|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| |  | | --- | | UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia  **logo2_100_fc** Dissertação |  |  | | --- | | **Avalição de proteínas de fase aguda, hemograma, marcadores metabólicos energéticos e resistência a insulina no periparto de vacas leiteiras com mudança de condição no pré-parto** |  |  | | --- | | **Paula Montagner** |  |  | | --- | | Pelotas, 2013 | |
|  |

Paula Montagner

**Avaliação de proteínas de fase aguda, hemograma, marcadores metabólicos energéticos e resistência a insulina no periparto de vacas leiteiras com mudança de condição corporal no pré-parto**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Área do conhecimento: Bioquímica aplicada a biotecnologia).

Orientador:

Prof. Marcio Nunes Corrêa

Co-orientadores:

Prof. Augusto Schneider

Pesquisador: Eduardo Schmitt

Prof. Francisco A. B. Del Pino

Prof. Cássio Cassal Brauner

Pelotas, 2013

Ficha catalográfica

**Banca examinadora**:

Eduardo Schmitt, Dr., EMBRAPA - Centro de Pesquisa Agroflorestal de Rondônia

Elizabeth Schwegler, Dra., Universidade Federal de Pelotas

Mirela Noro, Dra., Universidade de Passo Fundo

Marcio Nunes Corrêa, Dr., Universidade Federal de Pelotas (Orientador)

Cássio Cassal Brauner, Dr., Universidade Federal de Pelotas (Suplente)

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais e a minha irmã pelo apoio nesta caminhada.

Ao meu noivo por todo carinho, paciência e companheirismo nos momentos felizes e principalmente nos momentos difíceis.

Aos minhas colegas que foram imprescindíveis para a realização desse trabalho: Elizabeth Schwegler, Marina Menoncim Weschenfelder e Ana Rita Tavares Krause.

Ao meu orientador Marcio Nunes Corrêa pela confiança, pelos ensinamentos profissionais e incentivos. E aos meus co-orietadores por toda dedicação ajuda e paciência.

Aos graduandos, pós-graduandos e professores, integrantes do Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária pela amizade, compreensão e auxílio na execução do projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela oportunidade de realização do mestrado. E a Capes pela bolsa de estudo oferecida durante o curso.

Ao Laboratórios de Bioquímica Clínica, da Universidade Federal de Pelotas, pela disponibilidade da infraestrutura e materiais para a condução das atividades.

**Resumo**

MONTAGNER, Paula. **Avaliação de proteínas de fase aguda, hemograma, marcadores metabólicos energéticos e resistência a insulina no periparto de vacas leiteiras com mudança de condição corporal no pré-parto.** 2013. 48f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O objetivo deste estudo foi avaliar as proteínas de fase aguda, hemograma, marcadores metabólicos energéticos e a resposta ao teste a tolerância a resistência a glicose e insulina em vacas leitara no periparto que apresentam mudança no escore(ECC) de condição corporal no pré-parto. Foram utilizadas 20 vacas da raça Holandês, acompanhadas do dia -21 pré-parto até o dia 30 pós-parto, mantidas em mesmo sistema de manejo em rebanho comercial no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. Os animais foram divididos em dois grupos, vacas que ganharam ECC da terceira para a primeira semana antes da data prevista do parto (GEC = 11) ou as que perderam ECC (PEC = 9), neste mesmo período. Foi coletado sangue nos dia -21, -14, -7 e -3 pré-parto, no dia do parto e nos dia 3, 6, 9, 16, 23 e 30 pós-parto para determinação as concentrações séricas de glicose (GLI), ácidos graxos não esterificados (AGNE), insulina (INS), albumina (ALB), paraoxonase (PON), haptoglobina (HP). Nos dias -20 pré-parto e 9 pós-parto todas vacas foram submetidas ao teste de tolerância a glicose e a insulina (TTGI) para obtenção dos valores de glicose basal, secreção da insulina por estímulo da glicose (RESG), área sob a curva(ASC) da glicose até 60’ e 180 minutos, meia vida da glicose até 60’ e 180’, e a taxa de metabolização(CR) da glicose até 60’ e 180’. Para a insulina foram gerados os seguintes parâmetros: pico de insulina, incremento de insulina, ASC da insulina aos 60’ e 150’. A produção de leite foi registrada diariamente, gerando médias a cada cinco dias, entre os dias 16 e 41 de lactação. Semanalmente foi realizado hemograma, pesagem, avaliação ECC. Os animais do grupo GEC tiveram maiores concentrações de PON no pós-parto (P < 0,05) e ALB no pré e pós-parto (P < 0,05), enquanto o grupo PEC teve concentrações mais elevadas de HP em ambos os períodos (pré-parto: P < 0,04; e pós-parto: P < 0,05). A produção leiteira foi superior 3 litros/vaca/dia no grupo GEC (P < 0,03) sendo observada uma média de 27,4 ± 1.4 kg/dia contra 24,4 ± 1,2 kg/dia do grupo PEC. No hemograma foi observado maior contagem de monócitos no grupo PEC, no pré-parto (P < 0,01) e pós parto (P < 0,03), e maior número de animais com relação neutrolifo:linfócito > 1. As concentrações de GLI, AGNE, INS, e o TTGI não diferiram (P > 0,05) entre os grupos. Concluímos que a perda de ECC no pré-parto, altera a mediadores inflamatórios durante o periparto.

*Palavras Chaves:* Balanço Energético Negativo, Haptoglobina, Paraoxonase, Albumina, Insulina, Periparto.

**Abstract**

MONTAGNER, Paula. **Evaluation of acute phase proteins, hemogram, energy metabolic markers and insulin resistance in peripartum dairy cows with prepartum changes in body condition score.** 2013. 48f. Dissertation (Master). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The aim of this study was to evaluate acute phase proteins concentration, hemogram parameters, energetic metabolic parameters and the response to glucose and insulin tolerance test (GITT) in periparturient dairy cows that changed the body condition score (BCS) during the pre-partum period. For this study 20 pregnant Holstein dairy cows were evaluated, from the day -21 from expected calving date until 30 days postpartum, kept in a semi-extensive system in Southern Rio Grande do Sul, Brazil. Animals were categorized into two groups, cows that gained BCS from the third to the first week before the expected calving date (UP-BCS n = 11) or lost BCS (LO-BCS n = 9) during this period. Blood samples were collected at days 21, 14, 7 and 3 pre-partum, on the calving date and at days 3, 6, 9, 16, 23 and 30 postpartum to evaluate the concentrations of glucose (GLU), non-esterified fatty acids (NEFA), insulin (INS), albumin (ALB), and haptoglobin (HP)and paraoxonase (PON) activity. At days -20 pre-partum and 9 postpartum all cows were subjected to a glucose and insulin tolerance test (GITT), to obtain basal glucose levels, insulin stimulated blood glucose response (ISBGR), area under the curve (AUC) for glucose until 60 and 180 minutes, half-life of glucose until 60’ and 180’ and the clearance rate of glucose until 60' and 180’. The following parameters were evaluated for insulin concentrations: peak insulin, insulin increment and the AUC for insulin at 60 'and 150'. Milk yield was recorded daily, and an average was generated every 5 days, from 16 to 41 days in milk. Weekly hemogram was performed, and the cows were weighted and BCS was evaluated. The UP-BCS cows had higher levels (P < 0.05) of PON in postpartum and ALB in the pre and postpartum period (P < 0.05 for both periods), while the LO-BCS group had higher levels of HP in both periods (prepartum: P < 0.04 and postpartum P < 0.05). Average milk yield was 3 kg/cow/day higher in the UP-BCS than LO-BCS group (P < 0.03; 27,4 ± 1.4 Kg/d vs. 24.4 ± 1.2 Kg/d). Hemogram had higher count of monocytes in the LO-BCS group in the pre (P <0.01) and postpartum periods (P <0.03), and greater number of animals with neutrophil:lymphocyte ratio > 1. The concentrations of GLU, NEFA, INS and GITT were not different (P > 0.05) between groups. We conclude that the pre-partum loss of BCS alters the inflammatory mediators during the peripartum period.

**Key words**: Negative Energy Balance; Haptoglobin; Paraoxonase, Albumin, Insulin Peripartum

**Lista de Tabelas**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Tabela 1 - | Composição dos ingredientes da dieta disponível diariamente no pré e pós-parto disponíveis para as vacas durante o experimento......................................................................................... | 38 |
|  |  |  |
| Tabela 2 - | Valores médios e desvio padrão dos elementos constituintes do hemograma durante o pré e pós-parto de vacas que ganharam ECC no pré parto (GEC) e vacas que que perderam ECC no pré-parto(PEC).......................................................................................... | 39 |
|  |  |  |
| Tabela 3 - | Valores médios e desvio padrão das variáveis de resposta ao teste de tolerância a glicose e a insulina no pré e pós-parto, de vacas que ganharam ECC (GEC) e perderam ECC no pré-parto (PEC).................................................................................................. | 40 |
|  |  |  |

Lista de Figuras

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Figura 1 - | Escore de condição corporal (a) e peso vivo (b) observada durante o periparto nas vacas que perderam ECC no pré-parto (●) e vacas que ganharam ECC no pré-parto (**○**)............................................................. | 35 |
|  |  |  |
| Figura 2 - | Concentrações plasmáticas de ácidos graxos não esterificados (mmol/L) (a), albumina (g/dL) (b), haptoglobina (g/dL) (c), paraoxonase (KU/L) (d), durante o periparto, no grupo que perdeu ECC no pré-parto (●) e no grupo que ganhou ECC no pré-parto(**○**)... | 36 |
|  |  |  |
| Figura 3- | Produção de láctea (vaca/kg/dia) do dia 16 ao dia 41 pós-parto, do grupo perdeu ECC no pré-parto (●), e no grupo que ganhou ECC no pré-parto (**○**).......................................................................................... | 37 |

**Lista de abreviaturas**

AGNE – Ácidos Graxos Não Esterificados

BEN - Balanço Energético Negativo

CR – Clear rate

ECC – Escore de Condição Corporal

GEC – Ganharam Escore de Condição Corporal

GLI – Glicose

HAP - Haptoglobina

IMS – Ingestão de Matéria Seca

INS – Insulina

N:L – Neutrófilo:Linfócito

PEC – Perderam Escore de Condição Corporal

PON – Paraoxonase

PPA – Proteínas de Fase Aguda

TTGI - Teste de Tolerância a Glicose e Insulina

**Sumário**

|  |  |
| --- | --- |
| Banca examinadora................................................................................................ | 02 |
| Agradecimentos...................................................................................................... | 03 |
| Resumo................................................................................................................... | 04 |
| Abstract................................................................................................................... | 05 |
| Lista de Tabelas..................................................................................................... | 06 |
| Lista de Figuras...................................................................................................... | 07 |
| Lista de Abreviaturas.............................................................................................. | 08 |
| 1.Introdução Geral.................................................................................................. | 10 |
| 2. Hipótese.............................................................................................................. | 14 |
| 3. Objetivo............................................................................................................... | 15 |
| 4. Artigo .................................................................................................................. | 16 |
| 5. Conclusão Geral................................................................................................. | 41 |
| 6. Referências......................................................................................................... | 42 |

1. **Introdução Geral**

O período de transição entre o final da gestação e o inicio da lactação é um momento de intenso estresse para a vaca leiteira. A redução do consumo de matéria seca em 30 % associado ao rápido aumento do requerimento de nutrientes para crescimento fetal e lactação, além de marcantes mudanças no estado endócrino em preparação ao parto (GRUMMER, 1995), promovem o balanço energético negativo (BEN) (BOBE et al., 2004). Logo após o parto ocorre um crescente aumento na ingestão de matéria seca (IMS), porém não é suficiente para suprir todas as necessidades energéticas, uma vez que o pico de ingestão alimentar é posterior ao de produção leiteira, intensificando a severidade do o BEN (INGVARTSEN & ANDERSEN, 2000).

Devido às mudanças homeoréticas decorrentes da seleção genética para maior produção de leite, neste período também ocorre maior resistência periférica a insulina (CHAGAS et al., 2009), que compreende a deficiência de insulina (concentração basal baixa), diminuição da produção de insulina pelo pâncreas induzida pela glicose e a resistência à insulina (redução) nos tecidos alvo. Seu efeito principal na vaca a preservação da glicose e promoção da lipomobilização (HAYIRLI, 2006).

Neste período, para suprir as demandas de energia, ocorre a mobilização das reservas de ácidos graxos depositados principalmente no tecido adiposo, provocando o aumento das concentrações de ácidos graxos não esterificados (AGNE) podendo chegar a até 10 vezes maiores que o fisiológico, poucos dias após o parto (DOUGLAS at al., 2007; HERDT, 2000; INGVARTSEN & ANDERSEN, 2000), resultando em deposição de triglicerídeos no fígado (BOBE et al., 2004; OVERTON & WALDRON, 2004). Essa intensa lipomobilização tem sido associada com a maior suscetibilidade a doenças e aumento das citocinas pró-inflamatórias e, consequentemente, seus efeitos negativos (BERTONI at al., 2008).

Neste cenário, evidências sugerem que a imunossupressão do periparto pode ser em parte explicada pelo BEN e fenômenos correlatos, por exemplo,

mobilização lipídica e lipidose hepática, que podem altera funcionamento hepático (LACETERA et al., 2004). Assim o fígado ganha um papel de destaque no metabolismo, pois é o órgão que centraliza os metabólitos e determina a síntese dos mesmos (BAUMANN & GAULDIE, 1994).

Estudos têm sugerido que o NEFA, é responsável ​​por efeitos negativos sobre a imunidade. Ster et al., (2012) relataram que estudo *in vitro*, que concentrações de NEFA equivalentes às observadas no periparto, promovem a diminuição da proliferação de células mononucleares. Estas células apresentam papel importante na imunomodulação (BUTTERFIELD et al., 2006), visto que após o reconhecimento dos patógenos pelos receptores Toll-like (TLR), são estimuladas a produzir e liberar citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, incluindo o TNF, IL-1, IL-6 e IL-8, e posteriormente, citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 (TZIANABOS, 2000). Esta forma de respostas das células através da produção de citocinas é conhecida como “resposta de fase aguda” ou “reação sistêmica a inflamação”, muitas vezes distante do sitio de ação, envolvendo vários órgãos, entre eles o órgão centralizador-fígado, onde ocorre uma super-expressão ou sub-expressão das proteínas de fase aguda (PFA) (CECILIANI et al., 2012). Essas podem ser utilizadas para avaliar a resposta do sistema imune inato em casos de inflamação, infecção ou trauma (CECILIANI et al., 2012; MURATA & MIYAMOTO, 2000).

Entre as proteínas de fase aguda de importância em bovinos, podemos destacar a haptoglobina e o fibrinogênio, ambas proteínas de fase aguda positiva , que aumentam sua concentração a resposta inflamatória, enquanto as proteínas de fase aguda negativa, por exemplo a albumina e paraoxonase, diminuem suas concentrações durante a resposta inflamatória. A haptoglobina é uma das primeiras PFA descritas se encontrando em concentrações baixas no plasma de animais saudáveis, considerada assim uma PFA positiva (PANNDORF et al., 1976). Sua elevação ocorre entre 24-48h pós o início do processo inflamatório e as concentrações retornam ao fisiológico de 7 a 10 dias após a resolução do quadro. Essa proteína é caracterizada como uma hemoglobina “limpadora”, que previne a perda de ferro pela formação de um complexo estável com a hemoglobina livre no sangue. Esta função se iguala a um evento bacteriostático pela restrição da disponibilidade de ferro necessária para o crescimento bacteriano e previne a atividade pró-oxidante da hemoglobina (EATON et al., 1982). Seu aumento em ruminantes é observado em pneumonias, mastites, metrites, cetose, fígado gordo e estresse (CECILIANI et al., 2012).

Ao contrário da haptoglobina, a paraoxonase como já mencionado é considerada uma PFA negativa(JAMES & DEAKIN, 2004), sendo sintetizada nos hepatócitos, e após sua liberação no sangue, se liga a lipoproteína de alta densidade (HDL) em associação com a apolipoproteína A1 (MACKNESS, 1998). Associado a apolipoproteína a paraoxonase desempenha um papel de prevenção da oxidação de lipoproteínas (FEINGOLD et al., 1998), como no caso de doenças que são caracterizadas por aumento do estresse oxidativo, como a diabetes mellitus (JURETIĆ et al., 2006). Embora a presença de paraoxonase no soro de ruminantes tenha sido confirmada, o conhecimento sobre a atividade sérica da paraoxonase em medicina veterinária ainda é escassa. Poucos estudos demonstram sua relação com parâmetros lipídicos no período pós-parto de vacas leiteiras (TURK et al., 2004) e com a funcionalidade hepática (BIONAZ et al., 2007).

Vários estudos têm sido realizados para estabelecer possíveis causas e efeito entre o BEN e comprometimento da resposta imune em ruminantes leiteiros durante o periparto. Similar a uma infecção ou trauma, o excesso da mobilização lipídica representa um estímulo prejudicial às células do parênquima hepático e, consequentemente, essas células alteram a produção de PFA, observando-se uma forte relação entre AGNE e HP (r = (0,93) (TÓTHOVÁ et al., 2008). Além deste efeito sobre o fígado, os AGNE podem ter efeito indireto sobre as PFA, através de sua ação nos receptores Toll-Like das células do sistema imune.

Apesar da lipólise ser um mecanismo compensatório esperado durante o BEN, pesquisas recentes tem sugerido considerável variação na mobilização de energia do tecido adiposo, entre vacas de alta aptidão leiteira (CHILLIARD et al., 2000; HAMMON et al., 2009). Tamminga et al. (1997) observou um intervalo entre 8 a 57 Kg de gordura corporal mobilizada, durante as 8 primeiras semanas de lactação, sugerindo que algumas vacas estão em estresse metabólico mais acentuado (HERDT, 2000). Uma das principais ferramentas para avaliar as reservas corporais e a lipomobilização em bovinos é o escore de condição corporal (ECC), que partir da década de 80 (EDMONSON et al., 1989) passou a ser empregado constantemente na pecuária leiteira.

O ECC já foi relacionado com diversos parâmetros; produção de leite, composição do leite, fertilidade, incidência de doenças. A perda de condição corporalem bovinos apresentam efeitos negativos sobre os animais, mas poucos trabalhos refletem seu efeito das mudanças no ECC desde opré-parto, sobre a imunossupressão que é observada durante o periparto (KIM & SUH, 2003). Assim o período de transição representa uma oportunidade para o estudo da resposta de fase aguda, bem como os mecanismos de defesa do sistema imune. Mas além do AGNE é necessário especular se a mudança na condição corpora lno pré-parto reflete na resposta inflamatória do animal, pois esse é um método aceitável, não invasivo, rápido e de baixo custo para estimar a quantidade de reservas corporais em vacas leiteiras (WALTNER et al.,1993).

A relação entre ECC e resistência insulina tipo II, já foi descrita, onde verificou-se que vacas magras desenvolvem resistência a insulina em consequência da desnutrição (HAYIRLI, 2006), enquanto Katamoto et al., (1996) e Holtenius et al. (2003) observaram que vacas gordas tem maior resistência à insulina. Entretanto os estudos não relacionam as mudanças de ECC no pré-parto, e se essa perda de ECC está relacionada com maior perda de ECC durante a lactação, BEN e alteração da resposta de fase aguda.

1. **Hipótese**

A hipótese deste estudo é que mudanças no ECC no pré-parto influenciam a resposta de fase aguda.

1. **Objetivos**

**Objetivo Geral:**

Avaliar a resposta inflamatória no periparto de vacas leiteiras que mudaram a condição corporal no pré-parto.

**Objetivos Específicos:**

* Avaliar em vacas leiteiras leiterias que perderam ou ganharam ECC no pré-parto sobreas concentraçõesde paraoxanase, haptoglobulina, albumina, e sobre o hemograma;
* Avaliar o efeito da mudança de ECC no pré-parto sobre os indicadores metabólicos energético durante o periparto;
* Analisar o efeito da mudança no ECC no pré-parto sobre a resistência a glicose e insulina.

1. **Artigo**

Formatado segundo as normas da revista The Veterinary Jornal (será traduzido para o inglês)

**Influência das variações de condição corporal no pré-parto sobre as proteínas de fase aguda e marcadores do metabolismo energético em vacas leiteiras durante o periparto**

**Resumo**

O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta inflamatória de fase aguda e marcadores do metabolismo energético em vacas leiteiras que ganharam ou perderam condição corporal (ECC) no pré-parto. Foram utilizadas 20 vacas leiteiras da raça Holandês, acompanhadas do dia -21 pré-parto até o dia 30 pós-parto. Estas vacas foram divididas em 2 grupos conforme as mudanças de ECC observada durante o período pré-parto: GEC (n=11) vacas que ganharam ECC, PEC(n=9) vacas que perderam ECC. Foram coletados amostras de sangue nos dias -21, -14, -7 e -3 pré-parto, no dia do parto e nos dias 3, 6, 9, 16, 23 e 30 pós parto para determinação as concetrações de glicose (GLI), ácidos graxos não esterificados (AGNE), insulina (INS), albumina (ALB), paraoxonase (PON), haptoglobina (HP). No dia -20 pré-parto e no dia 9 pós-parto foi realizado teste de tolerância a glicose e insulina (TTGI) nos animais. Semanalmente foi realizado hemograma, pesagem, avaliação ECC. Para produção de leita, foram geradas médias a cada cindo dias, dia 16 ao dia 41. Os animais do GEC tiveram maiores concentrações de PON no pós-parto (P < 0,05) e de albumina no pré (P < 0 ,03) e pós-parto (P < 0,002). No PEC os níveis de HP foram maiores no pré e pós-parto (P < 0,04). A produção leiteira foi superior de 3 kg no grupo GEC (P < 0,03) sendo observada uma média de 27,4 ± 1,09 kg, contra 24,4 ± 0,8 kg do grupo PEC. No hemograma foi observado maior contagem de monócitos no grupo PEC, no pré-parto (P < 0,01) e pós parto (P < 0,03), menor contagem de eritrócitos no pré-parto (P < 0,0002) e maior número (41,6 % PEC vs. 13,7 % GEC) de animais com relação neutrófilo:linfócito > 1, Nas avaliações zootécnicas, , concentração de glicose, AGNE, insulina, e os resultados obtidos pelo TTGI não diferiram (P > 0,05) entre os grupos. Estes resultados demonstraram que a resposta inflamatória de fase aguda e produção leiteira no pós-parto, foi modificada em vacas que perderam condição corporal no pré-parto..

*Palavras Chaves:* Balanço Energético Negativo; Haptoglobina; Paraoxonase; Periparto

**Introdução**

O período de transição em vacas leiteiras, que se estende das três semanas anteriores as três semanas posteriores ao parto é marcado por intensas mudanças metabólicas, endócrinas e nutricionais que representam um momento de estresse (Goff & Horst, 1997). Essas semanas são caracterizadas pelo balanço energético negativo (BEN) (Bobe et al. 2004), que se deve a diminuição pré-parto da ingestão alimentar em 30 % do consumo de matéria seca, associado ao rápido aumento do requerimento de nutrientes para o crescimento fetal, a lactogênese e as marcantes mudanças no estado endócrino em preparação ao parto e a própria lactogênese (Grummer, 1995). Esse desequilíbrio agrava-se após o parto, devido o pico de produção leiteira anteceder o pico de ingestão de matéria seca (IMS) (Ingvartsen & Andersen, 2000). Outro agravante deste momento, é que a seleção genética visando maior produção de leite resultou em mudanças homoeróticas no inicio da lactação, com baixas concentrações de insulina e maior resistência periférica à insulina (Chagas et al. 2009).

Como forma de suprir a demanda energética, os ácidos graxos depositados principalmente no tecido adiposo, são mobilizados, provocando o aumento das concentrações de ácidos graxos não esterificados (AGNE) (Douglas et al. 2007; Herdt, 2000; Ingvartsen & Andersen, 2000) e, consequente, acúmulo de triglicerídeos no fígado (Bobe et al. 2004; Overton & Waldron, 2004). Essa intensa mobilização de lipídios durante o período de transição em vacas leiteiras é associada com o aumento da suscetibilidade de doenças, observando-se que 90% das doenças metabólicas em bovinos leiteiros ocorrem durante os 4 primeiros de lactação (Ingvartsen, 2006). Neste cenário, evidências sugerem que a imunossupressão do periparto pode ser em parte explicada pelo balanço energético negativo e fenômenos correlatos (mobilização lipídica e síndrome do fígado gordo), que atuam como importantes mecanismos na alteração do funcionamento hepático (Bertoni et al. 2008). Assim o fígado tem um papel de destaque no metabolismo, pois é o órgão que centraliza os metabólitos e determina a síntese dos mesmos (Baumann & Gauldie, 1994), entre esse as proteínas de fase aguda (PFA), sendo elas positivas (PFA+); haptoglobina (HP), ou negativas (PFA -); a paraoxonase (PON) e albumina (ALB) (Bionaz et al. 2007).

Apesar da lipólise ser uma resposta previsível do BEN e apresentar efeitos diretos no fígado e indiretos nos leucócitos (Lacetera et al. 2004), pesquisas recentes tem sugerido considerável variação, entre as vacas de alta aptidão leiteira, na mobilização de energia do tecido adiposo (Chilliard et al. 2000; Hammon et al. 2009). Tamminga et al. (1997) observaram grande diferença (8 a 57kg de gordura corporal) na mobilização lipídica durante as 8 primeiras semanas de lactação. Essa diferença pode ser observada através do escore de condição corporal (ECC), que é uma forma prática de mensurar as reservas energéticas e é amplamente utilizada para avaliar o estado nutricional do animal (Hady et al. 1994; Wildman et al. 1982). Markusfeld et al. (1997) demonstraram que a perda de condição corporal durante o período seco aumentou a incidência de doenças pós-parto. Domecq et al. (1997) e Gillund et al. (2001) relataram efeitos negativos da perda de condição corporal durante a lactação inicial sobre o desempenho reprodutivo e a ocorrência de cetose, enquanto outro estudo não demostrarefeitos (Rueg g & Milton, 1995). Porém não há relatos do efeito direto da perda de ECC no pré-parto sobre a resposta de fase aguda. Com base nesses questionamentos, o objetivo deste trabalho foi avaliar as proteínas de fase aguda, marcadores energéticos e resistência a insulina, no periparto de vacas que ganharam ou perderam condição corporal no período pré-parto.

**Materiais e Métodos**

*Delineamento experimental*

Para este estudo 35 vacas da raça Holandês, foram selecionadas para o experimento, por número de parto superior a 3 e média da produção leiteira da ultima lactação (7891 ±1184/kg/305) e acompanhados do dia -21 pré-parto ao dia 30 pós-parto. Todos os animais foram alocados sob as mesmas condições ambientais e de manejo nutricional em uma fazenda comercial no sul do Brasil (32 º 16 'S, 52 º 32' O, elevação de 7 metros). As enfermidades(hipocalcemia, mastite, retenção de placenta), foram monitoradas, sendo que 20 vacas não apresentaram sinais clínicos e permaneceram no experimento.

As vacas foram ordenhadas duas vezes por dia (03:00 e 15:00 h) e a produção de leite foi registrada diariamente (AlproTM, Delaval ®, Kansas City, EUA) e gerando médias a cada 5 dias, do dia 16 ao dia 41. O escore de condição corporal (ECC) foi atribuído semanalmente por três indivíduos de forma independente, em uma escala de 1 a 5 de acordo com Wildman et al. (1982). O peso corporal foi medido semanalmente em uma plataforma de pesagem (Eziwweigh5 - Tru-Test®, Farm Tech Group, Ljutomer, Eslovénia).

Os animais foram agrupados em dois grupos em base na mudança de escore de condição corporal observada da semana -3 para a semana -1 no pré-parto. Sendo assim, grupo que Perdeu EC (PEC n=9), apresentando uma diminuição de 0,8 pontos e o grupo que Ganhou ECC (GEC n=11), no pré-parto, teve um ganho de 0,25 pontos na escala de ECC.

*Amostragem de sangue e análises*

Amostras de sangue foram coletadas no pré-parto nos dias -21, -14, -7, -3, no dia do parto e nos dias 3, 6, 9, 16, 23 e 30. As amostras foram obtidas após a ordenha por punção do complexo coccígeno, através do sistema vacutainer em três tubos: um contendo EDTA e fluoreto de potássio (BD Vacutainer ® - Franklin Lakes, NJ, EUA), um sem anticoagulante (BD Vacutainer ® - Franklin Lakes, NJ, EUA), e um somente com EDTA (BD Vacutainer ® - Franklin Lakes, NJ, EUA).

A contagem total de leucócitos, hemácias, volume globular (VG), hemoglobina foram realizados em contador automático Poch-100iVDiff (Sysmex®, São Paulo, Brasil). Os esfregaços sanguíneos foram corados com o Romanowky Panótico Rápido (LaborClin®, Paraná, Brasil), e através da visualização em microscópio ótico foi realizada a identificação de 200 células, a fim de obter o diferencial celular (George et al. 2010).

A concentração plasmática de AGNE foi obtida por kit comercial (Wako NEFA-HR, Wako Chemicals EUA ®, Richmond, EUA) e realizada de acordo com o micrométodo descrito por Ballou et al. (2009) utilizando leitor de placa (Thermo Plate ® TP-Reader, São Paulo, Brasil). A concentração de INS foi realizada através de kit comerial de imuno ensaio tipo sanduíche DSL-10-1600 ACTIVE Insulin (Diagnostics Systems Labora-tories Inc., Webster, TX, USA; (Lee et al. 2002). A atividade da PON foi determinada através de técnica enzimática utilizando kit comercial (Zeptometrix, Buffalo, NY, EUA) e a absorbância foi obtida através de espectrofotometria (T80 UV / VIS Spectrometer PG Instruments Ltd), acoplado ao sistema de aquecimento (PTC-2 Temperatura Peltier controlador) e software (software UVWin80 v5.0.5). A concentração de HP foi analisada pela técnica colorimétrica descrito por (Jones & Mould, 1984) e a absorbância foi obtida em leitor de placa (Thermo Plate ® TP-Reader, São Paulo, Brasil). As concentrações de ALB e GLI foram mensuradas colorimetricamente usando kits comerciais (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brasil) (Tabeleão et al. 2008). Os coeficientes intra e inter-ensaio de variação (CV) para AGNE, PON, HP, INS foram menores que 8%, e para ALB e GLI foram menores que 15%.

*Teste de tolerância a glicose e insulina*

Foram realizados testes de tolerância a glicose e insulina (TTGI) nos dias -20 pré-parto e 9 pós-parto. Os TTGIs constavam da cateterização da veia jugular e da infusão de glicose 50% (Glicose 50%®, Laboratório Prado S/A, Curitiba, PR, BR), na dose de 500 mg/kg de peso vivo. Previamente a infusão de glicose era realizada duas coletas sangue para caracterizar a glicemia basal desses animais (-5 e 0 minutos pré infusão- 0A). Imediatamente após a infusão de glicose era coletada uma amostra de sangue, sendo nomeada como coleta 0, pós infusão, e coletas seguintes foram realizadas nos minutos 15, 30, 60, 65, 70, 75, 90, 120, 150 e 180 posterior a infusão, para determinação da concentração sanguínea de glicose e insulina. Aos 60 minutos foi administrado uma dose de insulina na concentração de 0,1 UI/kg (Novolin® - Novo Nordisk A/S, Araucária PR, BR). As análises de glicose e insulina foram realizadas conforme descrito na sessão amostragem de sangue e análises.

Durante o teste, foram calculados os valores da glicose basal, redução da insulina por estímulo da glicose (RESG), área sob a curva até 60 e 180 minutos (GLI. ASC60’, GLI. ASC180’), meia vida até 60 e 180 minutos(T½ ASC60, T½ ASC180), a taxa de metabolização (CR) da Glicose até 60 e 180 minutos, foram calculados conforme trabalho de Kerestes et al. (2009) seguintes formulas:

*Gli CR = [(glicose T5’–glicose T60’)/(T60’-T5’)]×100 = % min;*

*T½= (0,693/CR)×100 = min*

RESG *(%) = [(glucose t0 - glucose t30)/glucose t0]×100*

*ASC =* *trapézio formado entre duas coletas subseqüentes (Valor Coleta 1 – Média das duas coletas basais + Valor Coleta 2 – Média das duas coletas basais)\*Intervalo entre coletas/2).*

Para os valores de insulina foram gerados os seguintes parâmetros: pico de insulina, incremento de insulina (pico de insulina - insulina basal), a ASC do tempo 0 a 60’ e do 60’ ao 150’,igual à formula anterior.

*Análise Estatística*

As analises estatísticas foram realizadas com o programa SAS SAS ® versão 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA, 2004). As concentrações plasmáticas dos metabolitos (GLI, INS, HP, PON, ALB e AGNE), hemograma (eritrócitos, hematócrito, hemoglobina, leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, monócitos, e relação N:L, os dados para bastonetes e basófilos não foram analisas devido a baixa número encontrado), peso vivo e ECC pré-parto, foram avaliados por medidas repetidas usando o procedimento MIXED (Weber et al., 2013), avaliando o efeito de grupo, tempo (dias), e as suas interações. Para a relação N:L, também foi utilizado o teste chi-quare, sendo os dados categorizados qualitativamente como valores >1 = 0 e valores <1=1. Os valores gerados para os TTGI foram analisados através de analise de variância one-way. Foram consideradas valoras com P < 0,05. O modelo estatístico e as análises dos dados foram feitos separadamente para pré-parto e pós-parto.

**Resultados**

Os animais do grupo GEC tiveram na semana -3 (-21 dias para o parto) 3,2 ± 0,2 de ECC, e no final do período pré-parto 3,44 ± 0,2 de ECC, já os animais do grupo PEC, na semana -3 apresentaram 3,7 ± 0,1 de ECC e na última semana pré-parto 3,0 ± 0,1 de ECC. Assim o grupo GEC apresentou uma média de ganho de 0,25 pontos de ECC, já o grupo que PEC teve uma média de perda de 0,8 de ECC, ambos os grupos sendo diferentes (P < 0,01). No pré-parto observamos um efeito de semanas (P = 0,07) no ECC, com valor menor na semana que antecede ao parto que na -3 (Semana -1: 3,2 ± 0,1 vs. Semana -3: 3,4 ± 0,1). No pós-parto foi observado efeito de grupo (P < 0,02), tendo o grupo GEC médias maiores (GEC 2,8 ± 0,05 vs. PEC 2,6 ± 0,04 de ECC) (Figura 1, a). Para o peso vivo somente foi observado tendência (P = 0,09) entre os grupos no pós-parto, sendo a média maior no GEC (GEC 566 ± 18 vs. PEC 610 ± 18 kg) (Figura 1, b).

Para a HP no pré-parto, houve efeito de grupo (P < 0,004), com concentrações maiores para o grupo PEC (PEC 0,53 ± 0,1 vs. GEC 0,2 ± 0,08 g/L). No pós-parto o efeito de grupo se manteve (P < 0,004) (PEC 0,9 ± 0,1 vs. GEC 0,57 ± 0,1 g/L). O pico de HP ocorreu em dias diferentes nos grupo, no GEC no terceiro dia pós-parto e no que grupo PEC no sexto dia pós-parto (Figura 2, c).

A PON não apresentou diferenças (P > 0,05) no pré-parto, porém no pós-parto foi observado efeito no grupo (P < 0,05), com valores maiores para o GEC (GEC 112,6 ± 9,8 vs. PEC 71,3 ±15,1 KU/L), e dia (P < 0,01), onde a coleta do dia do parto (Dia 0) apresentou valores maiores que a coleta do dia 6, e as coletas do dia 3, 6 e 9 foram diferentes da coleta do dia 23 e 30, com maiores concentrações nas últimas coletas (Figura 2, d).

A ALB apresentou diferença no pré-parto (P < 0,03) e pós-parto (P < 0,002) entre os grupos. No pré-parto a média do grupo GEC foi de 2,6 ± 0,05 vs. PEC 2,4 ± 0,06 g/dL. No pós-parto, a diferença entre os grupos aumentou (GEC 2,6 ± 0,04 vs. PEC 2,2 ± 0,04 g/dL) (Figura 2, b).

A média da produção leiteira, a cada 5 dias, esta representada na Figura 3. O grupo GEC apresentou aumento de 3 litros (P < 0,03) na produção do dia 16 até o dia 41 pós-parto, em comparação ao grupo PEC (GEC 27,2 ± 1,09 vs. PEC 24,2 ± 0,8 litros).

Não foram observadas diferenças nos marcadores energéticos GLI, AGNE e INS tanto pré e pós-parto (P > 0,05) entre os grupos. Para os AGNE no pré-parto, foi observado efeito de dia (P < 0,01) (Figura 2, a), sendo a maior concentração no dia 3 pré-parto. No pós-parto, o efeito do dia se manteve (P < 0,001), sendo que as coleta dos dias 0, 3, 6, e 9 foram diferentes das coletas dos dias 16, 23 e 30, com maior concentrações no dia 9 (0,84 mmo/L) e menor no dia 30 (0,29 mmol/L). A insulina no pré-parto apresentou efeito do dia (P < 0,05), com menor concentração no dia -3 pré-parto (dia -3: 11,34 ± 2,1 µU/mL; dia -21: 17,7 ± 2,1 µU/mL ), e no pós parto (P < 0,05) as coletas dos dias 0 e 6 foram diferentes do dia 23 pós parto.

No hemograma, somente foi observado efeito do grupo para a contagem de eritrócitos no pré-parto, sendo superior o número de células no grupo GEC (6,2 ± 0,1 vs. PEC 5,6 ± 0,1 x106/mL), e para a contagem de monócitos no pré-parto (P < 0,05) e no pós-parto (P < 0,03), com maior número de células no grupo PEC. Os dados obtidos para contagem total de eritrócitos, leucócitos, volume celular, hemoglobina, e para o diferencial leucocitário (neutrófilo, linfócitos, monócitos, eosinófilo) encontram-se resumindo na Tabela 2. Para a relação N:L, quando avaliada qualitativamente o grupo PEC apresentou 41,6% (10/24) vs. GEC 13,7% (4/29), animais com relação N:L > 1 no pré-parto (P < 0,03), , e no pós-parto (P < 0,02) o grupo PEC apresentou 37% (10/24) vs. GEC 13% (4/29)

Os dados gerados partir do TTGI (Glicose Basal, ISBGR, Gli. ASC60’, T½ ASC60’, Clear rate ASC60’, Gli. ASC180’, T½ ASC180’, Clear rate ASC180’, insulina basal, pico de insulina, incremento de nsulina, Ins. ASC T60’, Ins. ASC T150’) não apresentaram diferenças (P > 0,05) entre grupo e as médias estão apresentado na Tabela 3.

**Discussão**

Neste trabalho a redução da PON e aumento concomitante de HP do dia -3 pré-parto ao dia +9 pós-parto, concorda com os achados de Bertoni et al. (2008), porém no grupo PEC esta diferença é intensificada, com um queda maior na concentração de PON no pós parto e um pico maior de HP. O que se tem relatos é a relação entre o BEN e a resposta de fase aguda, onde quanto mais intenso o BEN, maior a síntese de citocinas pró-inflamatórias (Johnson & Finck 2001), porém não há relatos da relação entre ECC e PFA.

Neste estudo, o grupo PEC apresentou menor ECC no pós-parto, em comparação com o grupo GEC que manteve uma queda gradual no pós parto. Esse dado, associado à albumina demostra um déficit de energia que vem desde o período pré-parto, no grupo PEC. A recuperação mais lenta das concentrações de ALB e PON no grupo PEC sugerem uma alteração no metabolismo hepático durante o pós-parto recente, que pode ter sido relacionada a um maior comprometimento deste órgão. Como exposto no trabalho de Kim & Suh (2003), em que o grupo com intensa queda do ECC apresentou e alterado os parâmetros metabólicos no pós-parto.

Bossaert et al. (2012), relacionou a atividadede PON com a funcionalidade hepática, sendo que o grupo com menor funcionalidade teve menores níveis no dia 8, o que é semelhante a resultado para o grupo PEC deste estudo, que teve menor concentração no dia 9. As evidências demostram que a síntese de PON é afetada por várias condições fisiopatológicas em bovinos (por exemplo, graves doenças, lipopolissácarideos-LPS, ou citocinas pró-inflamatórias). Porém, a relação que observamos entre ECC pré-parto com a atividade de PON no pós-parto, sugere que o metabolismo desta proteína pode ser afetado de forma mais ampla. No dados de Bionaz et al. (2007) não foi observado diferença para o ECC no pós-parto de animais que tiveram altas concentrações de PON no pós-parto.

Aumento das concentrações de HP próximo ao parto é justificado pela intensificação do BEN e aumento das concentrações de AGNE (Trevisi et al. 2010; Crawford et al. 2005). Nossos dados demonstram uma maior concentração de HPjá no pré-paro no grupo PEC, sugerindo sinais de inflamação e comprometimento da função hepática nestes animais, como demonstrado por Yoshino et al. (1992) e Ametaj et al. (2005), em vacas com fígado gordo. Essa diferença entre os dois grupos é intensificada no pós-parto neste estudo, demostrando maior comprometimento do funcionamento hepático e maior desafio imune aos animais do grupo PEC.

A ALB é considerada uma proteína de fase aguda, tendo sua produção no fígado (Ceciliani et al. 2012), diminuindo durante a inflamação (Murata et al. 2004), e sendo indicativa do *status* nutricional e energético em ruminantes (Tabeleão et al. 2008). Nossos dados demonstram diferenças ainda no pré-parto, podendo estar relacionada com comprometimento da função hepática (Trevisi et al. 2010), e a uma menor ingestão de matéria seca no grupo PEC, que além de intensificar o BEN resulta também em maiores concetração de citocinas pró-inflamatórias circulantes, agindo negativamente no fígado (Finck & Johnson, 2000).

Os dados do AGNE não diferiram ente os grupos, de acordo com o esperado, pois no trabalho de Vizcarra et. al. (1998) o ECC no momento do parto influenciou as concentrações de AGNE e insulina pós-parto. Entretanto, as diferenças encontradas para esses marcadores entre os dias são semelhantes ao estudo de Pereira et al. 2013, realizado na mesma região do trabalho. Apesar dos grupos terem as mesmas concentrações dede AGNE, a relação AGNE/albumina é maior no grupo PEC. Em humanos uma relação elevada de AGNE/ALB predispõe os indivíduos a disfunção endoteliais e doenças como pré-eclâmpsia (Endresen et al. 1992) e diabetes tipo 2 (Cnop et. al. 2001). As consequências fisiológicas da relação AGNE/ALB em bovinos precisam ser melhores esclarecidas, contudo nossos dados sugerem que o AGNE apresentaram um efeito negativo mais nocivo quanto as concentrações de albumina estão diminuídas, sendo assim esse efeito mais grave no grupo PEC.

Os animais do grupo GEC, apresentam uma média de 3 kg de leite/dia a mais que o que PEC, o que se assemelha com o trabalho de Kim & Suh (2003) na qul vacas que perderam maior que 1 ponto no ECC no pré-parto tiveram menor produção de leite comparado a vacas que perderam menos de 1 ponto de ECC, os autores sugerem um maior comprometimento hepático nos animais com maior perda de ECC. Os dados obtidos com ECC e produção de leite são bastante contraditórios. Alguns trabalhos não encontram efeito de ECC ao parto, na produção (Rennó et al. 2006), enquanto outros verificaram que o ECC influenciou a produção de leite aos 90 dias de lactação, sendo as maiores produções de leite observadas em vacas que apresentaram o ECC ao parto entre 3,0 e 4,0 (Waltner et al. 1993). Para Melendez et al. (2007) vacas com maior ECC ao parto tendem a apresentar maior produção de leite em função da grande contribuição das reservas corporais no fornecimento de nutrientes para a síntese de leite e de seus componentes. No trabalho de Bionaz et al. (2007) vacas que apresentaram maiores concentrações de PON no pós-parto, não diferiram na produção de leite e no ECC, discordando de nossos dados.

No hemograma a diferença observada na contagem de os monócitos entre os grupos é um indicativo que grupo PEC esta em um processo inflamatório crônico, pois estas células são mediadores da imunidade inata, agindo através da fagocitose e secreção de citocinas pró-inflamatórias durante uma resposta inflamatória (Sordillo et al. 1995). O’Boyle et al. (2012) observaram um aumento na população de monócitos e de macrófagos no sangue e tecidos de vacas durante o período de transição, o que contribuiu para a incidência de doenças neste período gravidade de doenças, diante disso os animais do grupo PEC apresentam maior chance de desenvolverem enfermidades. Esse fato é reforçado pelo maior número de animais com relação N:L > 1 neste grupo (PEC) reforçando a informação anterior, pois quando esta relação é maior que 1, é considerada sensível indicador de inflamação em ruminantes (George et al. 2010).

A resistência à insulina está relacionada a vários fatores em bovinos, destaca-se o maior mérito genético e maior potencial de produção de leite (Chagas et al. 2009; Hammon et al. 2009b). Oikawa & Oetzel (2006) reportaram que vacas gordas que perderam ECC rapidamente no pós-parto, apresentam maior resistência a insulina, que vacas com adequado ECC. Porém, não observamos diferenças entre animais que ganharam ou perderam escore de condição corporal no pré-parto, devido a diferença não ser tão intensa quando por Oikawa & Oetzel (2006).

Esses resultados reforçam a importância do manejo adequando do ECC no pré-parto, para isso, várias estratégias nutricionais podem ser utilizadas na prevenção da queda do ECC. Almejando que esses animais não percam condição corporal no pré-parto, refletindo em um BEN menos intenso, com menores alterações das proteínas de fase aguda e menor probabilidade de desenvolverem doenças.

**Conclusão**

A perda de de condição corporal no pré-parto alterou o padrão das proteínas de fase aguda no pós-parto, observando-se também menor produção leiteira, apesar dos níveis de AGNE não diferirem entre os grupos.

**Agradecimentos**

Os autores agradecem a Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro, a Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade da realização do mestrado, a Granja 4 Irmãos S/A por ceder as vacas e as instalações, e a todos os integrantes do Núcleo de Pesquisa Ensino e Extensão em Pecuária/UFPel – Brasil.

**Referências**

Ametaj, B.N., Bradford, B.J., Bobe, G., Nafikov, R.A., Lu, Y., Young, J.W., Beitz, D.C. 2005. Strong relationships between mediators of the acute phase response and fatty liver in dairy cows. Canadian Journal of Animal Science, 85(2), 165–175.

Ballou, M.A., Gomes, R. C., Juchem, S. O., DePeters, E. J. 2009. Effects of dietary supplemental fish oil during the peripartum period on blood metabolites and hepatic fatty acid compositions and total triacylglycerol concentrations of multiparous Holstein cows. Journal of Dairy Science, 92(2), 657–69.

Baumann, H., Gauldie, J. (1994). The acute phase response. Immunology Today, 15(2), 74–80.

Bertoni, G., Trevisi, E., Han, X., Bionaz, M. 2008. Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows. Journal of Dairy Science, 91(9), 3300–10.

Bionaz, M., Trevisi, E., Calamari, L., Librandi, F., Ferrari, A., Bertoni, G. 2007. Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. Journal of Dairy Science, 90(4), 1740–50.

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(10), 3105–3124.

Bossaert, P., Trevisi, E., Opsomer, G., Bertoni, G., De Vliegher, S., Leroy, J L.M.R. 2012. The association between indicators of inflammation and liver variables during the transition period in high-yielding dairy cows: an observational study. Veterinary Journal ,192(2), 222–5.

Ceciliani, F., Ceron, J.J., Eckersall, P.D., Sauerwein, H. 2012. Acute phase proteins in ruminants. Journal of Proteomics, 75(14), 4207–31.

Chagas, L.M., Lucy, M.C., Back, P.J., Blache, D., Lee, J.M., Gore, P. J. S., Sheahan, A.J., et al. 2009. Insulin resistance in divergent strains of Holstein-Friesian dairy cows offered fresh pasture and increasing amounts of concentrate in early lactation. Journal of Dairy Science, 92(1), 216–22.

Chilliard, Y., Ferlay, A., Faulconnier, Y., Bonnet, M., Rouel, J., Bocquier, F. 2000. Adipose tissue metabolism and its role in adaptations to undernutrition in ruminants. The Proceedings of the Nutrition Society, 59(1), 127–34.

Cnop, M., Hannaert, J.C., Hoorens, A., Eizirik, D.L., Pipeleers, D.G. 2001. Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation. Diabetes, 50(8), 1771–7.

Crawford, R.G., Leslie, K.E., Bagg, R., Dick, C.P., Duffield, T.F. 2005. The impact of controlled release capsules of monensin on postcalving haptoglobin concentrations in dairy cattle. Canadian Journal of Veterinary Research, 69(3), 208–14.

Domecq, J.J., Skidmore, A.L., Lloyd, J.W., Kaneene, J.B. 1997. Relationship between body condition scores and conception at first artificial insemination in a large dairy herd of high yielding Holstein cows. Journal of Dairy Science, 80(1), 113–20.

Douglas, G.N., Rehage, J., Beaulieu, A.D., Bahaa, A.O., Drackley, J.K. 2007. Prepartum nutrition alters fatty acid composition in plasma, adipose tissue, and liver lipids of periparturient dairy cows. Journal of Dairy Science, 90(6), 2941–59.

Endresen, M.J., Lorentzen, B., Henriksen, T. 1992. Increased lipolytic activity and high ratio of free fatty acids to albumin in sera from women with preeclampsia leads to triglyceride accumulation in cultured endothelial cells. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 167(2), 440–7.

Finck, B.N., Johnson, R.W. 2000. Tumor necrosis factor-alpha regulates secretion of the adipocyte-derived cytokine, leptin. Microscopy Research and Technique, 50(3), 209–15.

George, J.W., Snipes, J., Lane, V.M. 2010. Comparison of bovine hematology reference intervals from 1957 to 2006. Veterinary Clinical Pathology, 39(2), 138–48.

Gillund, P., Reksen, O., Gröhn, Y.T., & Karlberg, K. 2001. Body condition related to ketosis and reproductive performance in Norwegian dairy cows. Journal of Dairy Science, 84(6), 1390–6.

Goff, J.P., Horst, R.L. 1997. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. Journal of Dairy Science, 80(7), 1260–8.

Grummer, R.R. 1995. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. Journal of Dairy Science, 73(9), 2820–33.

Hady, P.J., Domecq, J.J., Kaneene, J. B. 1994. Frequency and precision of body condition scoring in dairy cattle. Journal of Dairy Science, 77(6), 1543–7.

Hammon, H.M., Stürmer, G., Schneider, F., Tuchscherer, A., Blum, H., Engelhard, T., Genzel, A., et al. 2009. Performance and metabolic and endocrine changes with emphasis on glucose metabolism in high-yielding dairy cows with high and low fat content in liver after calving. Journal of Dairy Science, 92(4), 1554–66.

Herdt, T.H. 2000. Ruminant adaptation to negative energy balance. Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. The Veterinary clinics of North America. Food Animal Practice, 16(2), 215–30.

Ingvartsen, K. L, Andersen, J.B. 2000. Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals. Journal of Dairy Science, 83(7), 1573–97.

Ingvartsen, K.L. 2006. Feeding- and management-related diseases in the transition cow. Animal Feed Science and Technology, 126(3-4), 175–213.

Jones, G.E., Mould, D. L. 1984. Adaptation of the guaiacol (peroxidase) test for haptoglobins to a microtitration plate system. Research in Veterinary Science, 37(1), 87–92.

Kerestes, M., Faigl, V., Kulcsár, M., Balogh, O., Földi, J., Fébel, H., Chilliard, Y., et al. 2009. Periparturient insulin secretion and whole-body insulin responsiveness in dairy cows showing various forms of ketone pattern with or without puerperal metritis. Domestic Animal Endocrinology, 37(4), 250–61.

Kim, I.H., Suh, G.H. 2003. 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, 60(8), 1445–1456.

Lacetera, N., Scalia, D., Franci, O., Bernabucci, U., Ronchi, B., Nardone, A. 2004. Short communication: effects of nonesterified fatty acids on lymphocyte function in dairy heifers. Journal of Dairy Science, 87(4), 1012–4.

Lee, S. H., Engle, T. E., Hossner, K. L. 2002. Effects of dietary copper on the expression of lipogenic genes and metabolic hormones in steers. Journal of Animal Science, 80(7), 1999–2005.

Markusfeld, O., Galon, N., Ezra, E. 1997. Body condition score, health, yield and fertility in dairy cows. Veterinary Record, 141(3), 67–72.

Melendez, P., Goff, J.P., Risco, C.A., Archbald, L.F., Littell, R., Donovan, G. A. 2007. Pre-partum monensin supplementation improves body reserves at calving and milk yield in Holstein cows dried-off with low body condition score. Research in Veterinary Science, 82(3), 349–57.

Murata, H., Shimada, N., Yoshioka, M. 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. Veterinary Journal, 168(1), 28–40.

Oikawa, S., Oetzel, G. R. 2006. Decreased insulin response in dairy cows following a four-day fast to induce hepatic lipidosis. Journal of Dairy Science, 89(8), 2999–3005.

Overton, T. R., Waldron, M. R. 2004. Nutritional Management of Transition Dairy Cows: Strategies to Optimize Metabolic Health. Journal of Dairy Science, 87, E105–E119.

O’Boyle, N.J., Contreras, G.A., Mattmiller, S. A., Sordillo, L. M. 2012. Changes in glucose transporter expression in monocytes of periparturient dairy cows. Journal of Dairy Science, 95(10), 5709–19.

Pereira, R.A., Silveira, P.A.S., Montagner, P., Schneider, A., Schmitt, E., Rabassa, V.R., Pfeifer, L.F.M., et al. 2013. Effect of butaphosphan and cyanocobalamin on postpartum metabolism and milk production in dairy cows. Animal, 1–5.

Rennó, F.P., Pereira, J. C., Santos, A.D.F., Alves, N.G., Torres, C.A.A., Rennó, L.N., Balbinot, P.Z. 2006. Efeito da condição corporal ao parto sobre a produção e composição do leite, a curva de lactação e a mobilização de reservas corporais em vacas da raça Holandesa. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 58(2), 220–233.

Ruegg, P.L., Milton, R.L. 1995. Body condition scores of Holstein cows on Prince Edward Island, Canada: relationships with yield, reproductive performance, and disease. Journal of Dairy Science, 78(3), 552–64.

Sordillo, L.M., Pighetti, G.M., Davis, M.R. 1995. Enhanced production of bovine tumor necrosis factor-alpha during the periparturient period. Veterinary Immunology and Immunopathology, 49(3), 263–70.

Tabeleão, V.C., Del Pino, F.A.B., Goulart, M.A., Schwegler, E., Moura, S.V. 2008. Influência da monensina e levedura sobre parâmetros ruminais e metabólicos em cordeiros semiconfinados. Acta Scientiarum., 30(2). pg

Tamminga, S., Luteijn, P.A., Meijer, R.G.M. 1997. Changes in composition and energy content of liveweight loss in dairy cows with time after parturition. Livestock Production Science, 52(1), 31–38.

Trevisi, E., Zecconi, A., Bertoni, G., Piccinini, R. 2010. Blood and milk immune and inflammatory profiles in periparturient dairy cows showing a different liver activity index. The Journal of Dairy Research, 77(3), 310–7.

Vizcarra, J.A., Wettemann, R.P., Spitzer, J.C., Morrison, D.G. 1998. Body condition at parturition and postpartum weight gain influence luteal activity and concentrations of glucose, insulin, and nonesterified fatty acids in plasma of primiparous beef cows. Journal of Dairy Science, 76(4), 927–36.

Waltner, S. S., McNamara, J. P., Hillers, J. K. 1993. Relationships of body condition score to production variables in high producing Holstein dairy cattle. Journal of Dairy Science, 76(11), 3410–9.

Weber, C., Hametner, C., Tuchscherer, A., Losand, B., Kanitz, E., Otten, W., Singh, S. P., et al. 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(1), 165–80.

Wildman, E.E., Jones, G. M., Wagner, P.E., Boman, R.L., Troutt, H.F., Lesch, T.N., 1982. A Dairy Cow Body Condition Scoring System and Its Relationship to Selected Production Characteristics. Journal of Dairy Science, 65(3), 495–501.

Yoshino, K., Katoh, N., Takahashi, K., Yuasa, A., 1992. Purification of a protein from serum of cattle with hepatic lipidosis, and identification of the protein as haptoglobin. American Journal of Veterinary Research, 53(6), 951–6.

**Legenda das Figuras**

Fig.1. Escore de condição corporal (a) e peso vivo (b) observada durante o periparto nas vacas que perderam ECC no pré-parto (●) e vacas que ganharam ECC no pré-parto(**○**).

Fig. 2. Concentrações plasmáticas de ácidos graxos não esterificados (mmol/L) (a), albumina (g/dL) (b), haptoglobina (g/dL) (c), paraoxonase (KU/L) (d), durante o periparto, no grupo que perdeu ECC no pré-parto (●) e no grupo que ganhou ECC no pré-parto(**○**).

Fig. 3. Produção de láctea (vaca/kg/dia) do dia 16 ao dia 41 pós-parto, do grupo perdeu ECC no pré-parto (●), e no grupo que ganhou ECC no pré-parto (**○**).Fig. 1.

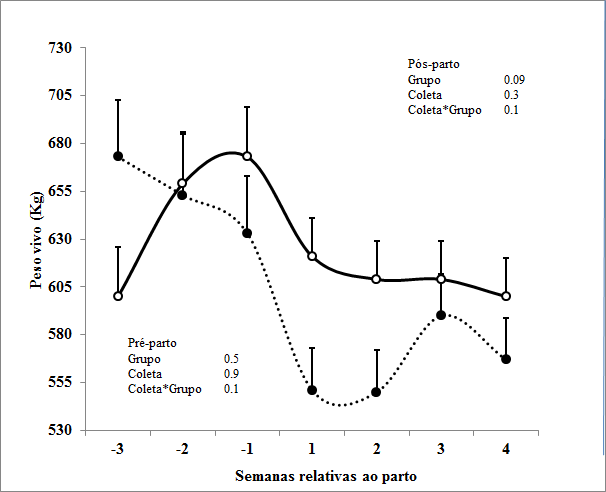
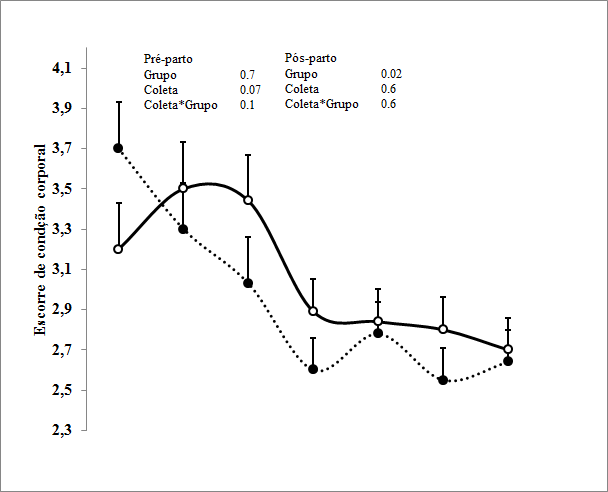
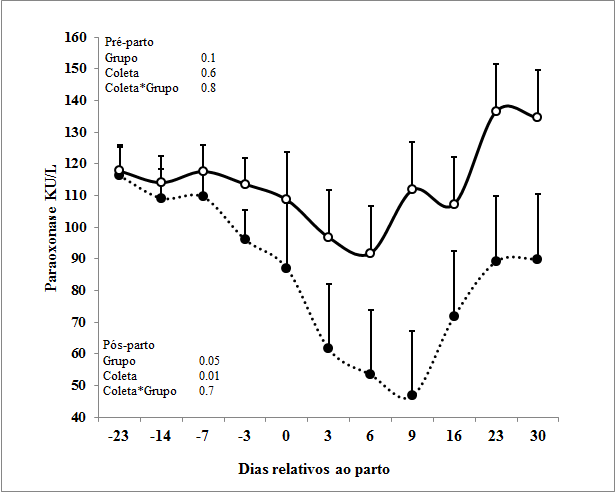
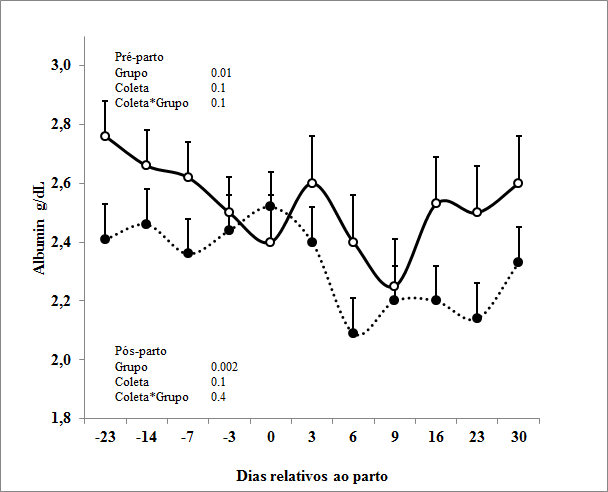
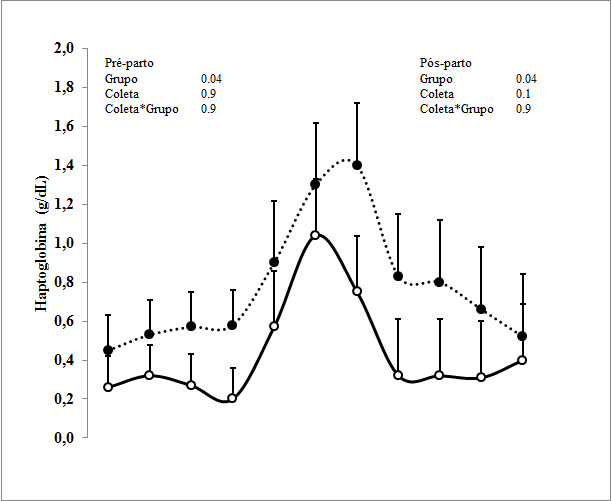
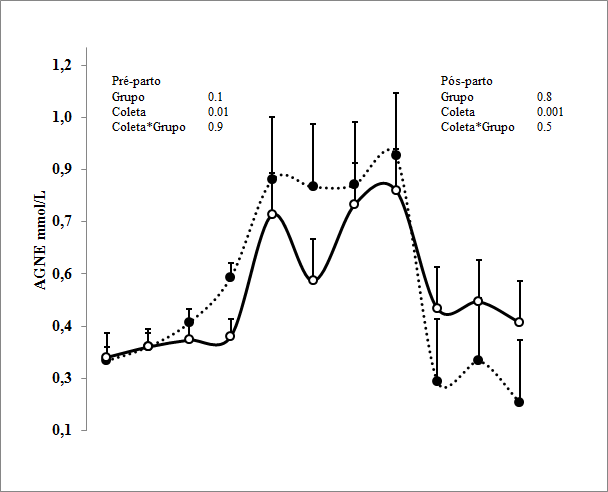


Fig. 2.Fig. 3.

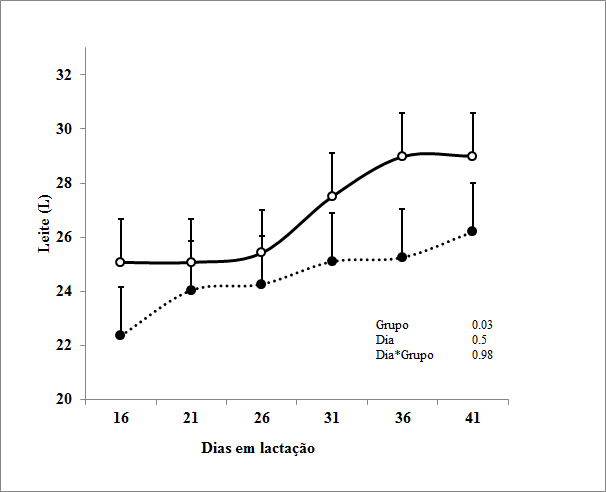


a

b

c

d



**Leites (kg/dia)**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Tabela 1: Composição dos ingredientes da dieta disponível diariamente no pré e pós-parto disponíveis para as vacas durante o experimento. | | | |
| Ingredientes | Pré-parto (kg) | Pós-parto (kg) | |
| Pastagem nativa | À vontade | -- | |
| Sorgo forrageiro | -- | À vontade | |
| Farelo de trigo | 0,50 | 1,50 | |
| Farelo de soja | 1,00 | 2,40 | |
| Farelo de arroz | 0,68 | 2,88 | |
| Milho | 1,05 | 3,00 | |
| Sorgo | 1,05 | 2,13 | |
| Suplemento mineral | 0,40 | 0,11 | |
| Uréia | -- | 0,09 | |
| Bicarbonato de Sódio | -- | 0,19 | |
| Calcário | 0,12 | 0,19 | |
| Cloreto de Sódio | -- | 0,002 | |
|  | | |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Tabela 2: Valores médios e desvio padrão dos elementos constituintes do hemograma durante o pré e pós-parto de vacas que ganharam ECC no pré parto (GEC) e vacas que que perderam ECC no pré-parto(PEC). | | | | | | | | | | |
|  | *Pré-parto* | | | | | *Pós-parto* | | | | |
| Variável | Grupo | | *P* | | | Grupo | | *P* | | |
| GEC | PEC | G | D | G\*D | GEC | PEC | G | D | G\*D |
| Eritrócitos (x106/mL) | 6,28 ± 0,11a | 5,69 ± 0,13b | 0,003 | 0,10 | 0,54 | 7,70 ±1,55 | 5,58 ±1,62 | 0,35 | 0,51 | 0,47 |
| Hemoglobina g/L | 10,29 ± 0,20a | 9,53 ± 0,23b | 0,02 | 0,01 | 0,82 | 9,21 ±0,23 | 9,30± 0,22 | 0,76 | 0,02 | 0,01 |
| Hematócrito % | 29,98 ±0,55 | 26,92 ±0,64 | 0,001 | 0,085 | 0,45 | 26,95 ±0,75 | 26,31± 0,75 | 0,53 | 0,33 | 0,10 |
| Leucócitos (cel/uL) | 13.148± 1.470 | 10.910±1.266 | 0,21 | 0,05 | 0,12 | 11.552 ±1.494 | 10.205 ± 1.640 | 0,55 | 0,55 | 0,69 |
| Neutrófilos (cel/uL) | 4.458 ± 356 | 4.253 ± 476 | 0,73 | 0,37 | 0,48 | 3.917± 559 | 3.314 ±612 | 0,47 | 0,53 | 0,89 |
| Linfócitos (cel/uL) | 6.959 ± 533 | 5.922± 713 | 0,42 | 0,53 | 0,71 | 7.047 ±1.050 | 6.285± 1.152 | 0,63 | 0,33 | 0,71 |
| Eosinófilos (cel/uL) | 470 ± 90 | 360± 120 | 0,47 | 0,08 | 0,90 | 599 ±255 | 273 ±281 | 0,40 | 0,66 | 0,36 |
| Monócitos (cel/uL) | 708 ± 157a | 1121± 210b | 0,01 | 0,80 | 0,40 | 331 ± 103a | 663 ± 93b | 0,03 | 0,58 | 0,15 |
| Rezão N:L | 0,69 ± 0,07 | 0,68 ± 0,09 | 0,93 | 0,07 | 0,63 | 0,55 ± 0,18 | 0,74 ± 0,15 | 0,42 | 0,82 | 0,81 |

G = Grupo, D = Dia, G\*P = Grupo\*Dia; N:L – Neutrófilo:Linfócito, Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística,

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Tabela 3: Valores médios e desvio padrão das variáveis de resposta ao teste de tolerância a glicose e a insulina no pré e pós-parto, de vacas que ganharam ECC (GEC) e perderam ECC no pré-parto (PEC). | | | | | | | | | | | | | |
|  | *Pré-parto* | | | | | | | *Pós-parto* | | | | | |
| Variável | Grupo | | | *P* | | | | Grupo *P* | | | | |
| GEC | PEC | | G | | GEC | | | PEC | | G | | |
| Glicose basal (g/dL) | 75,07 ± 5,71 | | 84,34 ± 7,03 | | 0,3 | | 74,14 ± 8,42 | | | 69,7± 11,10 | | 0,7 | | |
| RESG % | 36,13 ± 3,07 | | 34,19 ± 3,01 | | 0,6 | | 42,13 ± 14,9 | | | 36,4 ±8,1 | | 0,3 | | |
| Gli, ASC60 (g/dl\*min) | 9693 ± 557 | | 8610 ± 690 | | 0,2 | | 7947 ± 314 | | | 7349 ± 281 | | 0,8 | | |
| Clear rate ASC60 (%\*min) | 1,01± 0,11 | | 1,00 ± 0,12 | | 0,9 | | 1,21 ± 0,42 | | | 1,3 ± 0,48 | | 0,9 | | |
| T½ ASC60 mim | 82,36 ± 13,86 | | 73,99 ± 8,38 | | 0,6 | | 60,14 ± 9,09 | | | 58,04 ± 5,31 | | 0,8 | | |
| Gli, ASC T180 (g/dl\*min) | 7.098 ± 516 | | 7.130 ± 748 | | 0,9 | | 5.236 ± 432 | | | 5.165 ± 319 | | 0,9 | | |
| Clear rate ASC180 (%\*min) | 1,52 ± 0,16 | | 1,41 ± 0,15 | | 0,6 | | 1,91 ± 0,24 | | | 1,53 ± 0,14 | | 0,2 | | |
| T½ ASC180( mim) | 50,93 ± 5,18 | | 53,37 ± 6,21 | | 0,7 | | 49,26 ± 13,12 | | | 50,10 ± 6,49 | | 0,9 | | |
| Insulina Basal (µU/mL) | 16,53 ±3,32 | | 17,25± 2,46 | | 0,8 | | 10,75 ± 2,57 | | | 14,15 ± 3,39 | | 0,8 | | |
| Pico de Insulina (µU/mL) | 86,93± 22,92 | | 113,60± 26,32 | | 0,5 | | 144,90 ± 46,64 | | | 140,06 ± 40,79 | | 0,9 | | |
| Incremento de Insulina (µU/mL) | 70,40 ± 23,79 | | 96,36 ± 26,99 | | 0,4 | | 134,15 ± 46,20 | | | 125,91 ± 39,76 | | 0,8 | | |
| Ins, ASC T60 (µU/mL\*min) | 3.975 ± 438 | | 3175 ± 319 | | 0,6 | | 3.974 ± 697 | | | 3.174 ± 600 | | 0,6 | | |
| Ins, ASC T150 (µU/mL\*min) | 8.947 ± 1255 | | 10.272 ± 965 | | 0,4 | | 24.549 ± 3311 | | | 24.520 ± 2468 | | 0,9 | | |

ASC = área sobre a curva

1. **Conclusão Geral**

Os resultados demostram que o uso do ECC como forma para avaliar a resposta de fase aguda durante o período pós-parto de vacas leiteiras foi eficaz. Também que os animais que apresentaram perda do ECC no pré-parto tem uma relação direta com a imunossupressão do periparto, devido as alterações da PFA, monócitos e maior N:L, e menor produção de leite, em comparação com o grupo que ganho ECC no pré-parto.

Entretanto, há a necessidade de estudos mais minuciosos que possam, de fato avaliar a gravidade da perda do ECC sobre a saúde hepática dos animais, pois apesar da alterações nas PFA, os níveis de AGNE e os dados de obtido pelo TTGI não quanto a perda o ganho de ECC no pré-parto.

Acima de tudo nossos dados ressaltam a importância de um manejo adequado para a manutenção do ECC, já no pré-parto, a fim de amenizar alterações indesejáveis no pós-parto.

1. **Referências Bibliográficas**

BAUMANN, H. & GAULDIE, J. The acute phase response. **Immunology today**, *15*(2), 74–80, 1994.

BERTONI, G.; TREVISI, E.; HAN, X. & BIONAZ, M. Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, *91*(9), 3300–10, 2008.

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**, *90*(4), 1740–50, 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**, *87*(10), 3105–3124, 2004.

BUTTERFIELD, T.A.; BEST, T.M. & MERRICK, M.A. The dual roles of neutrophils and macrophages in inflammation: a critical balance between tissue damage and repair. **Journal of athletic training**, *41*(4), 457–65, 2000.

CECILIANI, F.; CERON, J.J.; ECKERSALL, P.D. & SAUERWEIN, H. Acute phase proteins in ruminants. **Journal of proteomics**, *75*(14), 4207–31, 2012.

CHAGAS, L.M.; LUCY, M.C.; BACK, P.J.; BLACHE, D.; LEE, J.M.; GORE, P.J.S.; SHEAHAN, A.J.; ET AL. Insulin resistance in divergent strains of Holstein-Friesian dairy cows offered fresh pasture and increasing amounts of concentrate in early lactation. **Journal of Dairy Science**, *92*(1), 216–22, 2009.

CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; FAULCONNIER, Y.; BONNET, M.; ROUEL, J. & BOCQUIER, F. Adipose tissue metabolism and its role in adaptations to undernutrition in ruminants. **The Proceedings of the Nutrition Society,** *59*(1), 127–34, 2000.

DOUGLAS, G.N.; REHAGE, J.; BEAULIEU, A.D.; BAHAA, A.O. & DRACKLEY, J.K. Prepartum nutrition alters fatty acid composition in plasma, adipose tissue, and liver lipids of periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, *90*(6), 2941–59, 2007.

EATON, J.W.; BRANDT, P.; MAHONEY, J.R. & LEE, J.T. Haptoglobin: a natural bacteriostat. **Science** *(New York, N.Y.)*, *215*(4533), 691–3, 1982.

EDMONSON, A.J.; LEAN, I.J.; WEAVER, L.D.; FARVER, T. & WEBSTER, G. A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows. **Journal of Dairy Science,** *72*(1), 68–78, 1989.

FEINGOLD, K.R.; MEMON, R.A.; MOSER, A.H. & GRUNFELD, C. Paraoxonase activity in the serum and hepatic mRNA levels decrease during the acute phase response. **Atherosclerosis**, *139*(2), 307–15, 1998.

GRUMMER, R.R. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. **Journal of Dairy Science**, *73*(9), 2820–33, 1995.

HAMMON, H.M.; STÜRMER, G.; SCHNEIDER, F.; TUCHSCHERER, A.; BLUM, H.; ENGELHARD, T.; GENZEL, A.; ET AL. Performance and metabolic and endocrine changes with emphasis on glucose metabolism in high-yielding dairy cows with high and low fat content in liver after calving. **Journal of Dairy Science**, *92*(4), 1554–66, 2009.

HAYIRLI, A. The role of exogenous insulin in the complex of hepatic lipidosis and ketosis associated with insulin resistance phenomenon in postpartum dairy cattle. **Veterinary research communications**, *30*(7), 749–74, 2006.

HERDT, T.H. Ruminant adaptation to negative energy balance. Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, *16*(2), 215–30, 2000.

HOLTENIUS, K.; AGENÄS, S.; DELAVAUD, C. & CHILLIARD, Y. Effects of feeding intensity during the dry period. 2. Metabolic and hormonal responses. **Journal of Dairy Science**, *86*(3), 883–91, 2003.

INGVARTSEN, K.L. & ANDERSEN, J.B. Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals. **Journal of Dairy Science**, *83*(7), 1573–97, 2000.

JAMES, R.W. & DEAKIN, S.P. The importance of high-density lipoproteins for paraoxonase-1 secretion, stability, and activity. **Free radical biology & medicine**, *37*(12), 1986–94, 2004.

JURETIĆ, D.; MOTEJLKOVA, A.; KUNOVIĆ, B.; REKIĆ, B.; FLEGAR-MESTRIĆ, Z.; VUJIĆ, L.; MESIĆ, R.; ET AL. Paraoxonase/arylesterase in serum of patients with type II diabetes mellitus. **Acta pharmaceutica** *(Zagreb, Croatia)*, *56*(1), 59–68, 2006.

KATAMOTO, H.; YUKAWA, T. & SHIMADA, Y. Lipogenic and lipolytic activities in isolated adipocytes from cattle with fat necrosis. **Research in veterinary science**, *61*(3), 214–7, 1996.

KESSEL, S.; STROEHL, M.; MEYER, H.H.D.; HISS, S.; SAUERWEIN, H.; SCHWARZ, F.J. & BRUCKMAIER, R.M. Individual variability in physiological adaptation to metabolic stress during early lactation in dairy cows kept under equal conditions. **Journal of Dairy Science**, *86*(11), 2903–12, 2008.

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**, *60*(8), 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**, *87*(4), 1012–4, 2004.

MACKNESS, M.I. Why plasma should not be used to study paraoxonase. **Atherosclerosis**, *136*(1), 195–6, 1998.

MURATA, H. & MIYAMOTO, T. Bovine haptoglobin as a possible immunomodulator in the sera of transported calves. **The British veterinary journal**, *149*(3), 277–83, 2000.

OVERTON, T.R. & WALDRON, M.R. Nutritional Management of Transition Dairy Cows: Strategies to Optimize Metabolic Health. **Journal of Dairy Science**, *87*, E105–E119, 2004.

PANNDORF, H.; RICHTER, H. & DITTRICH, B. Haptoglobin in domestic mammals. V. Plasma haptoglobin level in cattle under pathological conditions. **Archiv für Experimentelle Veterinärmedizin**, *30*(2), 193–202, 1976.

RUEGG, P.L. & MILTON, R.L. Body condition scores of Holstein cows on Prince Edward Island, Canada: relationships with yield, reproductive performance, and disease. **Journal of Dairy Science**, *78*(3), 552–64, 1995.

STER, C.; LOISELLE, M.C. & LACASSE, P. Effect of postcalving serum nonesterified fatty acids concentration on the functionality of bovine immune cells. **Journal of Dairy Science**, *95*(2), 708–17, 2012.

TAMMINGA, S.; LUTEIJN, P.A. & MEIJER, R.G.M. Changes in composition and energy content of liveweight loss in dairy cows with time after parturition. **Livestock Production Science**, *52*(1), 31–38, 1997

TURK, R.; JURETIC, D.; GERES, D.; TURK, N.; REKIC, B.; SIMEON-RUDOLF, V. & SVETINA, A. Serum paraoxonase activity and lipid parameters in the early postpartum period of dairy cows. **Research in Veterinary Science**, *76*(1), 57–61, 2004.

TZIANABOS, A.O. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. **Clinical Microbiology Reviews**, *13*(4), 523–33, 2000.

TÓTHOVÁ, C.; NAGY, O.; SEIDEL, H.; KONVIČNÁ, J.; FARKAŠOVÁ, Z. & KOVÁČ, G. Acute Phase Proteins and Variables of Protein Metabolism in Dairy Cows during the Pre- and Postpartal Period. **Acta Veterinaria Brno**, *77*(1), 51–57, 2008.

WALTNER, S.S.; MCNAMARA, J.P. & HILLERS, J.K. Relationships of body condition score to production variables in high producing Holstein dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, *76*(11), 3410–9, 1993.