influenciar nos resultados, podendo superestimar os valores obtidos.

Da avaliação de metabólitos sanguíneos, NEFAs e CC, principalmente $D\beta$ -HB vêm sendo utilizados como indicadores de lipólise e/ou BEN e ureia e 3-metilhistidina (3-MH) como indicadores da proteólise muscular (ELIA *et al.*, 1981; HOUWELING *et al.*, 2012). NEFAs são metabólitos oriundos do processo catabólico de lipólise, que consiste na separação dos triglicerídeos e clivagem das ligações éster, descrito por Nelson & Cox (2011) & Schweiger *et al.* (2006), sendo que a taxa e a quantidade de gordura mobilizada dependem de fatores como concentração energética da dieta, taxa de lipólise e lipogênese no adipócito, condição corporal no momento do parto, produção leiteira e estado de lactação da vaca (NELSON & COX, 2011; KOMARAGIRI *et al.*, 1998; GALLO *et al.*, 1996; GOLAZO *et al.*; 2009; HORAN *et al.*, 2005; LARSEN & KRISTENSEN, 2013).

NEFAs circulantes provenientes da lipólise podem ser metabolizados por três vias principais: Estes são oxidados na β -oxidação pelo fígado e ciclo de Krebs; podem ser reesterificados na forma de triglicerídeos no citosol da célula hepática, empacotados por lipoproteínas e exportados pelo fígado na forma de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), ou quando excedem a capacidade oxidativa pelo ciclo de Krebs, a oxidação é desviada à formação de CC. Pode ocorrer ainda o acúmulo de gordura no hepatócito na forma de triglicerídeos, sendo que este reflete o equilíbrio entre o fluxo de NEFAs, a oxidação de ácidos graxos e lipogênese e a exportação de VLDLs (BEEVER, 2006). Berchielli *et al.* (2011) complementaram que tecido hepático de ruminantes tem baixa capacidade de exportar triglicerídeos na forma de VLDL, assim ácidos graxos (AG) acabam sendo reesterificados e depositados na forma de triglicerídeos no fígado até que sejam eliminados via oxidação completa, cetogênese ou exportados. Lipídeos podem ainda ser captados e utilizados pela glândula mamária, porém desta NEFAs perfazem uma pequena porção. Xu *et al.* (2008) citaram que maiores concentrações de NEFA diminuem formação das VLDL, aumentam lipogênese e cetogênese no hepatócito, e este último está relacionado com diminuição da gliconeogênese, o que é contraditório aos resultados de Loor *et al.* (2007), que descreveram aumentos da via glicolítica, sob esta condição. Li *et al.* (2012) verificaram que aumentos na concentração de NEFAs inibem a oxidação do piruvato a nível muscular (possivelmente pelo fator *Km*), bem como pode alterar a expressão hepática das enzimas piruvato carboxilase e fosfoenolpiruvato carboxilase, alterando gliconeogênese. Berchielli *et al.* (2011) apresentaram que vacas sob BEN houve primeiramente um aumento da expressão genica da enzima piruvato carboxilase e posterior aumento da expressão genica da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase, o que implicaria em favorecimento da glicogênese.

Seguindo mais detalhadamente com a rota catabólica lipídica, AG com cadeias maiores de 12C de tamanho, incluindo NEFAs são carregados para o interior da mitocôndria de células, sendo estes destinados para β -oxidação em nível de matriz mitocondrial gerando acetil-CoA e equivalentes redutores NADH/FADH. Neste contexto, acetil-CoA é oxidado no ciclo de Krebs, e NADH/FADH são oxidados em nível da cadeia transportadora de elétrons, gerando ao final do processo adenosina tri-fosfato (ATP). Nesta etapa, carnitina palmitato tranferase I (CPT I) age como modulador e regulador no transporte de AG para o interior da mitocôndria, sendo um passo limitante da β -oxidação (AIELLO *et al.*, 1983; NELSON & COX, 2011).

Já para ácidos graxos de cadeia muito longa que são citados por Connor *et al.* (1996) como preferencialmente mobilizados, bem como de AG insaturados e de cadeia ramificada, a β -oxidação peroxissomal é primariamente requerida. De acordo com Piot *et al.* (1998), a β -oxidação peroxissomal pode representar aproximadamente 50% da capacidade total da β -oxidação em fígado de vacas leiteiras. De forma complementar, Nelson & Cox (2011) descreveram aumentos da síntese de enzimas da β -oxidação peroxissomal em decorrência de maior concentração lipídica no sangue, incluindo NEFAs. Nesta via, os produtos formados, (principalmente acetil-CoA) são exportados para a mitocôndria, donde podem seguir as distintas rotas descritas. É descrito por Yang *et al.* (2013) que deficiência na β -oxidação peroxissomal está envolvido com o acúmulo ácidos graxos de cadeia longa na célula e desta forma relacionando-se com lipidose hepática.

Hegardt (1999) descreveu que a formação de CC, Acetoacetato (ACAC); $D\beta$ -HB e Acetona (ACT) os quais se dão a nível hepático, resultam da incapacidade do ciclo de Krebs em metabolizar por completo a acetil-CoA, proveniente da β -oxidação, sendo o acetil-CoA convertido em um dos CC por quatro reações sendo a enzima β -Hidroxi- β -metilglutaril-CoA sintase mitocondrial descrita como segundo ponto chave na regulação cetogênica.

Para a formação de CC, inicialmente ocorre à condensação enzimática de duas moléculas de acetil-CoA catalisada pela tiolase, sendo simplesmente o inverso do último passo da β -oxidação. A acetoacetil-CoA formada condensa com outro acetil-CoA formando HMG-CoA pela HMG-CoA sintase e é convertido em ACAC pela ação da HMG-CoA liase. ACAC pode ainda ser convertido em $D\beta$ -HB pela ação da β -Hidroxi- β -metilglutaril-CoA desidrogenase, havendo a dependência da oxidação de um NADH. Já ACT é formada tanto por oxidação não enzimática e/ou pela descarboxilação por ação enzimática da acetato descarboxilase (NELSON & COX, 2011; HEGARDT, 1999). Ressalta-se que HMG-CoA sintase também está localizada no citosol da célula, contudo o destino do HMG-CoA neste compartimento é o mevalonato. Nelson & Cox (2011) destacaram ainda que a produção e exportação de CC permite a oxidação continuada dos ácidos graxos, quando intermediários do ciclo de Krebs, estão sendo drenados para a gliconeogênese. Além disso, o fígado contém quantidade limitada de Coenzima A (CoA) e quando a maior parte desta está presa em acetil-CoA, a β -oxidação fica mais lenta. Assim a produção de CC, permite a oxidação continuada de NEFAs.

Sobre todo este contexto catabólico, a concentração sanguínea de $D\beta$ -HB, devido às maiores concentrações e à grande estabilidade nos fluídos, principalmente soro sanguíneo, vem sendo utilizado como indicador cetogênico (VAN DER DRIFT *et al.*, 2012) e

indiretamente de BEN (SCHRÖDER & STAUFENBIEL, 2006). Van Der Drift *et al.* (2012) descreveram que $D\beta$ -HB em concentrações maiores ou iguais a 1,2 $\mu\text{mol/L}$ já é um indicativo de cetose em vacas leiteiras. Porém, três motivos fazem supor que $D\beta$ -HB não seja um preciso indicador de estado cetogênico de vacas em BEN: 1) $D\beta$ -HB, também é formado em grande quantidade na parede do rúmen assim, momento de amostragem e tipo de alimentação são fatores que influenciarão nos resultados (KOZLOSKI, 2011); 2) como a formação do $D\beta$ -HB no hepatócito é NADH dependente seria provável que este corpo cetônico tivesse sua formação modulada dependendo da relação NAD^+/NADH para ACAC; 3) todo marcador de via dupla é descrito como mal marcador, como o caso do $D\beta$ -HB.

Referente ao catabolismo proteico do animal, a concentração de ureia e/ou 3-metilhistidina (3-MH) sanguínea vem sendo usada como indicador da proteólise muscular. A alteração na concentração da ureia sanguínea é influenciada de dois pontos principais, pela ureogênese ou pelo catabolismo de aminoácidos. Ureogênese é a rota em que hepatócitos convertem o NH_4^+ que chega ao fígado em ureia. Noro & Wittwer, (2012) descreveram relação negativa entre ureagenese e gliconeogênese, tal fato é explicado em parte pela particularidade do fígado quanto ao metabolismo do NH_4^+ e pelas rotas estarem conectadas pelo “Biciclo de Krebs” por meio dos metabólitos como oxaloacetato e aspartato (NELSON & COX, 2011). Ureia pode ser oriunda da degradação de aminoácidos tanto dietéticos como de mobilização, porém para identificar estes fatores a análise isolada da concentração de ureia no sangue não é capaz de responder tais questões. Desta forma, atualmente 3-MH vem sendo estudada como indicador de proteólise muscular (VAN DER DRIFT *et al.*, 2012). A 3-MH é formada da metilação oriunda do rompimento das proteínas miofibrilares (actina e miosina) sendo que este não é utilizado pelo organismo (ELIA *et al.*, 1981). Aminoácidos oriundos desta catálise proteica, podem ser desaminados a nível de hepatócito e a porção carbonada de aminoácidos glicogênicos serem destinadas à vias gliconeogênicas (NELSON & COX, 2011) bem como podem ser captados pelo organismo para a síntese proteica, *e.g.* glândula mamária. Assim a análise deste metabólito nos descreve de forma mais concisa a mobilização de aminoácidos do tecido muscular

Assim, devido à complexidade metabólica em vacas em BEN, o estudo de características corporais e/ou metabólicas em vacas leiteiras no início de lactação como indicativo de mobilização de tecidos, vem a contribuir ao conhecimento das alterações catabólicas nestes animais.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivos Específicos

- a) Avaliar se a diminuição do número de ordenhas diárias durante a primeira etapa de lactação reduz a mobilização de reservas corporais.
- b) Avaliar a concentração sanguínea de metabólitos em vacas no início de lactação mantidas em uma ou duas ordenhas diárias.
- c) Relacionar característica de mobilização de reservas corporais EGS, PV, ECC, PC, GC e metabólitos sanguíneos Gli, Ureia, NEFAs, D β -HB com dados de balanço energético.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais, Desenho Experimental e Tratamentos

Ensaio experimental foi conduzido entre os meses de março a julho de 2014, nas instalações do Instituto de Investigação de Pesquisas Agropecuárias Uruguiaia - INIA, La Estanzuela (Uruguai) com a aprovação do comitê de ética animal da instituição.

Para o experimento vacas primíparas da raça Holandês (n = 20) com peso vivo de 594,7 kg \pm 57,2; espessura de gordura subcutânea de 0,40 mm \pm 0,18 e escore de condição corporal de 3,6 \pm 0,8 (média \pm DP) foram arranjadas em um delineamento blocos completos ao acaso, sendo alocadas por data de parto, peso vivo, espessura de gordura subcutânea e escore de condição corporal. A fim de obter dois lotes com distintos balanços energéticos, os animais foram agrupados em dois tratamentos de uma ou duas ordenhas diárias mantendo o mesmo nível de alimentação. Os tratamentos consistiram de: a) animais mantidos em uma ordenha diária (T1, 05:30 hs) e; b) animais mantidos em duas ordenhas diárias (T2, 05:30/16:00 hs) durante oito semanas iniciais de lactação (até o dia 55 pós-parto). O tratamento iniciou a partir do quarto dia após o parto e não se ofereceu alimento na sala de ordenha. Animais do grupo T1 no período da ordenha da tarde permaneciam em zona neutra sem acesso a comida. Finalizado o período de aplicação dos tratamentos todos os animais foram manejados em duas ordenhas diárias para estudo residual do efeito tratamento, realizado até dia 90 de lactação.

Para o período pré-parto animais foram alimentados exclusivamente com TMR (ração totalmente misturada) e em pós-parto ofertou-se alimento para perfazer uma produção média de 30 litros de leite/vaca/dia, sendo alimentadas em uma proporção 70/30 respectivamente com PMR (ração parcialmente misturada) entre as ordenhas da manhã e da tarde e pastagem de aveia variedade *Halley* (TABELA 01), ofertado exclusivamente entre as ordenhas da tarde e da manhã. Dietas foram formuladas de acordo com as exigências descritas no NRC (2001). Em pastejo os animais contavam com água nos piquetes. A divisão dos animais dentro de cada piquete se realizou respeitando o delineamento de blocos, havendo dois animais do mesmo tratamento em cada parcela.

5.2 Dados e Amostras, Coletas e Análises

Consumo dos animais foi determinado semanalmente por três dias consecutivos, sendo consumo de PMR e pasto realizado simultaneamente. Para este, TMR e PMR se realizou com mensurações individuais da diferença entre ofertado e sobras no comedouro. Já em pastejo o consumo foi determinado pelo método de dupla amostragem descrito por Whitney, (1974) com uso de medidor de pasto tipo disco (JENKIP, New Zealand). Em pastejo diariamente os animais ingressavam em parcelas novas mantendo uma oferta diária de aproximadamente 10 kg de MS/animal, assumindo disponibilidade de 50%.

Tabela 01 - Ingredientes das dietas (% MS) dos animais em pré e pós-parto

Ingrediente, % da MS	Dieta	
	Pré-parto	Pós-parto
Pastagem		
Aveia Halley	-	30,02
PMR / TMR ⁵		
Silagem de milho	84,03	35,52
Silagem de grão úmido de milho	4,62	27,01
Farelo de soja	6,15	5,25
Feno de trigo	4,62	* ¹
Ureia ²	0,15	0,35
Vitaminas e Minerais	0,43 ³	1,85 ⁴

¹ Adicionado dois quilogramas a dieta pós-parto posterior a terceira semana de lactação

² Fornecida na forma de degradação lenta (Optigen)

³ Sal (0,03% MS), Bovimilk pré-parto Nutral (0,40% MS)

⁴ Sal (0,03% MS), Bicarbonato de sódio (0,19% MS), Carbonato de sódio (0,19% MS), Bovimilk-k Premium Nutral (0,26% MS)

⁵ Ração parcialmente misturada ofertada em pós-parto / Ração totalmente misturada ofertada em pré-parto

Amostras dos componentes da PMR e TMR em cada novo lote, bem como amostras semanais da oferta da pastagem, coletada a cinco centímetros do solo, foram utilizadas para determinações químicas do ofertado (TABELA 02), sendo nestas analisadas; matéria seca, matéria mineral, matéria orgânica e proteína bruta como descrita pela AOAC (1990). Fibra insolúvel em detergente neutro e fibra insolúvel em detergente ácido foram analisadas de acordo com Van Soest *et al.* (1991), adaptando de acordo com Komarek (1993) e Senger *et al.* (2008). Todas as amostras se analisaram por duplicata, aceitando CV entre repetições de 05%. Valores de nitrogênio insolúvel em detergente neutro e nitrogênio insolúvel em

detergente ácida, lignina e gordura foram obtidos de tabelas de composição do NRC (2001), para os alimentos afins.

A produção individual de leite foi registrada em todas as ordenhas durante o período experimental. Amostras individuais de leite de duas ordenhas consecutivas foram coletadas semanalmente para análises de proteína total, gordura e lactose sendo estes analisados por espectroscopia de infravermelho (FT120, Foss Electric, Hillerød, Denmark).

Tabela 02 – Composição média dos ingredientes das dietas dos animais em pré e pós-parto

Ingrediente	Composição, % da MS								
	MS	MM	PB	NIDIN ¹	NIDA ¹	FDN	FDA	LIG ¹	GOR ¹
Aveia <i>Halley</i>	14,6	11,1	17,4	3,9	1,1	43,2	21,7	2,1	2,7
Silagem de milho	25,9	6,2	8,3	1,4	0,9	47,2	23,4	2,6	4,3
Silagem de grão ²	66,9	1,7	8,9	0,7	0,3	10,3	3,6	0,9	4,3
Feno de trigo	75,0	10,6	5,1	1,1	0,8	83,6	50,4	8,7	1,7
Farelo de soja	84,5	6,0	38,2	9,6	0,4	12,3	3,9	1,5	8,1

MS, matéria seca; MM, matéria mineral; PB, proteína bruta; NIDIN, nitrogênio insolúvel em fibra detergente neutro; NIDA, nitrogênio insolúvel em fibra detergente ácida, FDN, fibra insolúvel em detergente neutro; FDA, fibra insolúvel em detergente ácido; LIG, lignina; GOR, gordura

¹ Valores de tabelas do NRC 2001

² Silagem de grão úmido de milho

Mensurações corporais e coletas de amostras de sangue se realizaram nos dias -14, -07 pré-parto e aos 07, 14, 21, 28, 42, 56, 77 e 90 pós-parto, após ordenha e antes da alimentação da manhã (\pm 08:00/10:00 hs). Nos animais realizou-se pesagem, ecografia para determinação da gordura subcutânea como descrito por Schröder & Staufenbiel (2006) com uso de transdutor de 5,0-MHz, e avaliou-se o escore de condição corporal (ECC) pela metodologia descrita por Edmonson *et al.* (1989). Já amostras de sangue foram coletadas da veia jugular com uso de tubos vacutainer e agulhas de 18G específicas.

Coleta de sangue para determinações de ureia, NEFAs e *DB-HB* utilizou-se tubos de dez mL contendo ativador de coágulo. As amostras foram centrifugadas para a separação do soro (2800 \times g por 10 min) após intervalo de três horas da coleta, sendo as amostras deixadas em bancadas em temperatura ambiente por 60 minutos (min) e posteriormente mantidas à 04°C por 120 min, para obter adequada coagulação (KANEKO, 1989). Para a determinação da concentração da glicose sanguínea, utilizaram-se tubos de quatro mL contendo fluoreto de sódio e oxalato de potássio, sendo as amostras mantidas resfriadas com gelo em caixa térmica até centrifugação (3000 g x 10 min). As amostras para determinação da concentração de ACAC no sangue foram coletadas como descrito por Mellanby & Williamson (1974) e

McNeil *et al.* (2014), com uso de tubos de quatro mL contendo heparina. Para ACAC, após a coleta, as amostras foram desproteinizadas com ácido perclórico 30% (p/v), deixadas em repouso por dez minutos em banho de gelo e posteriormente centrifugadas (3000 g x 10 min) para a separação do sobrenadante. Imediatamente após a coleta de sangue todos os tubos vacutainer foram homogeneizados e amostras após a centrifugação transferidas para micro tubos e armazenadas a -20°C até análises.

A determinação laboratorial da concentração sanguínea de ureia e glicose foram realizadas utilizando-se kits de Urea UV cinética AA líquida e Glicemia enzimática AA líquida (Wiener lab). Nestes os CV intra e interespecíficos foram 6,2 e 6,5 % para ureia e 5,7 e 5,8 % para glicose. *Standards* de controles da Standatrol foram utilizados. Análises das concentrações de NEFAs e DB-HB utilizaram-se kits NEFA C, n° 994-75409 E[®] (Wako) e Rambut DB-Hidroxitirato (Randon). Nestes os CV intra e interespecíficos foram 6,1 e 5,5 % para NEFA e 5,9 e 5,1 % para DB-HB. *Standards* de controles da Randox Hn1530 foram utilizados. ACAC foi analisado por kit ketone body assay (MAK134 - Sigma-Aldrich). As análises de ureia, glicose NEFAs e DB-HB se basearam em métodos enzimáticos com leitura por colorimetria densidade óptica com comprimento de onda de 340, 505, 550 e 340 nanômetros (nm) respectivamente, com uso de analisador automático Vitalab Selectra II. Já ACAC foi analisado com auxílio de analisador automático por leitura em microplacas em 340 nm. Neste trabalho, dados das análises da concentração de ACAC sanguíneo não serão apresentados no trabalho por erros metodológicos e desta forma, não serem conclusivos.

Para a estimativa da composição proteica e lipídica corporal, procedeu-se a técnica de diluição da ureia como descrito por Agnew *et al.* (2005) nos dias -07 pré-parto e aos dias +28, +60 e +90 pós-parto. Para a técnica primeiramente se coletou amostra de sangue, para determinação da concentração da ureia em tempo zero (T0). A posterior, solução de ureia foi injetada na veia jugular com uso de cateter de polietileno (1,6-mm x 600-mm) no tempo máximo de três minutos e após 12 minutos segunda amostra de sangue foi coletada (T12). No dia anterior à técnica, peso vivo foi obtido e houve a preparação da solução de ureia (ACS) 20% diluída em solução fisiológica e filtrada em nitrato de celulose 45 µm. O volume injetado de ureia foi calculado de forma a perfazer 130 mg/kg de PV. Amostras de sangue foram obtidas da artéria jugular, com uso de tubos vacutainer, contendo ativador de coágulo. Formação do coágulo se procedeu como descrito por (KANEKO, 1989) e após centrifugação (2800 x g por 10 min) sobrenadante foi transferido para micro tubos e mantidos a -20°C até análises. Equações da estimativa das frações proteica e lipídica total se apresentam a seguir.

5.3 Cálculos e Estimações

5.3.1 Consumo aparente de pasto

No pasto, semanalmente se procedeu à calibração do instrumento para estimar massa de forragem de entrada e saída, com cinco pontos heterogêneos da pastagem. A calibração para cada ponto foi dada pelo valor do coeficiente do disco e peso da forragem em uma área de $0,1\text{m}^2$. Ao final do experimento, duas únicas equações foram montadas para a estimação da massa de oferta e sobra respectivamente. Coeficiente médio de entrada e saída usado para cada parcela foi obtido pela diferença da soma entre 50 pontos de coleta com o uso do disco, no momento de entrada dos animais na parcela, pela soma dos 50 pontos de coleta pelo disco no momento de saída dos animais de cada parcela. Equações lineares de massa de forragem para entrada e saída são apresentadas a seguir; sendo o x substituído pelo valor médio do coeficiente dos três dias de medição com o disco, para dados de entrada e saída dos animais.

$$\text{Massa de entrada} = 0,009x - 0,0422 \quad (r^2 = 0,80)$$

$$\text{Massa de saída} = 0,0075x - 0,0455 \quad (r^2 = 0,76)$$

Consumo aparente de cada animal dentro do piquete foi obtido pela diferença em kg de MS na entrada e saída dos animais, dividido por dois (número de animais por parcela).

5.3.2 Balanço energético e Balanço Proteico

Balanço energético (BE) foi calculado para cada animal nos dias 07, 14, 21, 28, 42, 56, 77 e 90 pós-parto, por diferença entre a energia líquida ingerida (EL_I) e as exigências de energia líquida para produção (EL_P), manutenção (EL_M) e crescimento (EL_C) de acordo com equações propostas pelo NRC (2001). No período de avaliação os animais não se encontravam prenhes.

Energia ingerida foi calculada multiplicando as médias de consumo dos ingredientes por energia líquida de lactação (EL_L) para cada componente da dieta. Produção e composição

média do leite da semana para cada animal foram utilizados. Requerimentos de produção foram calculados como:

$$EL_P(\text{Mcal} / \text{dia}) = \text{produção de leite} * [(0,0929 * \%gordura) + (0,0547 * \%proteína\ bruta) + (0,0395 * \%lactose)]$$

Cálculos das exigências de manutenção para os dois grupos experimentais se deram como descrito abaixo: sendo distância percorrida de 500 metros (m) duas vezes ao dia.

$$EL_M(\text{Mcal} / \text{dia}) = (PV^{0,75}) * 0,08 + \left[\left(\text{Distancia recorrida em } \frac{\text{km}}{1000} * 2 \right) * \left[(0,00045 * PV) + (0,0012 * PV) \right] \right]$$

Exigências de crescimento foram dadas para animais de primeira lactação pelas equações abaixo descritas. Para os cálculos, utilizou-se 650 kg para peso adulto, intervalo entre partos de 14 meses, idade de primeiro parto aos 24 meses e temperatura média 10°C.

$$MPV = (PPP + PSP) / 2$$

$$PSP = PA * 0,92$$

$$EPV = (478 / PA) * MPV$$

$$EPVA = EPV * 0,891$$

$$GPCV = GP * 0,956$$

$$GP = (PSP - PPP) / IP$$

$$EL_G = 0,0635 (EPVA^{0,75}) * (GPCV^{1,097})$$

$$EL_C = (EL_G * 0,4) * 0,63$$

Sendo; MPV média peso vivo (kg); PPP peso ao primeiro parto (kg); PSP peso ao segundo parto (kg); PA peso adulto (kg); EPV equivalente peso vivo (kg); EPVA equivalente peso vazio (kg); GPCV ganho de peso corporal vazio (g/dia); GP ganho de peso (g/dia); IP intervalo entre partos (dias); EL_G energia líquida de ganho; EL_C energia líquida de crescimento.

Ao final, balanço energético foi obtido por:

$$BE (\text{Mcal} / \text{dia}) = EL_I - (EL_P + EL_M + EL_C)$$

Para balanço de proteína metabolizável (PM) os coeficientes de degradabilidade ruminal e digestibilidade intestinal da proteína bruta dos alimentos foram obtidos do NRC (2001).

5.3.3 Composição corporal

Para estimativas das frações proteicas e lipídicas corporais, se utilizou a técnica descrita por Agnew *et al.* (2005). Estimação da proteína corporal (PC) expressada em kg de PV foi determinada pelas equações abaixo:

$$PC = 5,0 + [(0,036 * USV_{12}) + (0,105 * PV)] (r^2 = 0,89)$$

$$USV_{12} = \frac{UI}{U_0 - U_{12}}$$

Sendo; USV_{12} volume no espaço de ureia em 12 min (kg); UI kg de ureia infundida no animal; U_0 concentração sanguínea de ureia em mMol/L em T0; U_{12} concentração sanguínea de ureia mMol/L em T12; PV Peso vivo em kg.

Estimação da gordura corporal (GC) expressada em kg de PV, foi determinada como descrito nas equações a seguir:

$$GC = -41 + \left[\left(0,036 * USV_{\frac{12}{EBW}} \right) + (0,192 * PV) + (-1,32 * PL) + (11,19 * ECC) \right]$$

$$(r^2 = 0,66)$$

$$EBW = -21 + [(0,133 * USV_{12}) + (0,687 * PV)] (r^2 = 0,90)$$

Sendo; $USV_{12/EBW}$ volume no espaço de ureia em 12 min (kg)/peso do corpo vazio; PL produção de leite em litros; ECC escore de condição corporal; EBW peso do corpo vazio em kg.

5.4 Análises Estatística

Os resultados foram avaliados de forma separada para o período de tratamento (até o dia 55 de lactação) e para período residual (dia 56 aos 90). As análises estatísticas se realizaram pela diferença de cada período em função ao dia 07 para o período de tratamento e dia 56 para o período residual. Já para as características de CMS, produção e composição do leite foram usados valores originais.

Análise estatística se deu para variáveis repetidas no tempo. Variáveis mensuradas foram submetidas à ANOVA usando instruções REPEATED do procedimento PROC MIXED do software SAS System for Windows versão 9.2 (SAS® institute, 2009) como descrito pelo modelo abaixo, com uma estrutura de covariância tipo SP(POW):

$$y_{ijk} = \mu + T_i + D_j + B_k + (T*D)_{ij} + (B*T)_{ki} + \varepsilon_{ijk} \quad i = 1, \dots, a; j = 1, \dots, b; k = 1, \dots, n$$

Onde:

y_{ijk} = Observação ijk

μ = Media geral

T_i = Efeito fixo do tratamento i

D_j = Efeito fixo do dia j

B_k = Efeito aleatório do bloco k

$(T*D)_{ij}$ = Efeito fixo da interação tratamento i por dia j

$(B*T)_{ki}$ = Erro aleatório a, (Interação bloco k com tratamento i)

ε_{ijk} = Erro aleatório b, (Variação entre as medidas nos animais)

a = numero de tratamentos; b = número de dias; n = numero de blocos;

Antes das análises se verificou a normalidade dos resíduos mediante procedimento PROC UNIVARIATE do SAS para procedimento PROC MIXED e se eliminaram valores extremos (um a oito valores). Todos os resultados se apresentaram como média dos mínimos quadrados \pm erro padrão da média (EPM). Médias de todos os parâmetros avaliados foram comparadas mediante teste t de Student com diferença significativa quando $P \leq 0,05$ e como tendência para valores de $0,05 < P \leq 0,10$.

Análise de correlação foi realizada para valores originais dos valores pós-parto das medidas de avaliações corporais, sanguíneas e de balanço energético e proteico, usando procedimento PROC CORR do SAS.

6 RESULTADOS

6.1 Consumo, produção e composição de leite

Consumo total em kg de MS não diferiu entre os grupos de uma (T1) e duas (T2) ordenhas diárias para período de tratamento (até dia 55 de lactação) e período residual (dia 56 aos 90 de lactação). Dados de consumo das frações TMR, PMR e pastagem também foram analisados e diferenças não foram encontradas entre tratamentos e períodos (Tabela 03; Figura 01. B, C.).

Diferenças de produção de leite entre os grupos experimentais foram observadas. A produção de leite em litros por dia (PL/L) e em litros corrigido para 4% de gordura (LCG, 4%) foi menor para o grupo de uma ordenha diária no período de tratamento (Tabela 03). No período residual na forma de tendência, PL/L foi menor no grupo T1 (Tabela 03; Figura 02. A, B).

Para porcentagem dos componentes no leite, gordura apresentou maior concentração para T1 em ambos os períodos do estudo (4,48 P = 0,0002 e 3,49 P = 0,0395) (Tabela 03). Lactose foi menor em T1 para período de tratamento e tendeu a ser menor no período residual (4,78, P = 0,0047 e 5,02, P = 0,0673) (Tabela 03). Já porcentagem de proteína no leite não foi afetada. Para produção em kg/dia de gordura, proteína e lactose no leite do grupo T2 apresentou maior média com 0,89; 0,80; 1,23 kg/dia para período de tratamento (Tabela 03; Figura 03. A, C, E).

Tabela 03. Média dos mínimos quadrados e erro padrão da média dos valores originais de consumo, produção e composição do leite entre os animais mantidos em uma ordenha diária (T1) e duas ordenhas diárias (T2)

Variável	Tratamento ¹				P-Valor ⁴	Residual ²				P-Valor ⁴
	T1		T2			T1		T2		
	Média	EPM ³	Média	EPM		Média	EPM	Média	EPM	
CMS TOTAL, kg/dia ⁵	19,39	0,53	19,47	0,51	0,9136	18,45	0,70	17,36	0,73	0,3028
CMS PMR, kg/dia ⁶	12,33	0,30	12,51	0,32	0,6844	12,76	0,32	12,37	0,32	0,4109
CMS Pasto, kg/dia ⁷	7,04	0,46	7,19	0,44	0,8266	5,31	0,52	4,56	0,56	0,3532
Leite, L/dia	15,00	0,70	24,22	0,70	<0,0001	22,27	1,46	26,26	1,46	0,0861
LCG 4%, L/dia ⁸	16,97	0,63	22,91	0,63	<0,0001	20,72	0,97	22,60	0,97	0,2027
Gordura, %	4,88	0,13	3,74	0,13	0,0002	3,49	0,12	3,09	0,12	0,0395
Proteína, %	3,35	0,04	3,34	0,04	0,8436	3,41	0,07	3,27	0,07	0,2149
Lactose, %	4,78	0,06	5,07	0,06	0,0047	5,02	0,04	5,13	0,04	0,0673
Gordura, kg/dia	0,73	0,03	0,89	0,03	0,0029	0,79	0,04	0,81	0,04	0,7194
Proteína, kg/dia	0,50	0,02	0,80	0,02	<0,0001	0,75	0,04	0,86	0,04	0,0730
Lactose, kg/dia	0,72	0,04	1,23	0,04	<0,0001	1,11	0,06	1,35	0,06	0,0319

¹ Tratamento = período de tratamento (até dia 55 de lactação)

² Residual = período residual de avaliação (dia 56 aos 90 de lactação)

³ EPM = Erro padrão da média

⁴ P-valor para efeito de tratamento

⁵ CMS = Consumo de matéria seca (kg/dia)

⁶ CMS PMR = Consumo de matéria seca em kg/dia da ração parcialmente misturada

⁷ CMS PASTO = Consumo de matéria seca em kg de aveia, variedade *Halley*

⁸ LCG, 04% = Leite corrigida para 04% de gordura; LCG, 04% = 0,4 * produção leite + 15 *(gordura leite/100) * produção leite. (NRC, 2001)

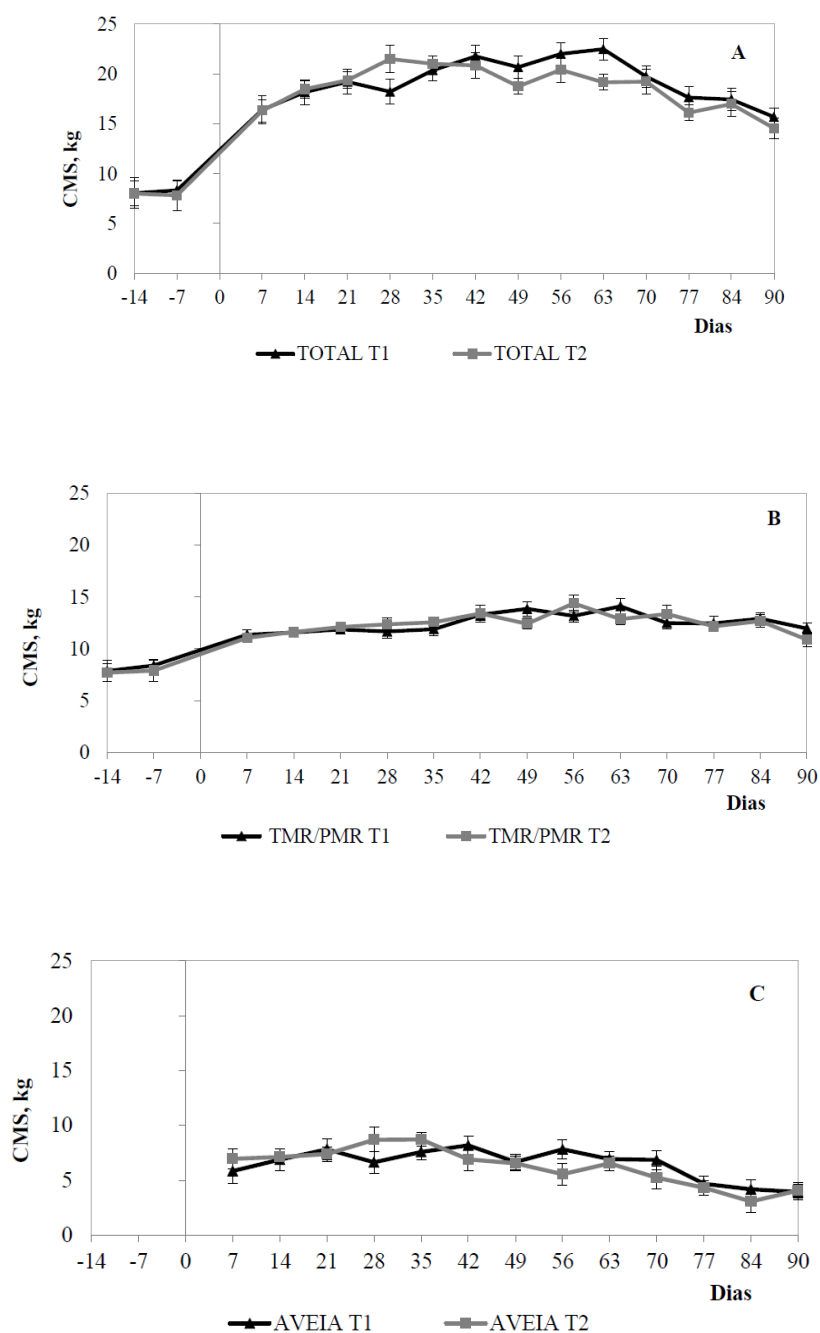


Figura 01. Média dos mínimos quadrados e erro padrão da média dos valores originais para as características de consumo total em kg de MS (TOTAL T1; TOTAL T2 – A), Consumo de TMR em kg de MS (TMR/PMR T1; TMR/PMR T2 – B) e consumo de aveia em kg de MS (AVEIA T1; AVEIA T2 – C), entre os animais mantidos em uma ordenha diária (T1) e duas ordenhas diárias (T2).

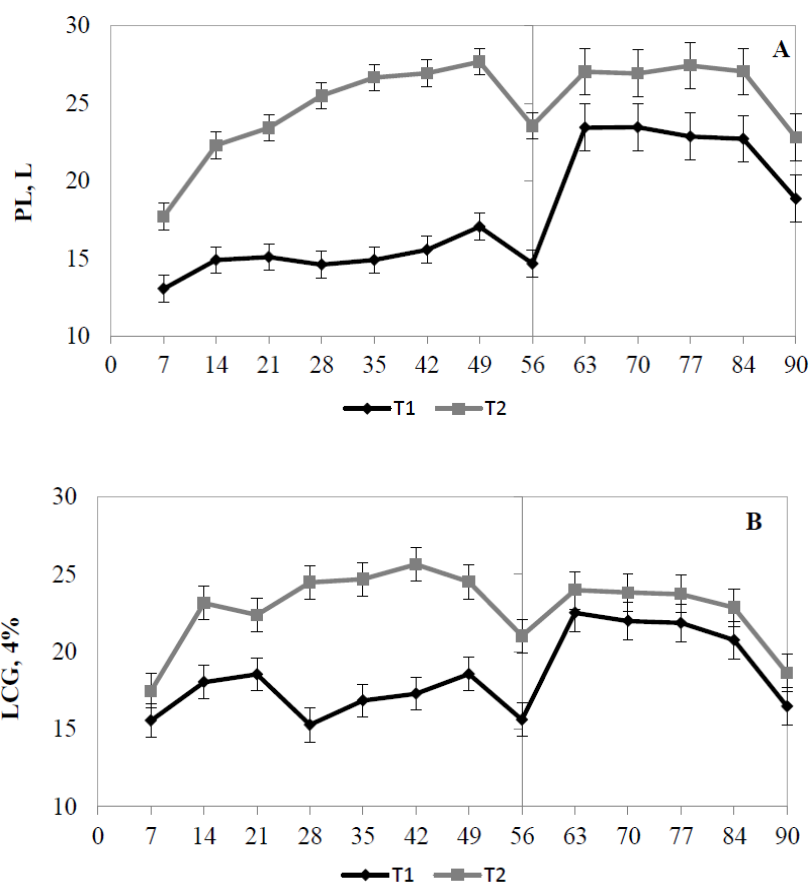


Figura 02. Média dos mínimos quadrados e erro padrão da média dos valores originais para as características de produção de leite em litros (PL, L – A) e produção de leite em litros corrigida para 4% de gordura (LCG, 4% - B), entre os animais mantidos em uma ordenha diária (T1) e duas ordenhas diárias (T2).

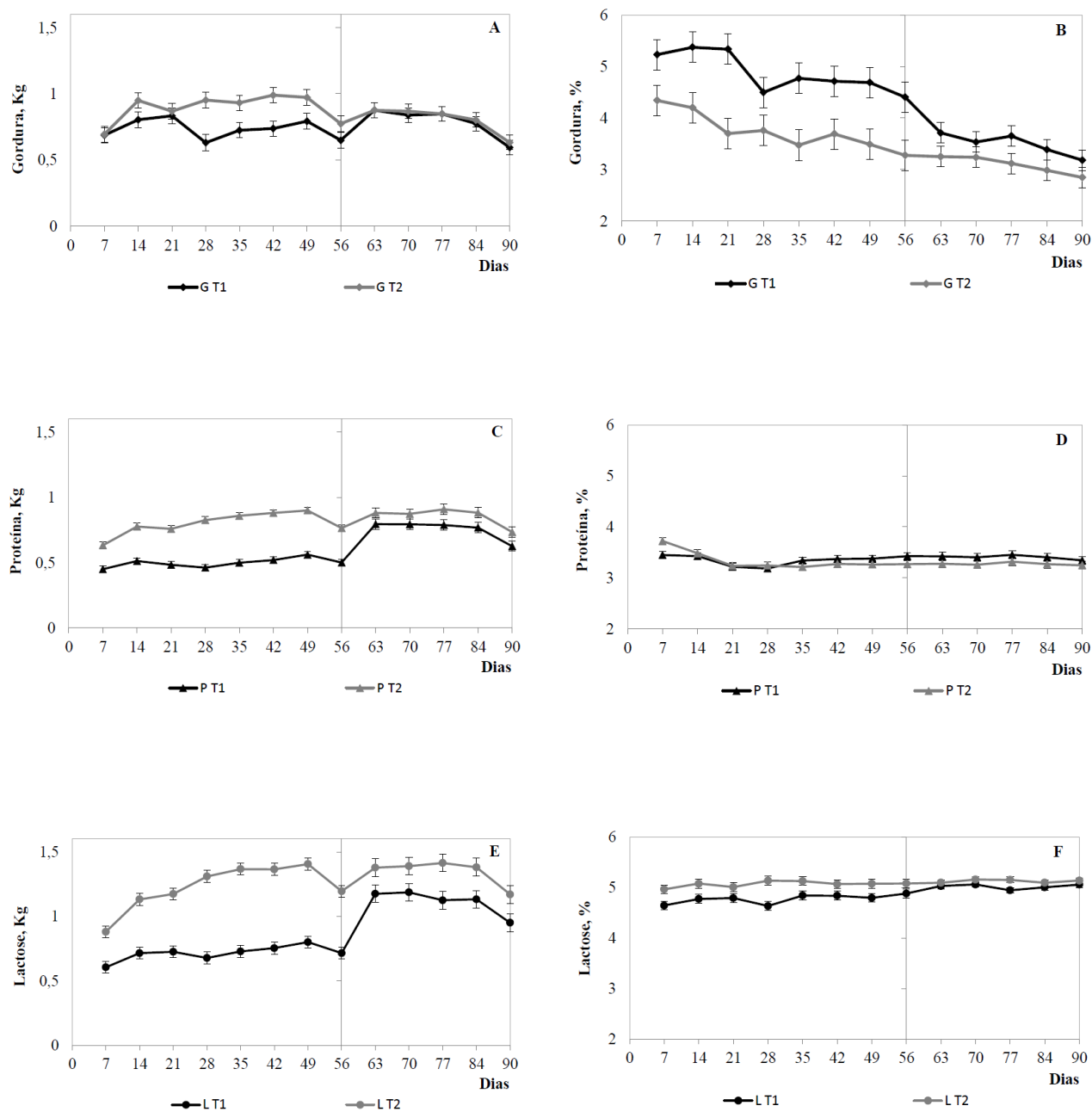


Figura 03. Média dos mínimos quadrados e erro padrão da média dos valores originais para as características de composição do leite; kg de gordura (A); porcentagem de gordura (B); kg de proteína (C); porcentagem de proteína (D); kg de lactose (E); porcentagem de lactose (F), entre os animais mantidos em uma ordenha diária (T1) e duas ordenhas diárias (T2).

6.2 Balanço energético e balanço de proteína metabolizável

As dinâmicas das médias dos cálculos de BPM e BE e para período de tratamento e residual de avaliação experimental estão apresentadas na Figura 04. A, C. Das análises das diferenças, para período de tratamento, grupo em duas ordenhas diárias apresentou valor médio negativo para as diferenças em BE e BPM (-1,01 P = 0,0003 e -109,36 P = <0,0001, para efeito interação tratamento/dia - T*D) respectivamente. Já T1 neste período manteve BE e BPM positivo (Tabela 04 e Figura 04. B, D).

Para período residual, os valores médios das diferenças para as variáveis de BE e BPM foram negativos em ambos os grupos experimentais. Nestes resultados, grupo T1 apresentou menores valores para ambas as variáveis (Tabela 04; Figura 04. B, D).

Tabela 04. Média dos mínimos quadrados e erro padrão da média das diferenças (Δ), dos cálculos de balanço energético e de proteína metabolizável entre os animais mantidos em uma ordenha diária (T1) e duas ordenhas diárias (T2)

Variável	Tratamento ¹				<i>P-Valor</i> ⁵	Residual ²				<i>P-Valor</i> ⁵
	T1		T2			T1		T2		
	Média ³	EPM ⁴	Média	EPM		Média	EPM	Média	EPM	
Δ BPM, g/dia ⁶	131,34	27,00	-109,36	24,42	0,0002	-837,65	44,94	-442,22	33,21	0,0004
Δ BE, Mcal/dia ⁷	1,75	0,48	-1,01	0,44	0,0022	-8,51	0,91	-5,60	0,74	0,0423

¹ Tratamento = período de tratamento (até dia 55 de lactação)

² Residual = período residual de avaliação (dia 56 aos 90 de lactação)

³ Média das diferenças com o dia 07 como referência para período de tratamento e dia 56 como referência para período residual

⁴ EPM = Erro padrão da média

⁵ *P-valor* para efeito de tratamento

⁶ Valor das diferenças de balanço de proteína metabolizável, g/dia

⁷ Valor das diferenças de balanço energético, Mcal/dia

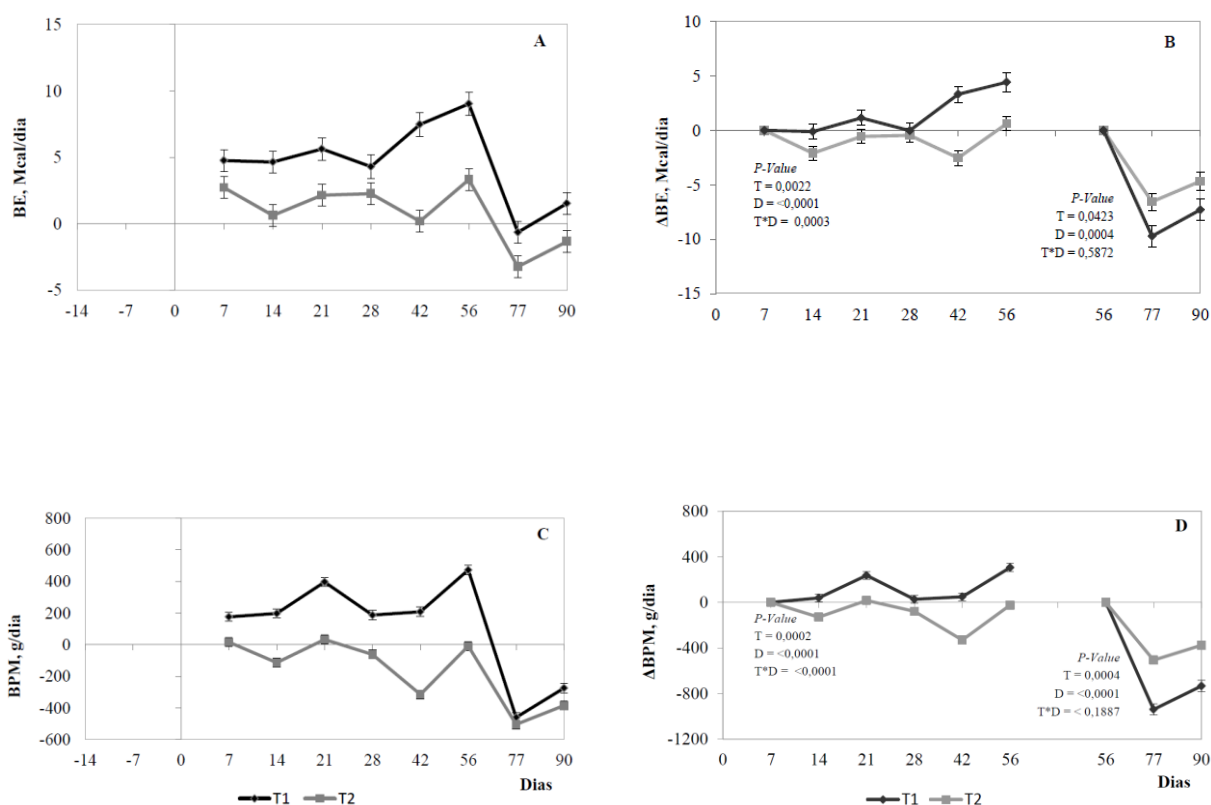


Figura 04. Média dos mínimos quadrados e erro padrão da média dos valores originais de balanço energético (BE - A) e balanço de proteína metabolizável (BPM - C); Média dos mínimos quadrados e erro padrão da média dos valores das diferenças (Δ) para período de tratamento (até dia 55 de lactação) e residual (dia 56 aos 90 de lactação), para balanço energético (Δ BE - B) e balanço de proteína metabolizável (Δ BPM - D), entre os animais mantidos em uma ordenha diária (T1) e duas ordenhas diárias (T2).

6.3 Mensurações corporais

Mensurações corporais de PV, ECC, EGS, GC e PC ao longo do experimento estão demonstrados na Figura 05. A, C, E, e Figura 06. A, C. Pelas análises das diferenças, característica de PV, ECC e EGS, não diferiram entre os grupos mantidos em uma ou duas ordenhas diárias (Tabela 05; Figura 05. B, D, F). Para esta análise houve efeito de dia (D) ($P = 0,0070$) para a característica de PV diferindo nos dias 14, 21 e 28 apresentando menores valores das diferenças ($P < 0,05$, estatística não demonstrada) (Figura 05. B). Da mesma forma, EGS diferiu para efeito D ($P = 0,0047$), para os dias 21, 28, 42, 56 e 90 ($P < 0,05$, estatística não demonstrada) (Figura 05. F).

Das análises das diferenças das características de GC e PC, observou-se mobilização de gordura e proteína em ambos os grupos experimentais no período de tratamento, sendo encontrada tendência de menor mobilização de GC no grupo T1 neste período (-33,79 e -58,82 kg $P = 0,0672$) (Tabela 05; Figura 06. B).

Na avaliação residual animais em T1 apresentaram deposição de proteína corporal (3,17 kg, $P = 0,0463$) (Tabela 05; Figura 06. D).

Tabela 05. Média dos mínimos quadrados e erro padrão da média das diferenças (Δ), para as características corporais de peso vivo, escore de condição corporal, espessura de gordura subcutânea, gordura e proteína corporal, entre os animais mantidos em uma ordenha diária (T1) e duas ordenhas diárias (T2)

Variável	Tratamento ¹				<i>P-Valor</i> ⁵	Residual ²				<i>P-Valor</i> ⁵
	T1		T2			T1		T2		
	Média ³	EPM ⁴	Média	EPM		Média	EPM	Média	EPM	
Δ Peso Vivo, kg	-8,20	3,21	-16,04	3,21	0,1177	14,55	7,72	3,95	7,72	0,3568
Δ Escore de Condição Corporal, 1 - 5	0,20	0,07	0,11	0,07	0,3839	-0,10	0,10	-0,03	0,10	0,6075
Δ Espessura de Gordura Subcutânea, mm	-0,35	0,09	-0,49	0,09	0,3373	-0,30	0,18	-0,29	0,18	0,9545
Δ Gordura Corporal, kg de PV ⁶	-33,79	7,67	-58,82	6,47	0,0672	-0,37	3,74	1,59	3,16	0,7091
Δ Proteína Corporal, kg de PV ⁶	-11,00	1,55	-14,06	1,31	0,2054	3,17	0,63	0,83	0,53	0,0463

¹ Tratamento = período de tratamento (até dia 55 de lactação)

² Residual = período residual de avaliação (dia 56 aos 90 de lactação)

³ Média das diferenças com o dia 07 como referência para período de tratamento e dia 56 como referência para período residual

⁴ EPM = Erro padrão da média

⁵ *P-valor* para efeito de tratamento

⁶ Estimação pela técnica de diluição de ureia

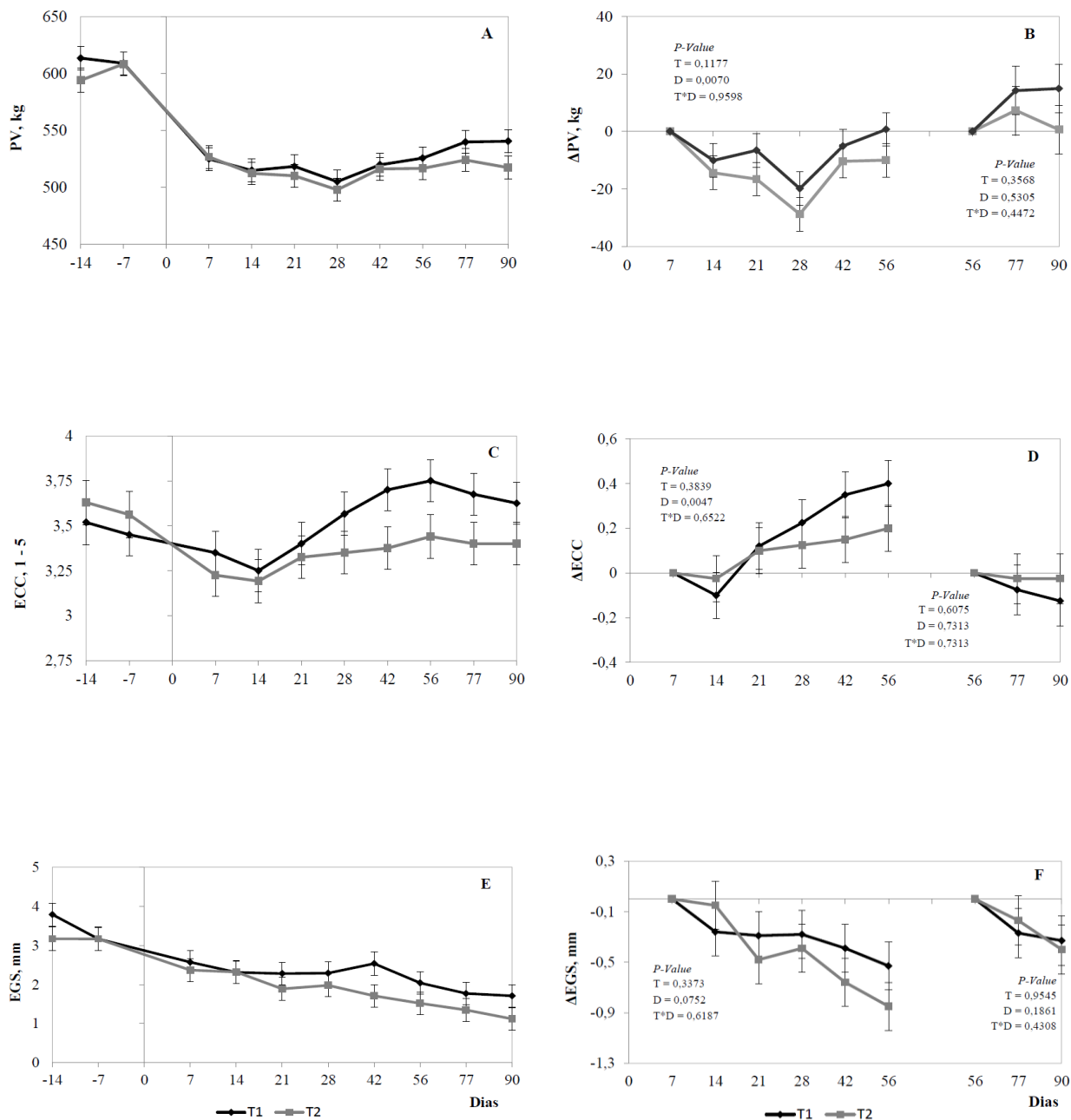


Figura 05. Média dos mínimos quadrados e erro padrão da média dos valores originais para as características corporais peso vivo (PV - A), escore de condição corporal (ECC - C), espessura de gordura subcutânea (EGS - E); Média dos mínimos quadrados e erro padrão da média das diferenças (Δ) para período de tratamento (até dia 55 de lactação) e residual (56 aos 90 de lactação), para as características corporais de peso vivo (Δ PV - B), escore de condição corporal (Δ ECC - D) e espessura de gordura subcutânea (Δ EGS - F), entre os animais mantidos em uma ordenha diária (T1) e duas ordenhas diárias (T2).

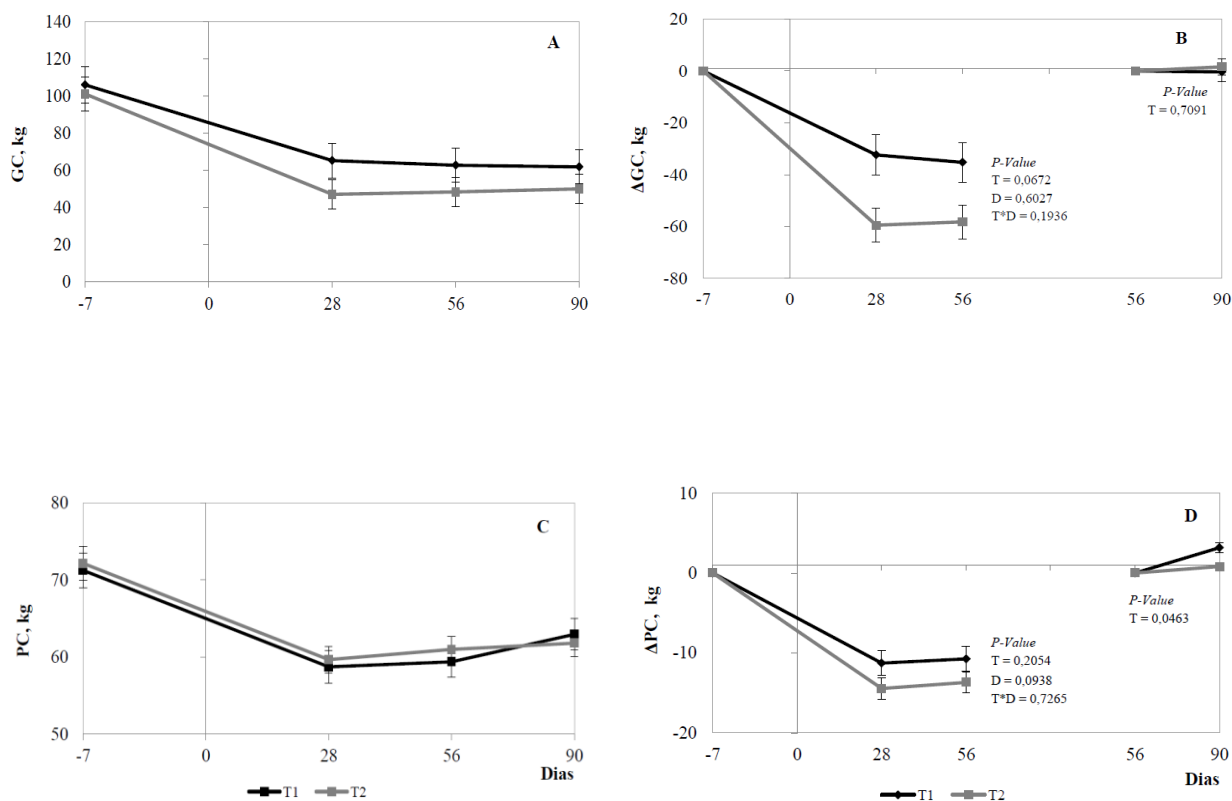


Figura 06. Média dos mínimos quadrados e erro padrão da média dos valores originais para gordura corporal (GC – A) e proteína corporal (PC - C); Média dos mínimos quadrados e erro padrão da média das diferenças (Δ) para período de tratamento (até dia 55 de lactação) e residual (dia 56 aos 90 de lactação), para valores de gordura corporal (Δ GC – B) e proteína corporal (Δ PC – D), entre os animais mantidos em uma ordenha diária (T1) e duas ordenhas diárias (T2).

6.4 Mensurações sanguíneas

Dinâmicas das mensurações sanguíneas ao longo do experimento estão demonstradas na Figura 07. A, C; Figura 08. A, C. Da avaliação dos valores das diferenças, no período de tratamento, ureia não diferiu entre os grupos experimentais (Tabela 06; Figura 07. D). Glicose tendeu a ser maior para T1 (0,05 P = 0,0572, para efeito T*D) (Figura 07. B). Já a concentração de NEFAs e $D\beta$ -HB foi menor para grupo mantido em uma ordenha diária (-0,08 P = 0,0352 e -0,23 P = 0,0004) para efeito de tratamento para NEFAs e $D\beta$ -HB, respectivamente (Tabela 06; Figura 08. B, D).

Para período residual, valor médio das diferenças de concentração de NEFAs tendeu ser maior em T1 (0,09 P = 0,0680) (Tabela 06; Figura 08. B).

Houve efeito dia (D) para concentração da ureia sanguínea para o dia 90 (P <0,05, estatística não demonstrada). Para NEFAs em período de tratamento e residual houve efeito D (P = <0,0001; P = 0,0012) sendo distintos os dias 21, 28, 56, 77 e 90 (P <0,05, estatística não demonstrada), apresentados na Figura 07. D e Figura 08. B; respectivamente.

Tabela 06. Média dos mínimos quadrados e erro padrão da média das diferenças (Δ) das mensurações sanguíneas de glicose, ureia, ácidos graxos não esterificados e $D\beta$ -Hidroxiacetato, entre os animais mantidos em uma ordenha diária (T1) e duas ordenhas diárias (T2)

Variável	Tratamento ¹				<i>P-Valor</i> ⁵	Residual ²				<i>P-Valor</i> ⁵
	T1		T2			T1		T2		
	Média ³	EPM ⁴	Média	EPM		Média	EPM	Média	EPM	
Δ Glicose, mMol/L	0,05	0,19	-0,23	0,19	0,3326	-0,10	0,09	-0,02	0,09	0,5567
Δ Ureia, mMol/L	-0,57	0,15	-0,40	0,15	0,4355	0,60	0,20	0,90	0,21	0,3437
Δ NEFA, mMol/L ⁶	-0,08	0,06	0,14	0,06	0,0352	0,09	0,08	-0,14	0,08	0,0680
$\Delta D\beta$ -HB, mMol/L ⁷	-0,23	0,03	0,02	0,03	0,0004	-0,05	0,03	-0,09	0,03	0,2779

¹ Tratamento = período de tratamento (até dia 55 de lactação)

² Residual = período residual de avaliação (dia 56 aos 90 de lactação)

³ Média das diferenças com o dia 07 como referência para período de tratamento e dia 56 como referência para período residual

⁴ EPM = Erro padrão da média

⁵ *P-valor* para efeito de tratamento

⁶ Ácidos graxos não esterificados

⁷ $D\beta$ -Hidroxiacetato

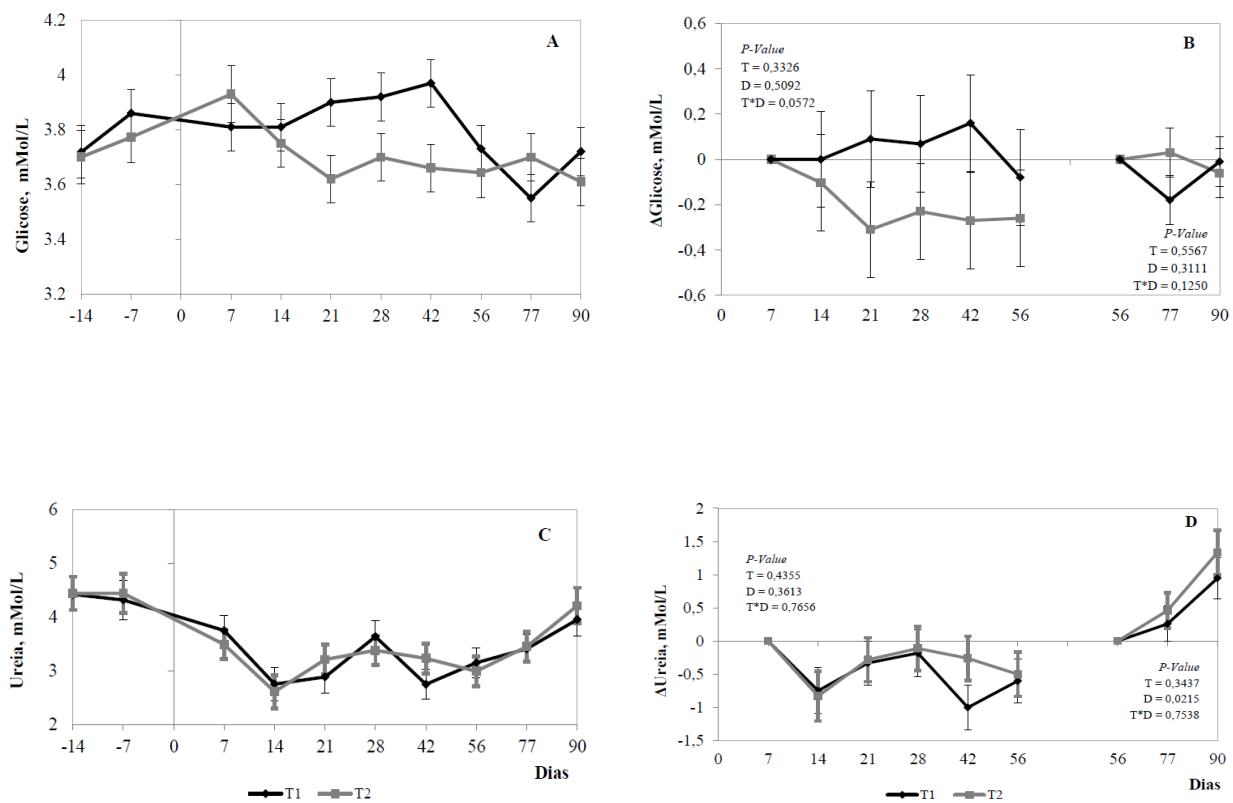


Figura 07. Média dos mínimos quadrados e erro padrão da média dos valores originais para as concentrações sanguíneas de glicose (Glicose - A) e Ureia (Ureia - C); Média dos mínimos quadrados e erro padrão da média das diferenças (Δ) para período de tratamento (até dia 55 de lactação) e residual (dia 56 aos 90 de lactação) para as concentrações sanguíneas de glicose (Δ Glicose - B) e ureia (Δ Ureia - D), entre os animais mantidos em uma ordenha diária (T1) e duas ordenhas diárias (T2).

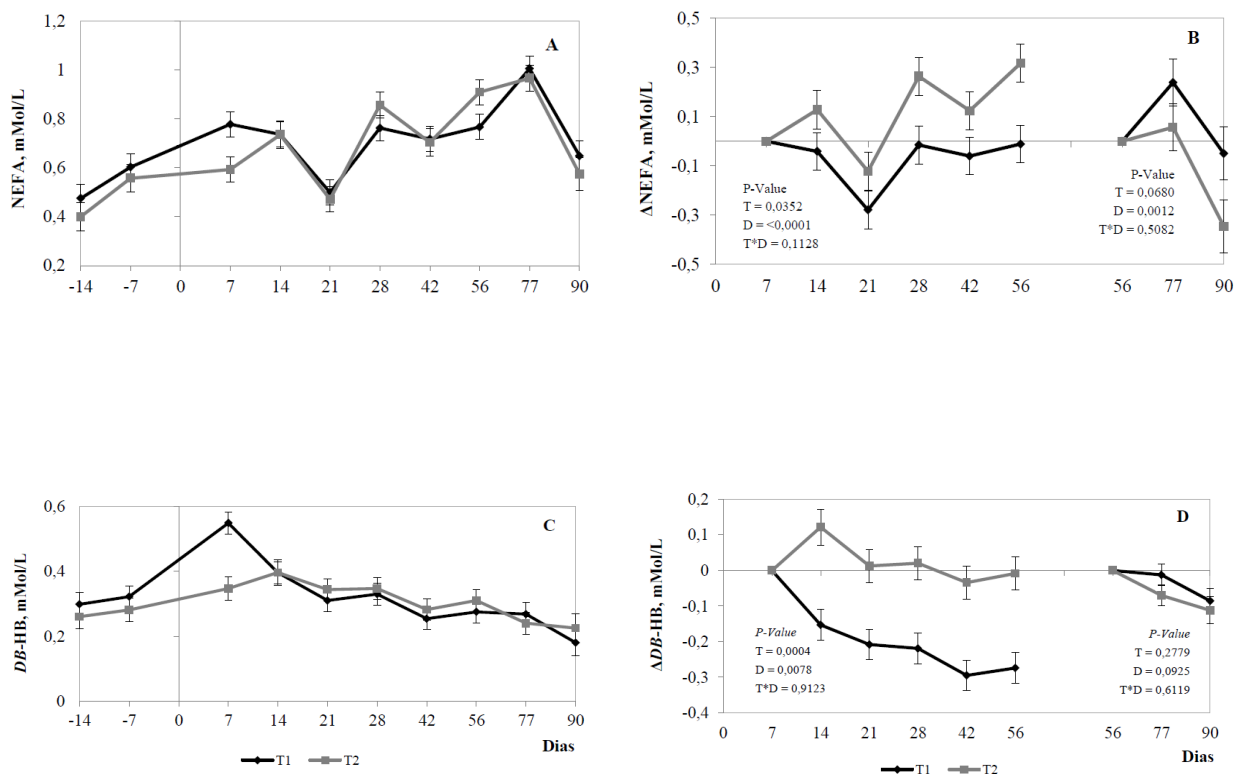


Figura 08. Média dos mínimos quadrados e erro padrão da média dos valores originais para as concentrações sanguíneas de ácidos graxos não esterificados (NEFAs - A) e $D\beta$ -Hidroxi butirato ($D\beta$ -HB - C); Média dos mínimos quadrados e erro padrão da média das diferenças (Δ) para período de tratamento (até dia 55 de lactação) e residual (dia 56 aos 90 de lactação), para as concentrações sanguíneas de ácidos graxos não esterificados (Δ NEFAs - B) e $D\beta$ -Hidroxi butirato ($\Delta D\beta$ -HB - D), entre os animais mantidos em uma ordenha diária (T1) e duas ordenhas diárias (T2).

6.4 Correlações

Correlações (dados em negrito) e *P-Valor* das mensurações corporais, sanguíneas e cálculos de BE e BPM estão demonstradas na Tabela 07. Correlação positiva entre BE e BPM foi encontrada ($r = 0,82$ $P = <0,0001$). BE e BPM se correlacionaram positivamente com EGS, ECC, e GC. Para BE relação negativa foi encontrada com PC ($r = -0,37$ $P = 0,0414$). BPM e PC não se relacionaram. EGS relacionou-se positivamente com ECC ($r = 0,35$ $P = <0,0001$), com PC ($r = 0,39$ $P = 0,0271$) e GC ($r = 0,6$ $P = 0,0003$). PC e GC se relacionam de forma favorável ($r = 0,48$ $P = 0,0055$). ECC relaciona-se positivamente com PC e GC.

Glicose relaciona-se de forma favorável com BE ($r = 0,37$ $P = <0,0001$) e BPM ($r = 0,39$ $P = <0,0001$). Concentração de NEFAs relacionou-se negativamente com BE ($r = 0,42$ $P = <0,0001$) e glicose de forma positiva ($r = 0,37$ $P = <0,0001$). Destacam-se ainda correlações negativas entre glicose e NEFAs ($r = -0,28$ $P = 0,0005$) e glicose e $D\beta$ -HB ($r = -0,23$ $P = 0,0051$). NEFAs e $D\beta$ -HB apresentaram correlação positiva, porém baixa ($r = 0,36$ $P = <0,0001$). $D\beta$ -HB não se relacionou com BE.

Tabela 07. Correlações (em negrito) e *P-Valor* dos valores de balanço energético, proteína metabolizável e características corporais e metabólicas dos animais mantidos sob efeito de tratamento

Variável	Variável										
	BE	BPM	PV	EGS	ECC	PC	GC	GLI	UR	NEFAs	<i>Dβ</i> -HB
BE, Mcal/dia	1,00	0,82	-0,14	0,22	0,20	-0,37	0,34	0,37	-0,11	-0,42	-0,09
		<0,0001	0,0767	0,0070	0,0119	0,0414	0,0667	<0,0001	0,2092	<0,0001	0,3122
BPM, Mcal/dia		1,00	-0,03	0,25	0,19	-0,17	0,70	0,39	-0,10	-0,27	0,13
			0,7010	0,0018	0,0194	0,3560	<0,0001	<0,0001	0,2651	0,0011	0,1167
PV, kg			1,00	0,29	0,27	0,82	0,30	-0,05	-0,08	0,18	0,15
				0,0003	0,0008	<0,0001	0,0995	0,5298	0,3508	0,0300	0,0620
EGS, mm				1,00	0,35	0,39	0,60	0,17	-0,16	0,04	0,23
					<0,0001	0,0271	0,0003	0,0342	0,0527	0,6612	0,0048
ECC, 1 - 5					1,00	0,37	0,89	0,16	-0,11	-0,01	-0,21
						0,0439	<0,0001	0,0461	0,2002	0,9489	0,0101
PC, kg de PV						1,00	0,48	-0,32	-0,17	0,45	0,33
							0,0055	0,0757	0,3869	0,0173	0,0878
GC, kg de PV							1,00	0,09	-0,14	0,05	-0,01
								0,6231	0,4803	0,8074	0,9531
GLI, mMol/L								1,00	-0,05	-0,28	-0,23
									0,5555	0,0005	0,0051
UR, mMol/L									1,00	-0,08	-0,05
										0,3484	0,5383
NEFAs, mMol/L										1,00	0,36
											<0,0001
<i>Dβ</i> -HB, mMol/L											1,00

BE = Balanço energético; BPM = Balanço de proteína metabolizável; PV = Peso vivo; EGS = Espessura de gordura subcutânea; ECC = Escore de condição corporal; PC = Proteína corporal; GC = Gordura corporal; GLI = Glicose; UR = Ureia; NEFAs = Ácidos graxos não esterificados; *Dβ*-HB = *Dβ*-Hidroxitirato

7 DISCUSSÃO

7.1 Efeito do número de ordenhas diárias no período inicial de lactação

Animais em uma ordenha diária em início de lactação, além do período de lactação, por apresentarem menor produção leiteira e produção de componentes, se espera menor CMS que animais em duas ordenhas diárias (KAY *et al.*, 2013). Já outros trabalhos não descreveram diferença de CMS entre uma ou duas ordenhas diárias, sendo justificado pelo fato destes trabalhos usarem animais em pastejo, e métodos de mensuração de CMS para animais em pastejo não serem sensíveis para detectar pequenas diferenças (STELWAGEM *et al.*, 2013). No trabalho atual, menor produção de leite e kg de sólidos diários foram encontrados para animais em uma ordenha diária (Tabela 03, Figuras 2 e 3) contudo, CMS em kg não diferiu entre os grupos experimentais (Tabela 03; Figura 1. A, B, C). Considerando tempo idêntico de acesso ao alimento entre os dois grupos experimentais, acesso à água na pastagem e a grande fração de alimento ofertado em comedouros (70% PMR), pode-se inferir que limitação na produção de leite não limitou CMS nestes animais. De forma complementar Rémond & Pomiès, (2005), descreveram que CMS em animais mantidos em uma ordenha diária começa a diminuir progressivamente a partir da sexta semana de tratamento, de acordo com o autor, isso é dado pelo fato que mudanças nas exigências nutricionais e adaptações de consumo são afetadas a mais longo prazo. Assim, mais pesquisas referentes aos resultados são necessárias. No presente estudo queda sem diferença significativa no CMS de aveia no período residual pode ser visualizado, coincidindo com período de queda de qualidade da aveia. Ajustando CMS à porcentagem de PV para cada período entre os tratamentos foram, 3,74 e 3,71% para T1 e 3,80 e 3,34 para T2 respectivamente, como descrito no NRC (2001).

De acordo com a literatura (McMANARA *et al.*, 2008; STELWAGEM *et al.*, 2013), declínio na produção de leite em animais mantidos em uma ordenha é observado, e em primíparas, esta queda pode chegar a aproximadamente 30 a 40% da produção no período inicial de lactação (RÉMOND & POMIÈS, 2005). No trabalho atual queda de 34,64% foi observada para L/dia no período de tratamento. Composição do leite também é afetada devido ao número de ordenhas diárias. Geralmente ocorre, um aumento na porcentagem de gordura e

proteína e diminuição da concentração de lactose no leite (STELWAGEM *et al.*, 2013). Porém, apesar de animais que são mantidos em uma ordenha no período inicial de lactação apresentarem maior porcentagem de certos componentes no leite, a menor produção de leite não compensa a perda em kg de gordura, proteína e lactose. No presente estudo, concentração de gordura foi maior para o grupo T1, e isso se deve principalmente ao efeito de concentração deste componente no leite. Em relação à proteína, o aumento desta está mais relacionado com alterações favoráveis no BE, sendo que neste estudo o BE não foi severamente distinto. Porcentagem de lactose foi menor no grupo de uma ordenha diária. Diminuição da porcentagem lactose no leite pode estar relacionada com diminuição da expressão de enzimas reguladores da síntese de lactose (GRALA *et al.*, 2011); menor captação de glicose pela glândula mamária (GUINARD-FLAMENT *et al.*, 2007) ou por afetar as junções epiteliais de células mamárias (STELWAGEN 2001). Ressalta-se ainda a diferença na perpendicularidade das curvas de lactação no período de tratamento para os dois grupos experimentais, sendo que T1 manteve uma constante na produção leiteira devido ao efeito tratamento. Para trabalhos futuros avaliação da curva total de lactação deveria ser estudada a fim de apresentar o comportamento da produção em toda a lactação nestes animais.

Animais em manejo de uma ordenha diária podem se encontrar em BE positivo (RÉMOND & POMIÈS, 2005) e/ou em melhor balanço energético em relação a animais ordenhados duas vezes ao dia (McNAMARA *et al.*, 2008). Contudo poucos dados de BE são encontrados em trabalhos com frequência de ordenha. No presente estudo pelas análises das diferenças, T1 apresentou BE e BPM positivo no período de tratamento, invertendo a relação no período residual (Figura 04. B e D), possivelmente pelo aumento da exigência de produção e/ou manutenção. T2 apresentou BPM negativo nos dois períodos de avaliação. BPM negativo na ausência de BE negativo na maioria das vezes é encontrada em animais em estágio final de gestação, devido a grande exigência proteica para crescimento do feto. No decorrente experimento, tal fato foi encontrado para animais no início de lactação (grupo T2) e possivelmente proteína da dieta foi inadequada. Pelos resultados dos cálculos propostos no NRC, balanço de proteína degradável no rumem (PDR) apresentou dados negativos para todos os períodos, não alcançando 10% da MS (dados não demonstrados). Neste ponto vale ressaltar ainda a considerável quantidade de sobras de PMR nos comedouros coletivos (dados não obtidos), exceto para os períodos de medição em que os animais permaneciam em baias individuais; e a subestimação dos valores de exigência de manutenção para animais com baixa

produção de leite descrita no NRC, o que pode ter superestimado BE para os animais (Weiss, 2014). Ainda de forma a influenciar estes resultados, para o período residual de estudo, houve queda no BE no grupo T2, o que pode estar relacionado com a queda de qualidade da aveia.

Características corporais, PV, ECC, EGS, GC e PC avaliadas neste estudo se comportaram de forma semelhante entre os grupos experimentais, notando-se maior declínio das diferenças para as características de PV, EGS, GC e PC no período de tratamento para T2. Em período de tratamento, houve tendência do grupo T2 mobilize mais GC que o grupo T1. Possivelmente as diferenças não foram encontradas para estas características pelo número de observações “*n*” insuficientemente, pois ao parecer estas, apresentaram grande variabilidade.

Alterações metabólicas foram identificadas entre os grupos experimentais. Nestes, mobilização de gordura foi detectada para grupo T2 em período de tratamento, indicado por maiores valores de concentrações sanguíneas de NEFAs, justapondo com tendência de maior mobilização de CG e com o pequeno aumento médio da concentração de $D\beta$ -HB (0,02 mMol) neste mesmo grupo. Corroborando com estes achados Weber *et al.* (2013) descreveram que para vacas primíparas, a gordura visceral é preferencialmente e primeiramente mobilizada. Esses achados poderiam explicar no trabalho atual a não diferença em ECC e EGS entre os grupos, que avaliam principalmente gordura subcutânea.

Animais mantidos em uma ordenha diária, em período de tratamento estiveram em melhor “*status*” energético, relacionado ao valor negativo da diferença para NEFAs (-0,08 mMol) e tendência de aumentos em 0,05 mMol de glicose, havendo ainda menores concentrações de $D\beta$ -HB. Zarrin *et al.* (2013) descreveram que aumentos de $D\beta$ -HB diminuem a concentração de glicose sanguínea, por afetar negativamente a gliconeogênese. No trabalho atual esta relação também foi observada na forma de tendência, sendo que grupo T2, além de apresentar maiores concentrações de $D\beta$ -HB no período de tratamento, tendeu a ter menor concentração de glicose. Contudo, menor concentração de glicose neste caso, pode ser decorrente a maior exigência de síntese de lactose no leite, pois de acordo com Zarrin *et al.* (2013) como a osmolaridade do $D\beta$ -HB é igual ou maior ao da glicose, este atuaria como um poupador de glicose aos tecidos periféricos, mas não para a glândula mamária.

Para o período residual, o grupo mantido em uma ordenha diária mesmo em decorrência do aumento instantâneo da produção de leite, não houve aumento de mobilização de reservas indicado por características corporais, contudo NEFAs tendeu a apresentar maior concentração no sangue para este grupo. Com estes dados, pode-se concluir que rápidas

alterações nas exigências do animal, promovem alterações no “*status*” metabólico, mas essas mudanças podem não ser visíveis para características corporais à curto prazo.

7.2 Estudo da relação da mobilização de reservas corporais e metabólitos sanguíneos com efeito tratamento

Foi observada relação positiva entre BPM e BE, sendo que estas variáveis apresentaram relação positiva também com características corporais de EGS, ECC e GC. Com isso, de forma geral aumentos de BPM podem promover aumentos de BE, contudo o inverso pode não ser verdade, como por exemplo, em condições de proteína limitante ao animal.

Das características corporais, BE relacionou-se com EGS ($r = 0,22$ $P = 0,0070$), contudo apresentando relação baixa, sendo que EGS relaciona-se de forma positiva com ECC, PC, GC, glicose e $D\beta$ -HB.

Relacionando PC e GC percebe-se relação positiva entre as duas variáveis, contudo ao observar essa relação com BE e BPM tais variáveis se opõem, isso pode ser dado ao desequilíbrio de BPM entre estes animais e/ou como demonstrado por Van Der Drift *et al.* (2012) mecanismos distintos da dinâmica de mobilização e deposição de PC e GC podem estar presentes em vacas leiteiras. Outro ponto de interpretação ainda em rotas anabólicas é a questão “diluição” da fração proteica corporal em detrimento ao aumento da gordura corporal, pois animais em balanço energético positivo podem apresentar aumentos da massa de lipídica, mas para proteica pode não ser verdade. Também de forma a acrescentar, animais de maior PV neste estudo, apresentaram relação positiva com EGS, ECC e PC, entretanto para GC não foi verdade. Isso pode ser explicado *a priori* pela fisiologia de crescimento de animais de primeira cria, como utilizado neste estudo.

Para metabólitos sanguíneos, destacam-se a relação negativa entre NEFAs e BE e positiva entre glicose e BE. De forma a aportar glicose relaciona-se negativamente com NEFAs e $D\beta$ -HB. Esta relação está coerente aos resultados de Weber *et al.* (2013) que descreveram diminuição da expressão gênica de enzimas glicolíticas com aumentos da concentração sanguínea de NEFAs. Vale ressaltar que o mecanismo de depleção de rotas glicolíticas não está elucidado, sendo encontrado inclusive aumento da síntese de glicose em animais em BEN (BERCHIELLI *et al.*, 2011). Noro & Wittwer, (2012), descreveram relação

inversa entre ureagênese e gliconeogênese, entretanto no presente estudo, concentrações sanguíneas de ureia e glicose não se correlacionaram. Já ao observar a relação entre proteína corporal e concentração de glicose sanguínea, tendência ($P = 0,0757$) de forma negativa ($r = -0,32$) foi encontrada, demonstrando que diminuição da massa proteica corporal, pode estar relacionada com aumentos da concentração de glicose, possivelmente por aumentos da gliconeogênese. Contudo PC e concentração sanguínea de ureia não se relacionaram.

Neste trabalho obteve-se relação positiva, porém baixa entre NEFAs e $D\beta$ -HB, demonstrando que aumentos de NEFAs estão associados a pequenos aumentos de $D\beta$ -HB no sangue, inferindo que nem todo $D\beta$ -HB seja proveniente desta rota catabólica. Com isso, se pode inferir que $D\beta$ -HB não seja indicativo de BEN em vacas leiteiras. De forma a corroborar aos resultados, com aumentos da concentração de NEFAs sanguíneo, a quantidade de RNA_m de enzimas responsáveis pelo transporte e oxidação de AG para o tecido esquelético aumentam (SHAFF *et al.*, 2012), assim em primeiro momento o aumento da concentração sanguínea de NEFAs pode não contrastar com a elevação da concentração de CC no sangue. Do aumento da concentração de corpos cetônicos a nível sanguíneo é possível que este seja favorável ao ACAC e para isso mais pesquisas em torno deste metabólico são necessárias.

8 CONCLUSÕES

O regime de uma ordenha diária em vacas primíparas no início de lactação não afetou consumo de matéria seca dos animais, contudo menor produção de leite foi observada em contraste ao grupo mantido em duas ordenhas diárias. Balanço energético foi melhor nos animais do grupo T1 no período de manejo de uma ordenha diária.

Para as características de mobilização de reservas corporais não houve diferença entre os grupos experimentais. No entanto, concentrações sanguíneas de ácidos graxos não esterificados e *Dβ*-Hidroxiacetato foram menores no grupo T1 no período de tratamento.

Baixa relação entre características de mobilização de reservas corporais e metabólicas com dados de balanço energético foram encontradas. *Dβ*-Hidroxiacetato não se relacionou com balanço energético.

9 AJUSTES PARA TRABALHOS FUTUROS

- a) Congelar amostras para análises de ACAC a -80°C em período mínimo possível.
- b) Ajustar todos os componentes da dieta a fim de exigir máxima produção leiteira em vacas de primeira cria mantidas em regime de duas ordenhas diárias.
- c) Para cálculos de exigência de proteína para crescimento em peso do parto do animal, considerar peso dos animais após parto sem a placenta.
- d) Análise da frutossamina sanguínea como substituto da análise de glicose pode ser realizada.
- e) Estudar curva total de lactação em animais mantidos em uma ordenha diária no período inicial de lactação.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNEW, R.E.; YAN, T.; MCCAUGHEY, W. J.; MCEVOY, J. D.; PATTERSON, D .C.; PORTER, M. G.; STEEN, W. R. J. Relationships Between Urea Dilution Measurements and Body Weight and Composition of Lactating Dairy Cows. **Journal Dairy Science**, v.88, p. 2476-2486, 2005.

AIELLO, R.J.; KENNA, T. M.; HERBEIN, J. H. Hepatic gluconeogenic and ketogenic interrelationships in the lactating cow. **Journal of Dairy Science**, v.67, n.01, p.1707-1715, 1983.

AOAC. 1990. Official methods of analysis, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.

ARMBUSTER, D. A. Fructosamine: Structure, Analysis and Clinical Usefulness. **Clinical Chemistry**, n.33, v.12, p.2153-2163, 1987.

BEEVER, D. E. The impact of controlled nutrition during the dry period on dairy cow health, fertility and performance. **Animal Reproduction Science**, v.96, n.01, p. 212-226, 2006.

BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. 2.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2011. 616p.

CONNOR, W. E.; LIN, D. S.; COLVIS, C. Differential mobilization of fatty acids from adipose tissue. **Journal of Lipid Research**, v. 37, p.290-298, 1996.

DRACKLEY, J.K. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? **Journal of Dairy Science**, v.82, n.01, p.2259-2273, 1999.

EDMONSON, A. J.; LEAN, I. J.; WEAVER, L. D.; FARVER, T.; WEBSTER, G. A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows. **Journal Dairy Science**, v.72, p.68-78, 1989.

ELIA, M.; CARTER, A.; BACON, S.; WINEARLS, C. G.; SMITH, R. Clinical usefulness of urinary 3-methylhistidine excretion in indicating muscle protein breakdown. **British Medical Journal**, v.282, n.01, p.351-354, 1981.

GALLO, L., CARNIER, P., CASSANDRO, M., MANTOVANI, R., BAILONI, L., CONTIERO, B. & BITTANTE, G. Change in body condition score of holstein cows affected by parity and mature equivalent milk yield. **Journal of Dairy Science**, v.79, n.01, p.1009-1015. 1996.

GOLAZO, M. G.; HAYIRLI, A.; DOEPEL, L.; AMBROSE, D. J. Reproductive performance of dairy cows is influenced by parturition feed restriction and dietary fatty acid source.

Journal of Dairy Science, v.92, v.01, p.2562-2571, 2009. GRALA, T. M.; PHYN, C. V. C.; KAY, J. K.; RIUS, A. G.; LITTLEJOHN, D. M.; SNELL, R. G.; ROCHE, J. R. Temporary alterations to milking frequency, immediately post-calving, modified the expression of genes regulating milk synthesis and apoptosis in the bovine mammary gland. **New Zealand Society of Animal Production**, v.71, p.3-8, 2011.

GUINARD-FLAMENT, J.; DELAMAIRE, E.; LAMBERTON, P.; PEYRAUD, J. L. Adaptions of mammary uptake and nutrient use to once daily milking and feed restriction in dairy cows **Journal Dairy Science**, v.90, p.5062-5072, 2007.

HEGARDT, F. G. Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase: a control enzyme in ketogenesis. **Journal of Biochemistry**, v.338, n.01, p.569-582, 1999.

HORAN, B.; DILLON, P.; FAVERDIN, P.; DELABY, L.; BUCKLEY, F.; RATH, M. The interaction of strain of holstein-friesian cows and pasture-based feed systems on milk yield, body weight, and body condition score. **Journal of Dairy Science**, v.88, n.01, p.1231-1243, 2005.

HOUWELING, M.; VAN DER DRIFT, S. G. A.; JORRITSMA, R.; TIELENS, A. G. M. Technical note: Quantification of plasma 1- and 3-methylhistidine in dairy cows by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal Dairy Science**, v.95, p.3125-3130, 2012.

KANEKO, J. J. 1989. **Clinical biochemistry of domestic animals**, 4th ed.. Academic press, San Diego, CA, 932p.

KAY, J. K.; PHYN, C. V. C.; RIUS, A. G.; MORGAN, S. R.; GRALA, T. M.; ROCHE, J. R. Once-daily milking during a feed deficit decreases milk production but improves energy status in early lactating grazing dairy cows. **Journal Dairy Science**, v.96, p.6274-6284, 2013.

KOMARAGIRI, M. V. S.; CASPER, D. P.; ERDMAN, R. A. Factors affecting body tissue mobilization in early lactation dairy cows. 2. Effect of dietary fat on mobilization of body fat and protein. **Journal of Animal Science**, v.81, n.01, p.169-175, 1998.

KOMAREK, A. R. A filter bag procedure for improved efficiency of fiber analysis. **Journal of Animal Science**, v.76, p.250, 1993.

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos ruminantes**. 3. ed. Santa Maria: UFSM, 2011. 214p.

LARSEN, M.; KRISTENSEN, N. B. Precursors for liver gluconeogenesis in periparturient dairy cows. **Animal**, v., p.1-11, 2013.

LI, X.; LI, X.; BAI, G.; CHEN, H. Effects of non-esterified fatty acids on the gluconeogenesis in bovine hepatocytes. **Molecular Cellular Biochemistry**, v.359, p.385-388, 2012.

LOOR, J. J.; EVERTS, R. E.; BIONAZ, M.; DANN, H. M.; MORIN, D. E.; OLIVEIRA, R.; RODRIGUEZ-ZAS, S. L.; DRACKLEY, J. K.; LEWIN, H. A. Nutrition-induced ketosis alters metabolic and signaling gene networks in liver of periparturient dairy cows. **Physiological Genomic**, v.32, p.105-116, 2007.

MCNAMARA, S.; MURPHY, J. J.; O'MARA, F. P.; RATH, M.; MEE, J. F. Effect of milking frequency in early lactation on energy metabolism, milk production and reproductive performance of dairy cows. **Livestock Science**, v.117, p.70-78, 2008.

McNEIL, C. A.; PRAMFALK, C.; HUMPHREYS, S. M.; HODSON, L. The storage stability and concentration of acetoacetate differs between blood fractions. **Clinical Chemical Acta**, V.433,p.278-283, 2014.

MELLANBY J, WILLIAMSON D: Acetoacetate, in *Methods of Enzymatic Analysis*, (2nd ed) edited by BERGMEYER HU. New York, Academic Press, 1974, pp. 1840-1843.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7.rev.ed. Washinton, D.C.: 2001. 381p.

NELSON, D. L.; COX, M. **Principios de bioquímica de Lenhninger**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 1274p

NORO, M.; WITWER, F. Interrelaciones entre ureagénesis y gluconeogénesis hepática en rumiantes alimentados con elevado contenido de nitrógeno. **Revista Veterinaria-México**, v.43, n.02, p.143-154, 2012.

PIOT, C.; VEERKAMP, J. H.; BAUCHART, D.; HOCQUETTE, J. F. Contribution of mitochondria and peroxisomes to palmitate oxidation in rat and bovine tissues. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.121, p.185-194, 1998.

RÉMOND, B.; POMIÈS, D. Once-daily milking of dairy cows: a review of recent French experiments. **Animal Research**, v.54, p.427-442, 2005.

SCHÄFF, C.; BÖRNER, S.; HACKE, S.; KAUTZSCH, U.; SAUERWEIN, H.; SPACHMANN, S. K.; SCHWEIGEL-RÖNTGEN, M.; HAMMON, H. M.; KUHLA, B. Increased muscle fatty acid oxidation in dairy cows with intensive body fat mobilization during early lactation. **Journal Dairy Science**, v.96, p.1-12, 2012.

SCHRÖDER, U. J.; STAUFENBIEL, R. Invited Review: Methods to Determine Body Fat Reserves in the Dairy Cow with Special Regard to Ultrasonographic Measurement of Backfat Thickness. **Journal Animal Science**, v.89, p.01-14, 2006.

SCHWEIGER, M.; SCHREIBER, R.; HAEMMERLE, G.; LASS, A.; FLEDELIUS, C.; JACOBSEN, P.; TORNQVIST, T.; ZECHNER, R.; ZIMMERMANN, R. Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. **The Journal of Biological Chemistry**, v.281, n.52, p. 40236–40241, 2006.

SENGER, C. et al., Evaluation of autoclave procedures for fibre analysis in forage and concentrate feedstuffs. **Animal Feed Science and Technology**, v.161, n.1-2, p.169, 2008.

STELWAGEN, K. Effect of milking frequency on mammary functioning and shape of the lactation curve. **Journal Dairy Science**, v.84, p.204-211, 2001(E. Suppl.).

- STELWAGEN, K.; PHYN, C. V. C.; DAVIS, S. R.; GUINARD-FLAMENT, J.; POMIÈS, D.; ROCHE, J. R.; KAY, J. K. Invited review: Reduced milking frequency: Milk production and management implications. **Journal Dairy Science**, v.96, p.3401-3413, 2013.
- VAN DER DRIFT, S.G.A.; HOUWELING, M.; SCHONEWILLE, J. T, TIELENS, A. G. M.; JORRITSMAN, R. Protein and fat mobilization and associations with serum β -hydroxybutyrate concentrations in dairy cows. **Journal Animal Science**, v.95, p.4911-4920, 2012.
- VAN SOEST, J.P.; ROBERTSON, J. B.; LEW, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal Dairy Science**, v.74, p.3583-3597, 1991.
- WEBER, C.; HAMETNER, A.; TUSCHSCHERER, A.; LOSAND, B. KANITZ, E.; OTTEN, W.; SAUERWEIN, H.; BRUCKMAIER, R. M.; BECKER, F.; HAMMON, H. M. Hepatic gene expression involved in glucose and lipid metabolism in transition cows: Effect on fat mobilization during early lactation in relation to milk performance and metabolic changes. **Journal Dairy Science**, v.96, p.5670-5681, 2013.
- WEISS, W. Universidad de la República Uruguay, Facultad de Veterinaria, **Curso de nutrición avanzada**. Montevideo, [300-]. Não paginado, 2014.
- WHITNEY, S. A. Measurement of foliage height and its relationships to yield of two tropical forage grasses. **Agronomy Journal**, v.66, p.334-336, 1974.
- XU, C.; WANG, Z.; LIU, G.; LI, X.; XIE, G.; XIA, G.; ZHANG, H. Metabolic Characteristic of the Liver of Dairy Cows during Ketosis Based on Comparative Proteomics. **Asian-Australasian Journal Animal Science**, v.21, n.07, p.1003-1010, 2008.
- YANG, L.; ZHANG, Y.; WANG, S.; ZHANG, W.; SHI, R. Decreased liver peroxisomal β -oxidation accompanied by changes in brain fatty acid composition in aged rats. **Neurological Sciences**, v.34, n.07, 2013.
- ZARRIN, M.; MATTEIS, L.; VERNAY, M. C. M. C.; WELLNITZ, O.; VAN DORLAND, H. A.; BRUCKMAIER, R. M. Long-term elevation of β -hydroxybutyrate in dairy cows through infusion: Effects of feed intake, milk production, and metabolism. **Journal Dairy Science**, v.96, p.2960-2972, 2013.