

ALINE MARANGON DE OLIVEIRA

**PROPILENOGLICOL E, OU DIETA DE ALTO NÍVEL DE ENERGIA NO
DESEMPENHO E METABOLISMO DE CABRAS LEITEIRAS NO PERIPARTO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientadora: Cristina Mattos Veloso

Coorientadores: Luciana Navajas Rennó
Érica Beatriz Schultz
Marcelo Teixeira Rodrigues

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

O48p
2023

Oliveira, Aline Marangon de, 1992-
Propilenoglicol e, ou dieta de alto nível de energia no
desempenho e metabolismo de cabras leiteiras no periparto /
Aline Marangon de Oliveira. – Viçosa, MG, 2023.
1 tese eletrônica (68 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexo.

Orientador: Cristina Mattos Veloso.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Zootecnia, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.457>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Caprinos - Alimentação e rações. 2. Caprinos -
Metabolismo. 3. Ácido 3-Hidroxibutírico. 4. Fígado - Biópsia.
5. Cetose. 6. Leite - Produção. I. Veloso, Cristina Mattos, 1968-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Zootecnia.
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

CDD 22. ed. 636.390855

ALINE MARANGON DE OLIVEIRA

**PROPILENOGLICOL E, OU DIETA DE ALTO NÍVEL DE ENERGIA NO
DESEMPENHO E METABOLISMO DE CABRAS LEITEIRAS NO PERIPARTO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 05 de maio de 2023.

Assentimento:


Aline Marangon de Oliveira
Autora


Cristina Mattos Veloso
Orientadora

À minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir viver tantas coisas em tão pouco tempo. Por ser a minha luz durante a escuridão.

Aos meus pais Marlene e Ademir, e ao meu irmão, Gabriel, por todo apoio emocional, financeiro, por serem o meu porto seguro, mesmo distantes fisicamente. Estendo a minha gratidão para os demais membros da família, cunhada, tios e tias, primos e primas e a nona Iraci, por sempre estarem torcendo pelo meu sucesso por meio de mensagens e orações.

Ao meu namorado, Vinícius, que desde o início do projeto não mediu esforços pra me ajudar nas coletas, na separação das amostras, me ouvir e me apoiar, mesmo nos dias nebulosos. Por tentar me alegrar e dispor do próprio tempo para acalmar a minha ansiedade.

Aos meus amigos, que sempre me apoiaram quando as coisas não saíam tão bem, apesar da distância, Fernando, Bruna e Soliane se fizeram sempre presentes. Um agradecimento especial para os meus amigos daqui, Daiana, Ronaldo e Samires, que, em meio à pandemia, se dispuseram a me auxiliar como suporte técnico para as coletas e alimentação dos animais. O convívio com vocês tornou meus dias mais leves.

À minha orientadora, professora Cristina Veloso, pelo desenvolvimento desse projeto, apoio financeiro, amizade, orientação e por estar presente auxiliando, sempre que necessário.

Aos membros da banca pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho. Em especial, à professora Erica Schultz, pelas inúmeras horas dispendidas em frente ao *software* R, pela amizade e orientação, e, à professora Luciana Navajas, pelo auxílio tanto nas biópsias hepáticas quanto nas análises hematológicas, igualmente orientação e amizade.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de me desenvolver profissionalmente por meio da realização da pós-graduação.

Ao Departamento de Zootecnia, pelo aprendizado, ao longo desses quatro anos, por meio do seu corpo docente e técnico e por toda infraestrutura disponibilizada para a realização da pesquisa científica.

À Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Caprinocultura (UEPE Caprinocultura), em especial ao professor Marcelo Teixeira, pela disponibilidade do

uso dos animais e apoio científico. Também aos funcionários da UEPE, em especial ao Anderson, João e Antônio por sempre estarem dispostos a me auxiliar e por toda a dedicação aos animais da unidade.

Ao laboratório de Biotecnologia Animal, em especial à professora Simone Guimaraes, pelo apoio, material e orientação nas análises moleculares.

A todos os estudantes de graduação dos cursos de Zootecnia e Veterinária que me auxiliaram durante o período experimental.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

BIOGRAFIA

ALINE MARANGON DE OLIVEIRA, filha de Marlene Marangon de Oliveira e Ademir Agostinho de Oliveira, nasceu em Nonoai, Rio Grande do Sul, em 17 de maio de 1992.

Em abril de 2009, ingressou no curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), na cidade de Pelotas/RS, onde graduou-se em fevereiro de 2014.

Em março de 2015, ingressou no Programa de Residência Multiprofissional na área de Inspeção de Leite e Derivados da Universidade Estadual de Londrina (UEL), na cidade de Londrina/PR, sob orientação da Professora Vanerli Beloti, obtendo o título de especialista em fevereiro de 2017.

Em março de 2017, iniciou o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina (UEL), sob orientação do Professor Valter Bumbieris Júnior e coorientação do Professor Leandro das Dores Ferreira da Silva, obtendo o título de mestre em fevereiro de 2019.

Em março de 2019, iniciou o Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), sob orientação da Professora Cristina Mattos Veloso, concentrando seus estudos na área de Fisiologia da Produção Animal, submetendo-se à defesa em 05 de maio de 2023.

RESUMO

OLIVEIRA, Aline Marangon de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2023. **Propilenoglicol e, ou dieta de alto nível de energia no desempenho e metabolismo de cabras leiteiras no periparto.** Orientadora: Cristina Mattos Veloso. Coorientadores: Erica Beatriz Schultz, Luciana Navajas Rennó e Marcelo Teixeira Rodrigues.

Objetivou-se avaliar: 1) os efeitos da suplementação energética, para prevenção da cetonemia, perfil metabólico, expressão gênica e parâmetros produtivos em cabras durante o periparto; 2) o perfil bioquímico, produção e composição do leite e suas correlações em cabras leiteiras com cetonemia; e 3) os teores hepáticos de triglicerídeos e glicogênio e descrever a técnica de biópsia hepática em cabras gestantes e lactantes. Para o primeiro estudo, foram utilizadas 48 cabras leiteiras suplementadas durante o periparto, compondo os seguintes grupos: dieta de alta energia e propilenoglicol (AP, PG); dieta padrão de energia e PG (PP); somente dieta de alta energia (A); somente dieta padrão de energia (P). Foram medidos o consumo alimentar, a massa corporal, a produção e a composição do leite. Amostras de sangue foram colhidas nos dias -14, -10, -5, -3, 3, 5, 10 e 14 em relação ao parto, para análise dos marcadores energéticos, proteicos e enzimas hepáticas. Amostras do fígado foram colhidas nos dias -20, -15 e 15 em relação ao parto, para avaliação da expressão gênica. No segundo estudo, a partir dos valores de beta-hidroxibutirato (BHB), foram denominados dois grupos animais: cetóticos cabras $BHB \geq 0,8$ mmol/L e cabras saudáveis com $BHB \leq 0,8$ mmol/L. Para atender ao terceiro objetivo, amostras do fígado foram coletadas por meio de biópsia hepática, nos dias -30, -20, -15, -10, -5 e 15 dias, em relação ao parto, para avaliação do conteúdo de triglicerídeos e glicogênio. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e os efeitos foram avaliados pelo teste F, considerando $p < 0,05$ como significativo. O risco de chance de desenvolver cetose foi analisado por regressão logística e, para o segundo objetivo, foi realizada análise de correlações ρ de Spearman. No primeiro estudo foi observado que as cabras do grupo PP tiveram 84,7% menos chances de desenvolver cetonemia. O *status* metabólico não foi influenciado pelas dietas. Foi observada maior expressão dos genes *FBP1* e *PCK1* em cabras alimentadas com A e P. Enquanto, cabras AP e PP

tiveram menor expressão dos genes *HMGCSL1* e *ACSL1*. O consumo de matéria seca (CMS) foi menor em cabras P, as quais tiveram menor massa corporal. As cabras que receberam AP produziram menos leite. Em relação à composição do leite, as cabras do grupo P apresentaram maiores concentrações de gordura, proteína e ureia que cabras PP. No segundo estudo, as cabras com cetonemia apresentaram maior BHB, AGL e redução das concentrações de glicose, colesterol e fosfatase alcalina que as cabras saudáveis. O aumento de BHB no sangue apresentou correlação moderadamente forte com a concentração de AGL ($r = 0,65$) e creatinina ($r = 0,62$). Enquanto o aumento da concentração de AGL também apresentou correlação moderadamente forte com a concentração de BHB ($r = 0,59$) e correlação fraca, com a concentração de proteína total ($r = 0,44$). No terceiro estudo, a concentração de glicogênio hepático foi menor 15 dias após o parto em relação ao pré-parto, exceto ao dia -20. As cabras com alta produção leiteira apresentaram menor concentração de triglicerídeos em relação às cabras de baixa produção. Conclui-se que: 1) combinação da dieta padrão de energia com a suplementação de PG reduz a chance de riscos de ocorrer cetonemia e a cetogênese; 2) o aumento de BHB sérico apresenta-se concomitante à redução da glicemia, colesterol e fosfatase alcalina; e 3) a biópsia é um método seguro para obtenção de fígado e o nível produtivo e os dias em relação ao parto influenciam, respectivamente, as concentrações de triglicerídeo e glicogênio no fígado.

Palavras-chave: Beta-hidroxibutirato. Biópsia hepática. Cetonemia. Perfil bioquímico.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Aline Marangon de D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2023. **Propylene glycol and, or high-level energy diet on performance and metabolism of dairy goats in the peripartum.** Adviser: Cristina Mattos Veloso. Co-advisers: Erica Beatriz Schultz Luciana Navajas Rennó and Marcelo Teixeira Rodrigues.

This study aimed to evaluate: 1) the effects of energy supplementation for the prevention of ketonemia, metabolic profile, gene expression, and productive parameters in goats during peripartum; 2) the metabolic profile, milk production and composition, and correlations in dairy goats with ketonemia; and 3) the hepatic levels of triglycerides and glycogen in pregnant and lactating goats. For the first study, 48 dairy goats supplemented during peripartum were used, composing the following groups: high-energy diet and propylene glycol (PG, AP); standard energy diet and PG (PP); only high-energy diet (A); only standard energy diet (P). Dry matter intake (DM), body mass, milk production, and composition were measured. Blood samples were collected on days -14, -10, -5, -3, 3, 5, 10, and 14 to delivery, for analysis of metabolic profile. Liver samples were collected on days -20, -15, and 15 to delivery, for analysis of gene expression. In the second study, from the values of beta-hydroxybutyrate (BHB), two animal groups were named: ketosis goats, $BHB \geq 0.8$ mmol/L and, health goats, $BHB \leq 0.8$ mmol/L. And to meet the third objective, liver samples were collected using liver biopsy, on days -30, -20, -15, -10, -5, and 15 days to delivery, to evaluate the content of triglycerides and glycogen. The data were submitted to analysis of variance (ANOVA). The effects were evaluated by the F test, considering $p < 0.05$ as significant. The odds ratio of developing ketosis was analyzed by logistic regression and for the second objective, Spearman's ρ -correlation analysis was performed. In the first study, it was observed that the goats of the PP group were 84.7% less likely to develop ketonemia. Metabolic profile was not influenced by diets. Higher expression of FBP1 and PCK1 were observed in goats fed A and P. AP and PP goats had lower expression of HMGCSL1 and ACSL1. DM was lower in P goats and lower body mass. AP produced less milk. P goats showed higher concentrations of fat, protein, and urea than PP goats. In the second study, ketotic goats had higher

BHB, FFA, and reduced glucose, cholesterol and alkaline phosphatase concentrations than healthy goats. The increase in BHB showed a moderate correlation between the concentration of FFA ($r = 0.65$) and creatinine ($r = 0.62$). The increase in FFA concentration also showed a moderately strong correlation with BHB concentration ($r = 0.59$) and a weak correlation with total protein concentration ($r = 0.44$). And in the third study, the concentration of hepatic glycogen was lower 15 days after delivery compared to prepartum, except for day -20. Goats with high milk production had lower hepatic triglyceride concentrations compared to low-production goats. It is concluded that: 1) the combination of the standard energy diet with PG reduces the chance of risks of ketonemia and ketogenesis; 2) the increase in serum BHB occurs simultaneously to the reduction of glucose, cholesterol, and alkaline phosphatase; and 3) biopsy is a safe method for obtaining hepatic tissue and the production level and days to delivery respectively influence the concentrations of triglyceride and glycogen in the liver.

Keywords: Beta-hydroxybutyrate. Liver biopsy. Ketonemia. Metabolic profile.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	12
1.1. OBJETIVOS	14
REFERÊNCIAS	15
2. CAPÍTULO 1	17
2.1. RESUMO	17
2.2. INTRODUÇÃO	18
2.3. METODOLOGIA	20
2.4. RESULTADOS	26
2.5. DISCUSSÃO	35
2.6. CONCLUSÃO	37
2.7. AGRADECIMENTOS	37
2.8. REFERÊNCIAS	37
3. CAPÍTULO 2	41
3.1. RESUMO SIMPLES	41
3.2. RESUMO	41
3.3. INTRODUÇÃO	42
3.4. MATERIAL E MÉTODOS	43
3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
3.6. CONCLUSÕES	53
3.7. AGRADECIMENTOS	53
3.8. REFERÊNCIAS	53
4. CAPÍTULO 3	57
4.1. RESUMO	57
4.2. SHORT COMMUNICATION	58
4.3. REFERÊNCIAS	64
5. CONCLUSÕES GERAIS	67
ANEXO A	68

1. INTRODUÇÃO GERAL

O periparto, em ruminantes, compreende 21 dias antes e após o parto e, é caracterizado pela manutenção da gestação e início da lactação, considerados desafios fisiológicos, em função de adaptações hormonais e metabólicas. Nesse período, o aumento da demanda energética, concomitantemente com a incapacidade de ingestão suficiente de alimentos, devido a impedimentos de ordem física, como a compressão do rúmen pelo(s) feto(s) e a adiposidade abdominal, bem como ao fator endócrino, orquestrado pela dinâmica hormonal da gestação e lactação (SCHLUMBOHM; HARMEYER, 2008), resulta no decréscimo da disponibilidade de glicose para os tecidos. Como resposta fisiológica adaptativa, a glicose é direcionada para tecidos prioritários, como a glândula mamária e o útero gravídico. E tecidos de reserva, como o tecido adiposo, são mobilizados. O tecido adiposo é mobilizado na forma de ácidos graxos livres (AGL) para ser utilizado como fonte alternativa de energia pelos demais tecidos, principalmente tecidos hepático e muscular (BELL; BAUMAN, 1997; MCFADDEN, 2020). No fígado, os ácidos graxos podem ser, então, armazenados na forma de triacilgliceróis, quando reesterificados, exportados na forma de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) ou oxidados completa ou incompletamente, dando origem aos corpos cetônicos (GRUMMER, 1993). O desequilíbrio entre a mobilização excessiva de tecido adiposo e a taxa de metabolização de AGL pelo tecido hepático resulta em transtornos metabólicos, como a toxemia da gestação ou cetose lactacional e fígado gordo (SORDILLO; RAPHAEL, 2013).

O influxo abundante de AGL no tecido hepático aumenta a taxa de síntese de acetil-CoA, que, por sua vez, eleva a taxa de cetogênese acima do necessário para o uso dos tecidos extra-hepáticos, levando ao acúmulo de corpos cetônicos no sangue. Desta maneira, os AGL e o β -hidroxibutirato (BHB) são indicadores séricos para cetose em caprinos (ZAMUNER *et al.*, 2020a). Usualmente, consideram-se os valores de AGL e BHB, obtidos em gado leiteiro, para caracterizar perdas produtivas e de saúde com o transtorno no pré-parto (AGL \geq 0,3 – 0,5 e BHB \geq 0,6 – 0,8 mmol/L) e pós-parto (AGL \geq 0,7 – 1,0 e BHB \geq 1,0 – 1,4 mmol/L) (OVERTON; MCART; NYDAM, 2017).

Avaliações de AGL e BHB séricos, em cabras leiteiras, por meio de estudos longitudinais, foram reportadas recentemente (DORÉ *et al.*, 2015; ZAMUNER *et al.*,

2020b). Doré *et al.* (2015) definiram como casos de hipercetonemia em cabras leiteiras valores de BHB entre 0,4 e 0,9 mmol/L durante as cinco últimas semanas pré-parto, sendo o limiar máximo com alta mortalidade. Porém, este trabalho não avaliou o período pós-parto, no qual também é susceptível o aparecimento de casos de cetose lactacional para a espécie. Neste sentido, Zamuner *et al.* (2020b) avaliaram todo o período de transição de cabras leiteiras, demonstrando que 81% das cabras apresentam pelo menos um evento de cetonemia (BHB > 0,8 mmol/L), também no pós-parto. Porém, foram observadas moderadas correlações entre AGL e BHB ($r=0,66$), diferente do esperado na espécie bovina. Além disso, em nenhum dos trabalhos foi relatado o conteúdo hepático, uma vez que a concentração de triglicerídeo hepático também é um preditor de cetose em vacas leiteiras (ARSHAD; SANTOS, 2022).

As estratégias para a prevenção de distúrbios no metabolismo de lipídeos e carboidratos consistem na redução da esterificação de ácidos graxos hepáticos, redução da mobilização de ácidos graxos para o fígado e aumento da exportação de VLDL (GRUMMER, 1993). Para reduzir a concentração de AGL, podem-se aplicar precursores gliconeogênicos, bem como aumentar a concentração de nutrientes na ração, uma vez que ambas as estratégias visam aumentar a disponibilidade de glicose no sangue e, conseqüentemente, reduzir a mobilização lipídica.

A suplementação de precursores gliconeogênicos, como o propilenoglicol (PG), visa aumentar a concentração sanguínea de glicose, no periparto, para a prevenção da cetonemia. A ação do PG, ou 1,2-propanodiol, está, provavelmente, associada com o aumento da concentração de glicose via gliconeogênese, devido ao aumento das concentrações de lactato e piruvato e por meio da oxidação completa de acetil-CoA, reduzindo a cetogênese (NIELSEN e INGVARTSEN, 2004; ZHANG *et al.*, 2020). Apesar dos benefícios associados à suplementação de PG na prevenção da cetose, houve estudos em que foram observados: redução do percentual de gordura no leite, tanto em vacas quanto em cabras leiteiras (BUTLER; PELTON; BUTLER, 2006; HAMZAQUI *et al.*, 2020), redução do consumo de matéria seca (CMS) (HAMZAQUI *et al.*, 2020) e efeito dependente do desafio metabólico ao qual o animal é submetido durante o período de transição (MCART *et al.*, 2011; MAURER *et al.*, 2017).

Os benefícios do aumento da concentração de nutrientes da dieta, para compensar os efeitos negativos da redução da IMS, durante o periparto, parecem

ser controversos. Douglas *et al.* (2006) e Janovick *et al.* (2011) demonstraram que o consumo excessivo de energia, no pré-parto, é prejudicial à saúde da vaca leiteira e à função hepática no pós-parto. Porém, o aumento da concentração de energia na dieta reduziu a concentração plasmática de ácidos graxos não esterificados (AGNE) e o conteúdo de triacilglicerol hepático, no período de transição (DOEPEL; LAPIERRE; KENNELLY, 2002). Em cabras leiteiras, o acréscimo de energia na ração, no período de transição, não apresentou efeito no peso dos cabritos (VÁZQUEZ-GARCÍA *et al.*, 2021), porém, aumentou a IMS das cabras e sua produção de leite, sem influenciar a concentração de AGNE (RODRIGUES *et al.*, 2006).

Em caprinos, a extensão de estudos para prevenção, compreensão e diagnóstico da toxemia da gestação é menos expressiva que a da cetose lactacional que ocorre no gado leiteiro. Entretanto, de maneira similar, este transtorno gera prejuízos econômicos diretos aos produtores, como, por exemplo, a morte da matriz e dos fetos, e indiretos, como gastos com tratamento, redução da produção de leite e da eficiência reprodutiva, e aumento do descarte involuntário (HARMEYER e SCHLUMBOHM, 2006; BARBAGIANNI *et al.*, 2015). Além disso, apesar da baixa prevalência (até 30% do rebanho), a toxemia da gestação apresenta alta taxa de mortalidade (em torno de 70%) devido aos caprinos não responderem de forma eficiente ao tratamento (BROZOS; MAVROGIANNI; FTHENAKIS, 2011).

1.1. OBJETIVOS

Objetivou-se:

- Avaliar estratégias de suplementação com propilenoglicol, associado ou não ao aumento da concentração de energia na ração, para: prevenção da toxemia da gestação; determinação das consequências sobre o perfil metabólico, parâmetros produtivos e expressão de genes hepáticos, durante o parto de cabras leiteiras.
- Elucidar o perfil bioquímico de cabras leiteiras com cetose espontânea, a fim de facilitar o diagnóstico desta enfermidade para a espécie.
- Descrever um método de biópsia hepática para avaliação do fígado de cabras leiteiras.

REFERÊNCIAS

- ARSHAD, U.; SANTOS, J. E. P. Hepatic triacylglycerol associations with production and health in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 6, p. 5393–5409, 2022.
- BARBAGIANNI, M. S. *et al.* Pregnancy toxemia as predisposing factor for development of mastitis in sheep during the immediately post-partum period. **Small Ruminant Research**, v. 130, p. 246–251, 2015.
- BELL, A. W.; BAUMAN, D. E. Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 2, n. 3, p. 265–278, 1997.
- BROZOS, C.; MAVROGIANNI, V. S.; FTHENAKIS, G. C. Treatment and Control of Peri-Parturient Metabolic Diseases: Pregnancy Toxemia, Hypocalcemia, Hypomagnesemia. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 27, n. 1, p. 105–113, 2011.
- BUTLER, S. T.; PELTON, S. H.; BUTLER, W. R. Energy balance, metabolic status, and the first postpartum ovarian follicle wave in cows administered propylene glycol. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 8, p. 2938–2951, 2006.
- DOEPEL, L.; LAPIERRE, H.; KENNELLY, J. J. Peripartum Performance and Metabolism of Dairy Cows in Response to Prepartum Energy and Protein Intake. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 9, p. 2315–2334, 2002.
- DORÉ, V. *et al.* Definition of prepartum hyperketonemia in dairy goats. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 7, p. 4535–4543, 2015.
- DOUGLAS, G. N. *et al.* Prepartal Plane of Nutrition, Regardless of Dietary Energy Source, Affects Periparturient Metabolism and Dry Matter Intake in Holstein Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 6, p. 2141–2157, 2006.
- GRUMMER, R. R. Etiology of Lipid-Related Metabolic Disorders in Periparturient Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 12, p. 3882–3896, 1993.
- HAMZAOU, S. *et al.* Milk production and energetic metabolism of heat-stressed dairy goats supplemented with propylene glycol. **Animals**, v. 10, n. 12, p. 1–12, 2020.
- HARMEYER, J.; SCHLUMBOHM, C. Pregnancy impairs ketone body disposal in late gestating ewes: Implications for onset of pregnancy toxemia. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 2, p. 254–264, 2006.
- JANOVICK, N. A.; BOISCLAIR, Y. R.; DRACKLEY, J. K. Prepartum dietary energy intake affects metabolism and health during the periparturient period in primiparous and multiparous Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 3, p. 1385–1400, 2011.

MAURER, M. *et al.* Effects of different dosages of propylene glycol in dry cows and cows in early lactation. **Journal of Dairy Research**, v. 84, n. 4, p. 375–384, 2017.

MCART, J. A. A. *et al.* A field trial on the effect of propylene glycol on milk yield and resolution of ketosis in fresh cows diagnosed with subclinical ketosis. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 12, p. 6011–6020, 2011.

MCFADDEN, J. W. Review: Lipid biology in the periparturient dairy cow: contemporary perspectives. **Animal**, v. 14, n. S1, p. 165–175, 2020.

NIELSEN, N. I.; INGVARTSEN, K. L. Propylene glycol for dairy cows: A review of the metabolism of propylene glycol and its effects on physiological parameters, feed intake, milk production and risk of ketosis. **Animal Feed Science and Technology**, v. 115, n. 3, p. 191–213, 2004.

OVERTON, T. R.; MCART, J. A. A.; NYDAM, D. V. A 100-Year Review: Metabolic health indicators and management of dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10398–10417, 2017.

RODRIGUES, C. A. F. *et al.* Influência da condição corporal e da concentração de energia nas dietas no periparto sobre o desempenho de cabras em lactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1560–1567, 2006.

SCHLUMBOHM, C.; HARMEYER, J. Twin-pregnancy increases susceptibility of ewes to hypoglycaemic stress and pregnancy toxæmia. **Research in Veterinary Science**, v. 84, n. 2, p. 286–299, 2008.

SORDILLO, L. M.; RAPHAEL, W. Significance of Metabolic Stress, Lipid Mobilization, and Inflammation on Transition Cow Disorders. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 29, n. 2, p. 267–278, 2013.

VÁZQUEZ-GARCÍA, J. M. *et al.* Energy supplementation during the last third of gestation improves mother–young bonding in goats. **Animals**, v. 11, n. 2, p. 1–11, 2021.

ZAMUNER, F. *et al.* Endocrine and metabolic status of commercial dairy goats during the transition period. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 6, p. 5616–5628, 2020a.

ZAMUNER, F. *et al.* Short communication: Associations between nonesterified fatty acids, β -hydroxybutyrate, and glucose in periparturient dairy goats. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 7, p. 6672–6678, 2020b.

ZHANG, F. *et al.* Effects of propylene glycol on negative energy balance of postpartum dairy cows. **Animals**, v. 10, n. 9, p. 1–15, 2020.

2. CAPÍTULO 1

PROPILENOGLICOL E, OU DIETA DE ALTO NÍVEL DE ENERGIA NO DESEMPENHO E METABOLISMO DE CABRAS LEITEIRAS NO PERIPARTO¹

2.1. RESUMO

Objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação energética, para prevenção da toxemia da gestação, e efeitos sobre o perfil metabólico, expressão gênica e parâmetros produtivos, durante o periparto de cabras leiteiras. Foram utilizadas 48 cabras leiteiras suplementadas durante o período do 135º dia de gestação ao 15º dia de lactação. As dietas foram compostas por dieta com alta energia (3,3 Mcal de EM.kg⁻¹ de MS), dieta padrão de energia (2,9 Mcal de EM.kg⁻¹ de MS) combinadas ou não com propilenoglicol (PG, 0,408 Mcal de EM.kg⁻¹ de MS), compondo os seguintes grupos: dieta de alta energia e PG (AP); dieta padrão de energia e PG (PP); somente dieta de alta energia (A); somente dieta padrão de energia (P). A dieta total foi constituída por silagem de milho e concentrado à base de milho e farelo de soja, na relação 50:50, e foi ofertada duas vezes ao dia. O consumo alimentar foi medido diariamente. O peso das cabras foi medido a cada 15 dias até o 30º dia pós-parto e dos cabritos no dia do parto. A produção leiteira e a colheita de leite para determinar a composição (teores de lactose, gordura, e proteína e ureia), foi realizada a cada sete dias, do sétimo ao 21º dia pós-parto. Foram realizadas colheitas de sangue nos dias 14, 10, 5 e 3 pré-parto, no dia do parto e 3, 5, 10 e 14 dias pós-parto, para análise dos marcadores energéticos, proteicos e enzimas hepáticas. Foram realizadas biópsias hepáticas nos dias -20, -10 e 15 em relação ao parto, para avaliação da expressão gênica. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e os efeitos da suplementação, dia e interação Suplementação*Dia foram avaliados pelo teste F, considerando p<0,05 como significativo. O risco de chance de desenvolver cetose foi analisado por regressão logística. As cabras do grupo PP tiveram 84,7% menos chances de desenvolver toxemia da gestação. O *status* metabólico energético não foi influenciado pelas dietas. Foi observada maior expressão dos genes *FBP1* e *PCK1* em cabras alimentadas com A e P. Entretanto, cabras suplementadas com PG,

¹ Artigo formatado de acordo com as normas da revista Journal of Dairy Science.

independentemente do nível de energia da dieta, tiveram menor expressão dos genes *HMGCSL1* e *ACSL1*. O consumo de matéria seca (CMS) foi menor em cabras P (0,981 kg.dia⁻¹), as quais tiveram menor massa corporal (57,6 kg). As cabras que receberam AP produziram menos leite (1,44 kg.dia⁻¹). Em relação à composição do leite, as cabras do grupo P apresentaram maiores concentrações de gordura (5,25%), proteína (3,12%) e ureia (21,3%). A combinação da dieta padrão de energia com a suplementação, via oral, de PG reduz a chance de riscos de ocorrer cetonemia e reduz a cetogênese. A combinação de uma dieta de alta energia com PG prejudica a produção de leite.

Palavras-chave: cetonemia, desempenho, expressão, fígado, produção de leite

2.2. INTRODUÇÃO

O parto, em cabras leiteiras, é caracterizado pela manutenção da gestação e início da lactação, diante de um desafio negativo de energia, por meio de adaptações hormonais e metabólicas. A diferença entre a demanda de energia e o consumo de energia resulta no decréscimo da disponibilidade de glicose para os tecidos (Schlumbohm e Harmeyer, 2008). Desta maneira, para suprir o déficit de energia, o organismo mobiliza suas reservas, principalmente de lipídeos e aminoácidos, para a oxidação e gliconeogênese, além de estimular a cetogênese para a produção de fontes alternativas, como os corpos cetônicos (Grummer, 1993; Bell e Bauman, 1997; McFadden, 2020). O desequilíbrio entre a mobilização excessiva de tecido adiposo e a taxa de metabolização de lipídeos resulta em transtornos metabólicos, como a toxemia da gestação ou cetose lactacional e esteatose hepática (Sordillo e Raphael, 2013).

A toxemia da gestação e a cetose lactacional em caprinos, que são caracterizadas pelo aumento de corpos cetônicos, sobretudo beta-hidroxiacetato (BHB), gera prejuízos econômicos aos produtores. Esta enfermidade causa prejuízos diretos como, por exemplo, a morte da matriz e dos fetos (Zainal Ulum *et al.*, 2021), e indiretos, como gastos com tratamento, redução da produção de leite e da eficiência reprodutiva, e aumento do descarte involuntário (Harmeyer e Schlumbohm, 2006; Barbagianni *et al.*, 2015). Além disso, apesar da baixa prevalência (até 30% do rebanho), a toxemia da gestação apresenta alta taxa de mortalidade (em torno de 70%) devido aos caprinos não responderem de forma

eficiente ao tratamento. Desta maneira, métodos de prevenção devem ser priorizados dentro das propriedades para o controle da enfermidade.

Para prevenir a toxemia da gestação e a cetose, práticas que visam reduzir a mobilização de tecido adiposo por meio do aumento da disponibilidade de glicose são mais usuais (Cal-Pereyra *et al.*, 2015; El-Kasrawy *et al.*, 2020). Em caprinos, um acréscimo ponderado de energia, por volta de 15% da EM, proporciona efeitos positivos na produção e no metabolismo, apresentando-se como uma estratégia simples e com menor custo (Barbosa *et al.*, 2016; Vázquez-García *et al.*, 2021). O aumento da concentração de energia pode ser realizado por meio do aumento de nutrientes da dieta ou pela suplementação de precursores glicogênicos, como o propilenoglicol (PG).

O PG é um resíduo da indústria do biodiesel, derivado da glicerina e, tem se tornado um produto mais disponível no mercado devido à expansão industrial vinculada à produção de combustíveis não-fósseis (Mota *et al.*, 2009). O PG tem sido aplicado para o tratamento de cetose de vacas leiteiras desde a década de 1950 (Johnson, 1954). Porém, há contradições na literatura sobre seu mecanismo de ação na literatura. Acreditava-se que a ação do PG, estaria provavelmente, associada com o aumento da concentração de glicose via gliconeogênese, devido ao aumento das concentrações de lactato e piruvato, e por meio da oxidação completa de acetil-CoA, reduzindo a cetogênese (Nielsen e Ingvarsten, 2004; Zhang *et al.*, 2020). Entretanto, Kristensen e Raun (2007) sugeriram que o PG aumenta a disponibilidade de glicose por meio da resistência periférica à insulina e atua inibindo diretamente a cetogênese.

Análises de genética molecular podem proporcionar melhor compreensão dos efeitos da suplementação energética sobre a expressão gênica hepática, principalmente aqueles relacionados à cetose. Genes relacionados com a cetogênese, como HMGCSL1, que codifica a enzima iniciante e limitante desta via podem demonstrar a ação sobre a produção de corpos cetônicos (Hegardt, 1999). Enquanto, a expressão dos genes relacionados com a ativação e oxidação de ácidos graxos como o gene da acil-CoA sintetase de cadeia longa (*ACSL1*) e gliconeogênese, como o gene da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (*PCK1*) foram regulados positivamente no parto em correlação com altos níveis de ácidos graxos e BHB (Weber *et al.*, 2013). Da mesma maneira que o gene *DGAT1* (diacilglicerol O-

aciltransferase) foi documentado como influente no metabolismo lipídico em bovinos leiteiros (Mach *et al.*, 2012).

Desta forma, a hipótese é que a suplementação energética com propilenoglicol e/ou aumento na concentração energética modificam a expressão de genes hepáticos relacionados com a gliconeogênese, metabolismo lipídico e cetogênese. Além de prevenir e promover melhorias nos índices produtivos. Portanto, objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação oral de PG, associada ou não com o aumento da concentração de energia na ração, para prevenção da toxemia da gestação, e efeitos sobre o perfil metabólico, expressão de genes hepáticos e parâmetros produtivos, de cabras leiteiras durante o periparto.

2.3. METODOLOGIA

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção (CEUAP) da Universidade Federal de Viçosa, sob número 021/2018. O experimento foi conduzido de março a junho de 2021, na Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão (UEPE) em Caprinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa.

O manejo reprodutivo dos animais seguiu o manejo preconizado pela UEPE. Os animais aptos à reprodução foram mantidos em galpão com fotoperíodo artificial (exposição à luz por 16 horas/dia) para a indução do estro, (primavera no hemisfério sul), considerando a posição geográfica da UEPE Caprinocultura (21°35'S, 43°15'W, a 435 metros de altitude e de clima do tipo Cwa, segundo classificação de Koppen). No início da estação reprodutiva (outubro - dezembro/2020), as fêmeas foram expostas ao efeito macho, com a presença do reprodutor duas vezes ao dia. Com o uso de rufiões, foram identificadas as fêmeas que entraram em estro e estas foram alocadas com os machos para a monta natural. Trinta dias após a monta natural, foi realizada ultrassonografia transretal para diagnóstico de gestação. As cabras que apresentaram retorno ao estro ou resultado negativo de prenhez foram submetidas a protocolo de sincronização hormonal. O protocolo consistiu na aplicação de dispositivo intravaginal de progesterona (Eazi-Breed CIDR®, Zoetis – São Paulo, Brasil) mantida por sete dias. Cinco dias após a aplicação do dispositivo intravaginal, foi administrado 1 mL intramuscular de eCG (Novormon®, Zoetis, Buenos Aires, Argentina) e PGF2-alfa (Lutalyse®, Zoetis – Kalamazoo, Estados Unidos) e, no sexto

dia, o dispositivo foi removido. Transcorrido o protocolo, as cabras foram alocadas, novamente, com os machos para a monta natural.

Dos animais em período reprodutivo, foram selecionadas 48 cabras leiteiras, entre a segunda e a terceira ordens de parto, com gestação gemelar, após ultrassonografia transretal, em torno do 60º dia de gestação. Trinta dias antes do parto, os animais foram alocados em baias individuais (1,75 m²) para adaptação ao manejo, permanecendo até o 15º dia após o parto. Nas baias, os animais tinham livre acesso à água, ao alimento e ao sal mineral.

As cabras foram alocadas em quatro dietas, a partir do 135º dia de gestação até o 15º dia após o parto, em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), conforme a descrição a seguir:

1. Dieta de alta energia e propilenoglicol (AP): as cabras receberam dieta total com 3,3 Mcal de EM.kg⁻¹ de MS e suplementação com propilenoglicol oral (0,408 Mcal, 90 mL/dia);
2. Dieta padrão de energia e propilenoglicol (PP): as cabras receberam dieta total com 2,9 Mcal de EM.kg⁻¹ de MS e suplementação com propilenoglicol oral (0,408 Mcal, 90 mL/dia);
3. Dieta de alta energia (A): as cabras receberam somente dieta total com 3,3 Mcal de EM.kg⁻¹ de MS;
4. Dieta padrão de energia (P): as cabras receberam somente dieta total com 2,9 Mcal de EM.kg⁻¹ de MS.

As cabras dos grupos AP e PP receberam a administração de PG uma vez ao dia, de forma oral, com ajuda de um dosador, às 9h00min da manhã, durante todo o período citado. Os animais que constituíram os grupos A e P receberam água potável em substituição ao PG, com a finalidade de submeter todos os animais experimentais ao mesmo procedimento de manejo.

A dieta total foi composta por silagem de milho e concentrado à base de milho e farelo de soja. A dieta padrão para gestação foi formulada com a finalidade de atender as demandas nutricionais de cabras em gestação, considerando 55 kg de peso corporal médio, aos 145 dias de gestação, com prolificidade de 1,5 cabritos, de acordo com o (AFRC, 1993, Tabela 1). Já para a dieta padrão para cabras em lactação, foram considerados 55 kg de peso corporal médio, produção média de 2,5 kg de leite.dia⁻¹ até 30 dias de lactação, para o cálculo das exigências, também

conforme o (AFRC, 1993, Tabela 1). A dieta de alta energia foi calculada com o acréscimo de 15% de EM. kg⁻¹ de MS com base nas exigências.

Tabela 1. Ingredientes e composição das dietas pré-parto e pós-parto, para cabras leiteiras recebendo dieta com alta energia (A) e dieta padrão de energia (P), de acordo com as exigências do AFRC (1993)

Ingrediente ¹	Pré-parto		Pós-parto	
	P	A	P	A
Silagem de milho	494,4	434,4	528,4	451,7
Fubá de milho	362,5	461,5	197,8	318,0
Farelo de soja	112,6	76,0	255,1	213,0
Calcário calcítico	10,5	11,6	8,3	7,00
Fosfato bicálcico	10,4	7,84	0,5	-
Bicarbonato de sódio	-	-	10,0	10,1
<i>Composição dietética²</i>				
MS ³	445,2	419,9	436,4	448,4
PB ⁴	125	123	188	178
FDN ⁵	334	344	351	331
EM ⁶	2,9	3,3	2,8	3,2
EM + PG ⁷	3,3	3,7	3,2	3,6

¹ g.kg⁻¹.

² Valores estimados.

³MS: matéria seca (g.kg⁻¹ de matéria natural).

⁴ PB: proteína bruta (g.kg⁻¹ MS).

⁵ FDN: fibra em detergente neutro (g.kg⁻¹ MS).

⁶EM: energia metabolizável (Mcal.kg⁻¹ MS).

⁷EM + PG: energia metabolizável total (Mcal.kg⁻¹ MS) da dieta considerando o acréscimo de energia do PG (0,408 Mcal) para os animais que foram suplementados com PG.

A dieta total foi fornecida após mistura prévia de volumoso com mistura concentrada (relação 50:50). A alimentação foi ofertada duas vezes ao dia, às 8h00min e às 15h00min, e a quantidade ofertada foi ajustada diariamente para que as sobras representassem 15% do fornecido. Amostras das sobras e dos alimentos foram coletadas e submetidas à pré-secagem em estufa de ar forçado a 55 °C, *overnight* e secagem definitiva em estufa a 105 °C por 16 horas, para a determinação da matéria seca (MS) e mensuração do consumo alimentar diário. Para o controle da massa corporal, as cabras foram pesadas no início do período experimental e, a partir de então, a cada 15 dias, até o 30º dia pós-parto.

Após o parto, as cabras foram ordenhadas duas vezes ao dia, às 6h30min e às 14h30min, e a produção de leite foi registrada a cada sete dias, do sétimo ao 21º dia pós-parto. Nos mesmos dias, foram colhidas amostras para análise da composição do leite (teores de lactose, gordura, proteína e ureia), em frasco de polietileno com conservante bronopol, mantidas sob refrigeração (entre 2 e 6 °C) e enviadas para análise no Laboratório de Qualidade do Leite do Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite (EMBRAPA – Gado de Leite), em Juiz de Fora, MG.

As colheitas de sangue foram realizadas às 7h00 min, antes da alimentação e do fornecimento de PG. Foram realizadas colheitas de sangue nos dias 14, 10, 5 e 3 pré-parto, e 3, 5, 10 e 14 dias pós-parto, por meio de punção da veia jugular. Foram utilizados tubos vacutainer com fluoreto de sódio (Vacuplast®, Cotia, Brasil) para a análise de glicose e lactato e tubos com ativador de coágulo (Vacuplast®, Cotia, Brasil) para as análises de ácidos graxos livres (AGL), colesterol total, beta-hidroxi-butarato (BHB), triglicerídeos, ureia, albumina, proteínas totais (PT), creatinina, fosfatase alcalina (FA), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamiltransferase (GGT). Após as colheitas, as amostras de sangue foram centrifugadas a 3.000 g, por 15 minutos. As amostras de soro foram acondicionadas em microtubos e armazenadas a -20 °C até a realização das análises.

Os metabólitos foram analisados no Laboratório de Fisiologia e Reprodução Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, em equipamento automático para bioquímica, marca Mindray (Shenzen, China), modelo BS200E, utilizando-se *kits* de determinação da Bioclin para glicose (K082, Belo Horizonte, Brasil), lactato (K084), colesterol (K083), triglicerídeos (k117), ureia (K056), albumina (K040), creatinina (K067), PT (K031), FA (K224-2), ALT (K049), AST (K048) e GGT (K080-2) e da Randox (AGL - FA115 e BHB- RB1007, Antrim, Reino Unido).

Para a expressão gênica, amostras do tecido hepático foram coletadas de três animais, dentro de cada tratamento, escolhidos de forma aleatória, nos dias -20, -10, e 15 dias em relação ao parto, por meio de biópsia hepática. A biópsia hepática foi realizada por introdução de uma cânula com trocáter no 12º ou 11º espaço intercostal, na altura da tuberosidade ilíaca, após aplicação de lidocaína a 1%. A amostra de fígado foi depositada em uma placa de Petri para limpeza de coágulos e,

posteriormente, armazenada em criotubos, a -20 °C, em botijão com nitrogênio líquido, até a realização das análises de PCR quantitativa (qPCR).

O RNA total foi isolado a partir de 50 mg de amostra hepática, utilizando *kit* de isolamento total de RNA Mag Max[®] (ThermoFischer Scientific, Austin, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. As concentrações de RNA foram verificadas em espectrofotômetro NanoVue[®] Plus (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), com razão ótima entre 1,8 e 2,1. A transcrição reversa foi realizada utilizando-se *kit* de transcrição reversa de alta capacidade (Applied biosystems[®], ThermoFisher Scientific, Vilnius, Lituania), de acordo com a recomendação do fabricante. A quantificação do cDNA foi realizada em espectrofotômetro NanoVue[®] Plus (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) e, posteriormente, o cDNA foi armazenado a -20 °C, até análise de qPCR.

A sequência de nucleotídeos para os genes-alvo e a sequência de referência foram obtidas para *Capra hircus* do banco de dados GenBank. Os seguintes genes foram avaliados no tecido hepático: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintase 1 (*HMGCS1*), 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA liase (*HMGCL*), carnitina palmitoiltransferase 2 (*CPT2*), carnitina palmitoiltransferase 1A (*CPTA1A*), acetil-CoA carboxilase alfa (*ACACA*), acil-CoA sintetase de cadeia longa (*ACSL1*), ácido graxo sintase (*FASN*), diacilglicerol O-aciltransferase (*DGAT1*), glicerol quinase (*GK*), fosfoenolpiruvato carboxiquinase 1 (*PCK1*), frutose-bisfosfatase 1 (*FBP1*) e glicose-6-fosfato isomerase (*GPI*). Essas sequências dos genes foram usadas para construir os *primers* pelo programa PrimerQuest fornecido por Integrated DNA Technologies, Inc. O *GAPDH* (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) foi usado como gene de referência para normalização (Tabela 2).

Tabela 2. Genes e sequência dos pares de *primers* avaliados no tecido hepático de cabras leiteiras

Gene	ID gene GenBank	Nome	Sequência (5' – 3')
<i>HMGCS1</i>	102176561	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintase 1	F: CTT GGC CAA CTA CAT TCC C R: CCG AGC GTA GGT TCT TCT A F: GTC AAG CCC TGA ACA GAA G
<i>HMGCL</i>	102180980	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA liase	R: TCC CTA TTC CCA CAC AGT C F: TCC TGG ACC CTG CAT ATA G
<i>CPT2</i>	102180988	Carnitina palmitoiltransferase 2	R: CAA TGC CCA AGC

			CAT CA
<i>CPTA1A</i>	102187923	Carnitina palmitoiltransferase 1A	F: TGC ATG GCA GGT GTT TC R: CTC CGC GTT AAT GCC TAT C F: CAG AAA GGT CAG
<i>ACACA</i>	100861224	Acetil-CoA carboxilase alfa	TGG TTG AG R: ACT ACT CCC ACG GGT ATT C F: GGC GAG GTA TGT
<i>ACSL1</i>	102177866	Acil-CoA sintetase de cadeia longa	GTG AAA G R: CAA CCA GCC GTC TTT ATC C F: AAC CGC CTC TCC
<i>FASN</i>	100861286	Ácido graxo sintase	TTC TT R: TCT CTG GAT GGC TTG GTA G F: CTG ATT CAG CAG
<i>DGAT1</i>	100861225	Diacilglicerol O- aciltransferase	TGG ATG G R: GAG TGG AAG AGC CAG TAG A F: CGG TGC AGG ATG
<i>GK</i>	102170215	Glicerol quinase	TTA GTT C R: CCC TAG TGG TAC AGT GGT TA F: GGA TGT CCG AGG
<i>PCK1</i>	102168742	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase 1(citosólica)	AGG ATT T R: CGA TCT TGG ACA GAG GAG AG F: CAC CCT TCG ACA
<i>FBP1</i>	102186015	Frutose-bisfosfatase 1	CCA ATA TC R: AAG CGA GTT GAG CAG TTG F: ACC AAA CTC ACG
<i>GPI</i>	102189150	Glicose-6-fosfato isomerase	CCA TTC R: GCT GTT GAT GTC CCA GAT G F: CAC GAG AGG AAG
<i>GAPDH</i>	100860872	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	AGA GAG TT R: GGG ATG GAA ATG TGT GGA G

A abundância de mRNA foi obtida usando a detecção SYBR Green com GoTaq PCR Master Mix (Promega®, ThermoFisher Scientific, Madison, EUA) por meio de um sistema de detecção ABI Prism 7300 Sequence Thermocycler® (Applied Biosystems®, Foster City, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. A reação consistiu em uma etapa inicial a 95 °C, por dois minutos, uma segunda etapa de 40 ciclos, com a mesma temperatura, por 15 segundos, e uma extensão final, a 60 °C, por 60 segundos. A quantidade de *Threshold Cycle* (Ct) dos genes-alvo foi corrigida com a média do Ct do gene controle (Δ CT). Os valores de expressão relativa foram estimados como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001). O modelo estatístico de base foi: $Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$, em que Y é a variável avaliada; μ é a

constante; T_i é o efeito fixo de tratamento e e_{ij} é o erro aleatório. O dia 0 foi removido dos dados devido à não padronização entre o nascimento e o intervalo de coleta de sangue. Os dados foram avaliados quanto à normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk, e de Bartlett para verificar a homocedasticidade. Para as variáveis que não apresentaram normalidade, foram realizadas transformações (logarítmicas e BoxCox) previamente à análise de variância (ANOVA).

Os parâmetros bioquímicos, produção e composição do leite, peso e consumo de matéria seca foram analisados como medida repetida no tempo, considerando efeito aleatório de animal no tempo. Foram testadas as estruturas de covariância autorregressiva, simetria composta, geral e autorregressão de primeira ordem, sendo o modelo escolhido por meio do critério de informação de Akaike. Após escolha do modelo, os efeitos de tratamento, tempo e interação tratamento tempo foram analisados pelo teste F. Quando pertinente, as médias foram avaliadas pelo teste de Tukey. A abundância relativa de mRNA foi analisada pelo modelo-base e foi considerado o efeito do tempo e sua interação com o tratamento. Os efeitos foram analisados pelo teste F e, quando pertinente, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. A concentração de glicose e o peso dos cabritos foram avaliados pelo modelo de base, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey. A variável prolificidade foi analisada como teste de Kruskal Wallis.

Para compreender a probabilidade de risco de desenvolver toxemia da gestação, foram considerados, como limiar para cetonemia, eventos que apresentavam valor de BHB superior a 0,8 mmol/L (Zamuner *et al.*, 2020a). Posteriormente, os dados de BHB foram submetidos à regressão logística, usando uma distribuição binária e função *link* “probit”, sendo os parâmetros convertidos em razão de chance. Para todas as análises, valores de $P < 0,05$ foram considerados para indicar diferenças significativas. Todos os procedimentos foram realizados no software R.

2.4. RESULTADOS

Dos 48 animais avaliados, seis cabras apresentaram algum tipo de enfermidade durante o período experimental. Cinco cabras apresentaram doença no trato reprodutivo, sendo um prolapso uterino no pós-parto, duas retenções de placenta e dois abortos. Um animal foi eutanasiado devido à fratura do membro

posterior direito. Os animais foram diagnosticados por um médico veterinário e tratados de acordo com a enfermidade. Todos foram removidos do experimento para tratamento e as coletas foram consideradas apenas antes do diagnóstico da enfermidade.

As cabras que receberam dieta padrão de energia associada ao PG tiveram 84,7% menos chances de desenvolver cetonemia. Enquanto com a associação do PG e a dieta de alta energia, a chance de desenvolver cetonemia foi de 79,2% (Tabela 3). Observou-se maior frequência de um mesmo animal desenvolver cetonemia ao longo do tempo, em cabras que não receberam PG (Tabela 3).

Tabela 3. Modelo logístico para predição de toxemia da gestação (BHB \geq 0,8 mmol/L) em cabras leiteiras, durante o período de transição, alimentadas com diferentes estratégias de acréscimo de energia

Dieta	Animal (n)	BHB ⁵ \geq 0,8 mmol/L (Eventos/N º coletas)	Razão de chances	Intervalo de confiança de 95%	P-valor
AP ¹	4	(7/75)	0,208	0,097 - 0,449	<0,001
PP ²	3	(4/73)	0,153	0,068 - 0,345	<0,001
A ³	5	(13/76)	0,289	0,136 - 0,612	0,001
P ⁴	5	(15/76)	0,319	0,153 - 0,667	0,002

¹AP: alta energia associada ao propilenoglicol.

²PP: baixa energia associada ao propilenoglicol.

³A: alta energia sem propilenoglicol.

⁴P: baixa energia sem propilenoglicol.

⁵BHB: β -hidroxibutirato.

No que se refere aos marcadores do metabolismo proteico, cabras que foram alimentadas com alta energia e PG e dieta padrão de energia e PG tiveram maior concentração de creatinina em relação às cabras que receberam dieta padrão de energia ($p = 0,010$, Tabela 4). Sobre o perfil enzimático, a concentração de GGT foi menor em cabras que foram alimentadas com dieta padrão de energia em relação às cabras que receberam alta energia e PG e padrão de energia e PG ($p=0,034$, Tabela 4). As concentrações dos demais marcadores energéticos, proteicos e enzimáticos não foram influenciados pela dieta (Tabela 4).

Tabela 4. Perfil metabólico de cabras leiteiras suplementadas com diferentes estratégias de acréscimo de energia no período de transição

Metabólito	Dieta ⁵				EPM	P-valor ⁶		
	AP	PP	A	P		Supl	Dia	S vs D

Glicose ¹	55,0	54,0	53,0	51,9	0,46	0,209	0,025	0,169
Lactato ¹	4,40	4,38	4,04	4,37	0,12	0,812	0,112	0,002
BHB ²	0,36	0,39	0,41	0,40	0,01	0,925	0,017	0,377
AGL ²	0,17	0,19	0,17	0,18	0,01	0,942	0,008	0,674
Triglicerídeos ¹	20,1	17,7	20,1	17,7	0,72	0,409	<0,001	0,086
Colesterol ¹	61,5	62,9	64,3	64,4	1,04	0,971	0,057	0,070
Albumina ³	2,32	2,41	2,40	2,41	0,02	0,302	0,011	0,999
PT ³	5,12	5,57	5,5	5,18	0,04	0,079	<0,001	0,892
Ureia ¹	22,3	26,6	23,9	25,4	0,91	0,304	0,001	0,092
Creatinina ¹	1,14 ^a	1,14 ^a	1,08 ^{ab}	1,04 ^b	0,01	0,010	0,136	0,954
FA ⁴	36,9	30,5	33,9	37,6	1,18	0,515	0,003	0,617
ALT ⁴	12,6	13,8	13,1	11,0	0,25	0,146	0,006	0,048
AST ⁴	83,3	81,2	74,7	69,5	1,34	0,257	0,001	0,394
GGT ⁴	48,3 ^a	49,0 ^a	45,1 ^{ab}	36,4 ^b	0,86	0,034	<0,001	0,150

^{a-c} Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as colunas.

¹ mg/dL.

² mmol/L, metabólitos: BHB: β -hidroxibutirato; AGL: ácidos graxos não-esterificados.

³ g/dL, metabólitos: PPT: proteína plasmática total.

⁴ U/L, metabólitos: FA: fosfatase alcalina; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; GGT: gama glutamil transferase.

⁵ Dietas: AP= dieta de alta energia associada ao propilenoglicol; PP= dieta padrão de energia associada ao propilenoglicol; A= dieta de alta energia; P= dieta padrão de energia.

⁶ Probabilidade de efeitos: Supl = efeito da suplementação energética; Dia = efeito de dia; S vs D = efeito da interação entre suplementação e dia.

As cabras, independentemente da dieta, tiveram maior concentração de glicose nos dias 5 e 10 em relação aos dias -14 e -5 (Figura 1a, $p = 0,025$). Houve efeito da interação entre suplementação (S) e dia (D, S vs D) sobre a concentração de lactato (Tabela 4). A concentração de lactato foi maior no dia 3, para cabras alimentadas com dieta padrão de energia ($p = 0,002$, Figura 1b) em relação ao dia 10 para cabras alimentadas com dieta de alta energia e PG. A concentração de Beta-hidroxibutirato (BHB) foi menor no dia -14 em relação aos dias -10 pré-parto e 3, 5, 10 e 14 pós-parto (Figura 1c, $p = 0,017$). Já a concentração de ácidos graxos livres (AGL) foi menor no dia -10 pré-parto em relação aos dias 3, 5, 10 e 14 do pós-parto (Figura 1d, $p = 0,008$). E a concentração de triglicerídeos foi maior nos dias -14 e -10 pré-parto em relação aos dias 10 e 14 pós-parto (Figura 1e, $p < 0,0001$).

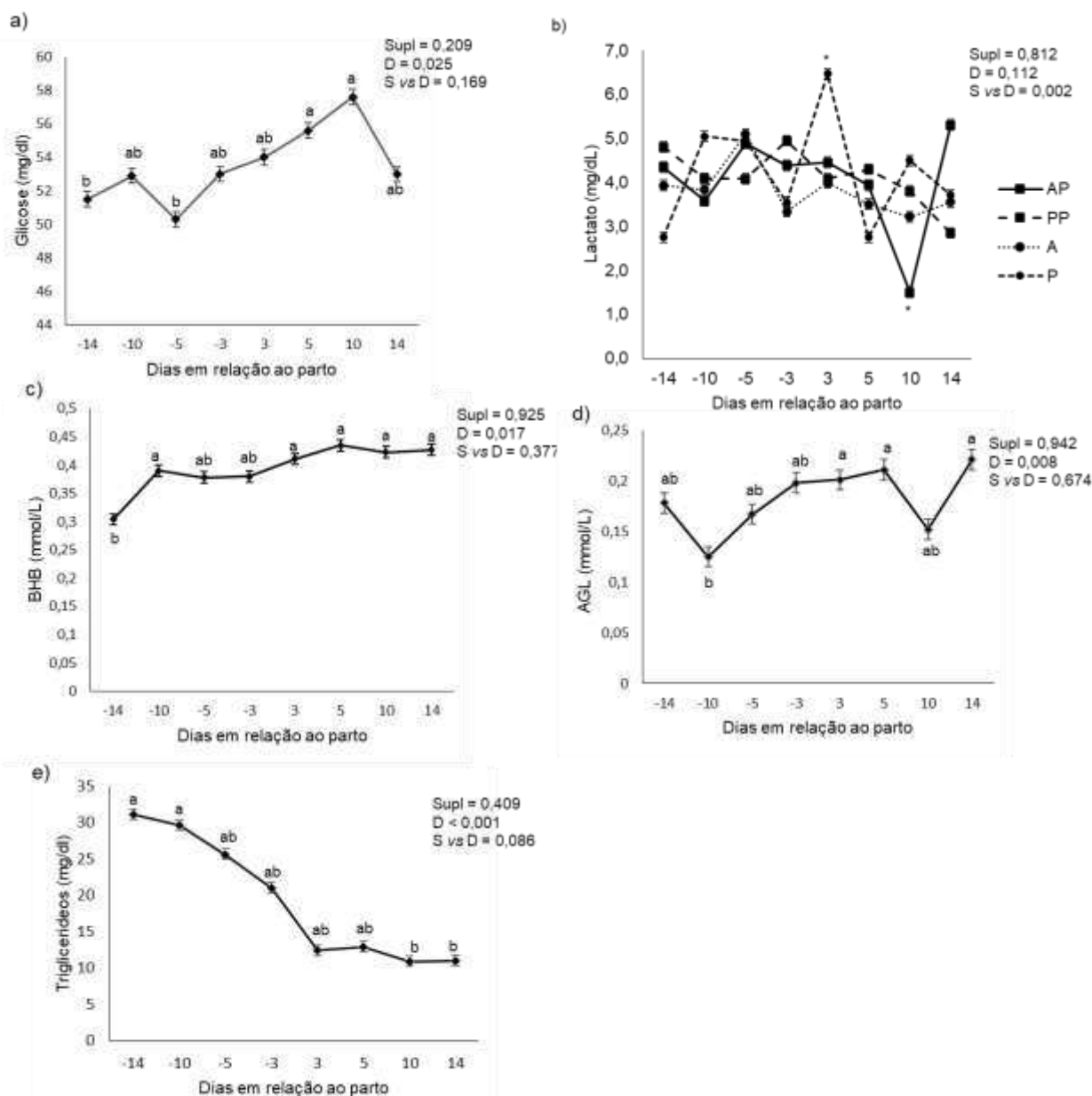


Figura 1. Concentrações séricas de glicose (a), lactato (b), Beta-hidroxibutirato (BHB, c), ácidos graxos livres (AGL, d) e triglicerídeos (e) de cabras leiteiras suplementadas com diferentes estratégias de acréscimo de energia durante o período de transição. Dietas: AP= dieta de alta energia associada ao propilenoglicol; PP= dieta padrão de energia associada ao propilenoglicol; A= dieta de alta energia; P= dieta padrão de energia. Probabilidade de efeitos: S= efeito da suplementação energética; D = efeito de dia; S vs D = efeito da interação entre suplementação e dia.

O efeito de dia foi observado nas concentrações de albumina, proteína total e ureia, independentemente da dieta. As cabras tiveram maior concentração de albumina no dia 14 pós-parto em relação aos dias -5 pré-parto e 3 pós-parto (Figura 2a, $p = 0,011$). A concentração de proteína total (PT) aumentou ao longo do tempo

(Figura 2b, $p < 0,001$). E a concentração de ureia foi maior nos dias 5 e 10 pós-parto em relação aos dias -14, -10, -5 e -3 pré-parto (Figura 2c, $p = 0,001$).

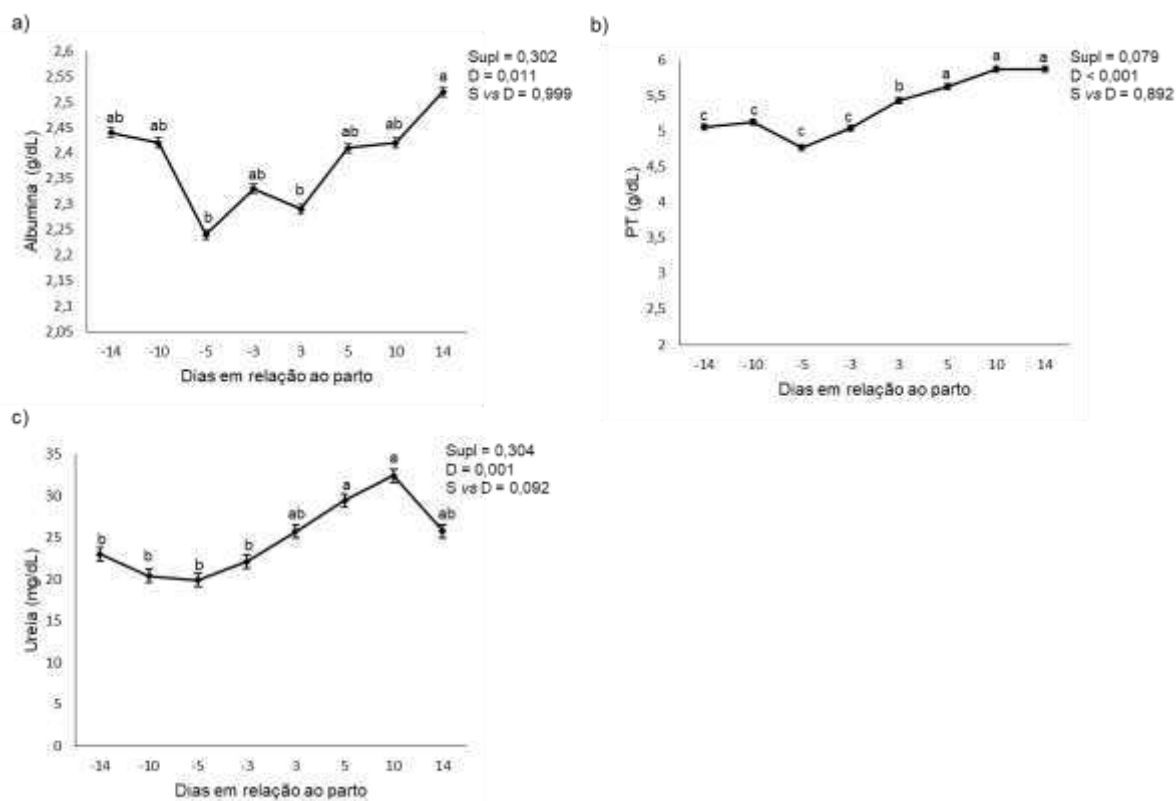


Figura 2. Concentrações séricas de albumina (a), proteína total (PT, b), ureia (c) de cabras leiteiras suplementadas com diferentes estratégias de acréscimo de energia durante o período de transição. Probabilidade de efeitos: S= efeito da suplementação energética; D = efeito de dia; S vs D = efeito da interação entre suplementação e dia.

De maneira semelhante, foi observado efeito de dia sobre as concentrações de fosfatase alcalina, alanina aminotransferase (ALT), apartato aminotransferase (AST) e gama glutamiltransferase (GGT), independentemente da dieta. A concentração de fosfatase alcalina foi maior no dia -10 pré-parto em relação aos dias 5, 10 e 14 pós-parto (Figura 3a, $p = 0,003$). A concentração de ALT foi maior nos dias -10 pré-parto e 5 pós-parto em relação aos dias 10 e 14 pós-parto (Figura 3b, $p = 0,006$). Enquanto a concentração de AST foi maior no pós-parto em relação ao pré-parto, exceto o dia -3 (Figura 3c, $p = 0,001$). E a concentração de GGT aumentou ao longo do tempo (Figura 3d, $p < 0,001$).

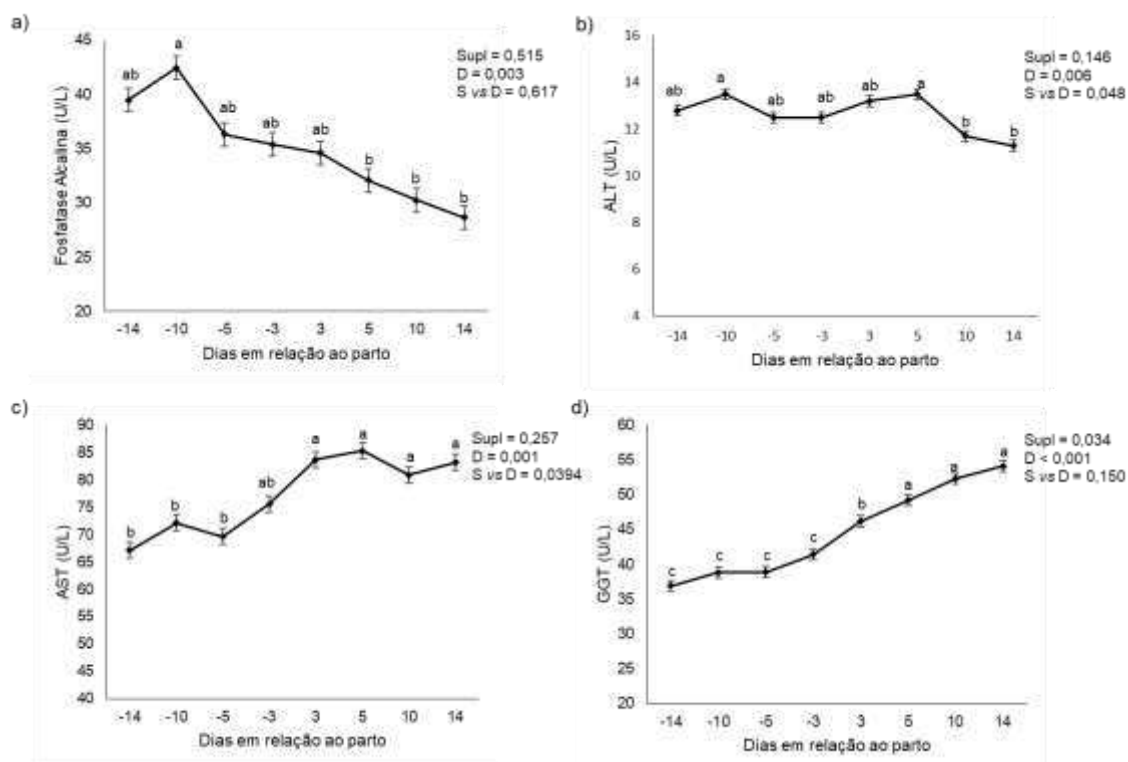


Figura 3. Concentrações séricas de fosfatase alcalina (a), alanina aminotransferase (ALT, b), aspartato aminotransferase (AST, c) e gama glutariltransferase (GGT, d) de cabras leiteiras suplementadas com diferentes estratégias de acréscimo de energia durante o período de transição. Dietas: AP= dieta de alta energia associada ao propilenoglicol; PP= dieta padrão de energia associada ao propilenoglicol; A= dieta de alta energia; P= dieta padrão de energia. Probabilidade de efeitos: S= efeito da suplementação energética; D = efeito de dia; S vs D = efeito da interação entre suplementação e dia.

Os genes ligados a enzimas relacionadas à gliconeogênese, *FBP1* (frutose bifosfatase, $p = 0,007$) e *PCK1* (fosfoenolpiruvato carboxilase, $p < 0,001$), foram mais expressos nas cabras que não foram suplementadas com PG, independentemente do nível de energia da dieta (A e P, Tabela 6). Porém, as cabras que foram alimentadas com dieta de alta energia, associada ao PG, tiveram o gene relacionado ao metabolismo dos corpos cetônicos, *HMGCSL1* (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintase), menos expresso que as cabras que receberam A e P ($p = 0,001$, Tabela 6). O gene *ACSL1* (acil-CoA sintetase de cadeia longa), relacionado à síntese de ácidos graxos, foi mais expresso em cabras alimentadas somente com dieta padrão de energia (P).

Tabela 5. Abundância relativa de mRNA de marcadores do metabolismo energético do fígado de cabras leiteiras suplementadas com diferentes estratégias de acréscimo de energia no período de transição

Variável	Dieta ²				EPM	P-valor ³		
	AP	PP	A	P		Supl	Dia	S vs D
Gliconeogênese								
<i>PCK1</i> ¹	16,65 ^b	25,35 ^b	89,46 ^a	113,12 ^a	11,13	<0,001	0,650	0,559
<i>FBP1</i> ¹	15,06 ^{bc}	10,46 ^c	19,60 ^{ab}	23,51 ^a	1,87	0,007	0,883	0,174
<i>GPI</i> ¹	1,20	1,17	1,11	1,12	0,09	0,986	0,083	0,135
Cetogênese								
<i>HMGCSL1</i> ¹	3,06 ^c	5,36 ^{bc}	18,64 ^a	7,47 ^b	2,35	0,001	0,929	0,543
<i>HMGCL</i> ¹	1,32	1,25	1,28	1,42	0,15	0,983	0,601	0,367
Beta-oxidação								
<i>CPTA1A</i> ¹	0,99	1,00	0,99	1,00	1,12	1,000	0,883	0,714
<i>CPT2</i> ¹	1,20	1,01	1,17	1,12	0,08	0,860	0,392	0,310
Síntese de AG								
<i>ACSL1</i> ¹	11,81 ^c	12,22 ^c	23,49 ^b	36,61 ^a	1,87	0,001	0,177	0,941
<i>FASN</i> ¹	2,37	1,90	2,01	1,79	0,34	0,952	0,361	0,773
<i>ACACA</i> ¹	1,07	1,00	1,00	0,99	0,21	0,997	0,398	0,092
Síntese de TAG								
<i>DGAT</i> ¹	1,26	1,03	1,15	1,05	0,08	0,635	0,012	0,010
<i>GK</i> ¹	1,25	1,07	1,12	1,12	0,09	0,909	0,070	0,242

^{a-c} Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as colunas.

¹ abundância relativa, variável: *PCK1* = fosfoenolpiruvato carboxiquinase 1; *FABP1* = frutose-bisfosfatase 1; *GPI* = glicose-6-fosfato isomerase; *HMGCSL1* = 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintase 1; *HMGCL* = 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA liase; *CPTA1A* = carnitina palmitoiltransferase 1^a; *CPT2* = carnitina palmitoiltransferase 2; *ACSL1* = acil-CoA sintetase de cadeia longa; *FASN* = ácido graxo sintase; *ACACA* = acetil-CoA carboxilase alfa; *DGAT* = diacilglicerol O-aciltransferase; *GK* = glicerol quinase.

² Dietas: AP: dieta de alta energia associada ao propilenoglicol; PP: dieta padrão de energia associada ao propilenoglicol; A: dieta de alta energia; P: dieta padrão de energia.

³ Probabilidade de efeitos: Supl= efeito da suplementação energética; Dia = efeito de dia; S vs D = efeito da interação entre suplementação dia.

Houve efeito da interação S vs D sobre a expressão relativa do gene *DGAT1* hepático (Tabela 5). Cabras leiteiras alimentadas com dieta de alta energia e PG tiveram maior expressão do gene *DGAT1* no dia 15 pós-parto em relação aos dias -20 e -10 pré-parto do mesmo grupo e em relação às cabras alimentadas com dieta padrão de energia e PG no dia -20 pré-parto, cabras alimentadas com dieta de alta energia nos dias -20 e -10 pré-parto e cabras alimentadas com dieta padrão de energia no dia 15 pós-parto (Figura 4, $p = 0,010$).

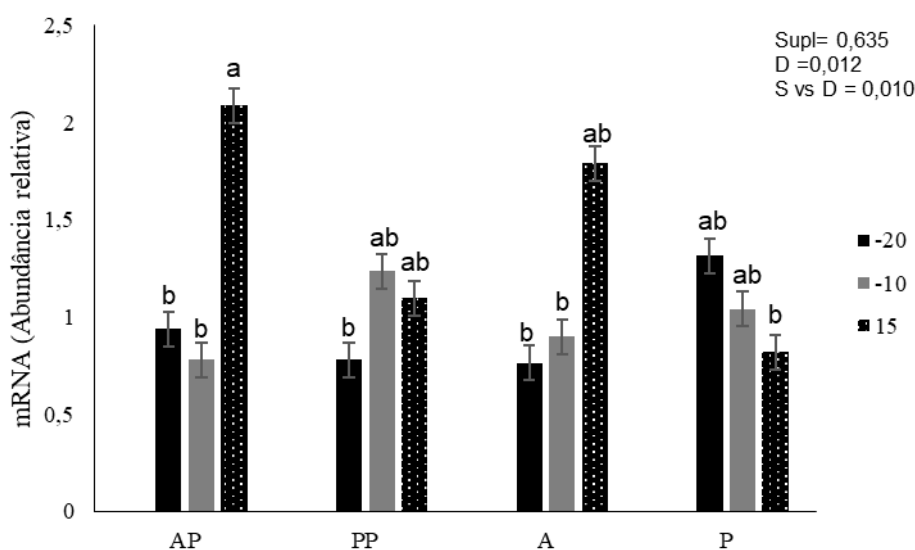


Figura 4. Abundância relativa do gene *DGAT1* de cabras leiteiras suplementadas com diferentes estratégias de acréscimo de energia durante o periparto. Dietas: AP= dieta de alta energia associada ao propilenoglicol; PP= dieta padrão de energia associada ao propilenoglicol; A= dieta de alta energia; P= dieta padrão de energia. Probabilidade de efeitos: S= efeito da suplementação energética; D = efeito de dia; S vs D = efeito da interação entre suplementação e dia.

As cabras que receberam dieta padrão de energia com PG apresentaram maior massa corporal média que as cabras que receberam somente dieta padrão de energia (P, Tabela 6). Todas as cabras reduziram a massa corporal no período pós-parto. O consumo de matéria seca (CMS) foi superior em cabras que receberam dieta de alta energia (A, 1,189 kg.dia⁻¹) em relação às cabras que foram alimentadas com P (0,981 kg.dia⁻¹, p=0,004, Tabela 6).

As cabras que receberam dieta de alta energia e PG produziram menos leite em relação às cabras que receberam as outras dietas (p=0,002). Em relação à composição do leite, as cabras que receberam somente dieta padrão apresentaram maior concentração de gordura (5,25%, p=0,04) e proteína (3,21 g/kg⁻¹, p<0,001) em comparação com as cabras que receberam dieta padrão associada ao PG. Consequentemente, foi observada diferença, entre esses grupos, no extrato seco total. As cabras que foram alimentadas com dieta padrão apresentaram maior concentração de ureia no leite (21,3 mg/dL) em comparação com as cabras alimentadas com alta energia e alta energia e PG (p=0,0002, Tabela 6).

Tabela 6. Massa corporal, consumo de matéria seca (CMS), produção e composição do leite de cabras leiteiras suplementadas com diferentes estratégias de energia durante o periparto

Variável	Dieta ⁵				EPM	P-valor		
	AP	PP	A	P		Supl	Dia	S vs D
Massa corporal ¹	62,4 ^{ab}	66,7 ^a	66,6 ^{ab}	59,7 ^b	1,116	0,024	<0,001	0,999
CMS ²	1,04 ^{ab}	1,17 ^{ab}	1,19 ^a	0,98 ^b	0,021	0,004	0,298	0,977
Produção de leite ²	1,44 ^b	2,55 ^a	2,14 ^a	2,37 ^a	0,11	0,002	0,499	0,869
Gordura ³	4,19 ^{ab}	4,09 ^b	4,17 ^{ab}	5,25 ^a	0,14	0,044	0,121	0,598
Proteína ³	3,27 ^a	2,91 ^b	3,03 ^b	3,21 ^a	0,04	<0,001	<0,001	0,267
Lactose ³	4,48	4,32	4,42	4,35	0,04	0,671	0,620	0,553
EST ³	13,0 ^{ab}	12,0 ^{b*}	12,4 ^{ab}	13,5 ^{a*}	0,19	0,071	0,486	0,352
Ureia ⁴	12,4 ^b	17,3 ^{ab}	12,7 ^b	21,3 ^a	0,88	<0,001	0,684	0,159

^{a-c} Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as colunas.

* Indica tendência significativa ($p < 0,10$ a $p > 0,05$) entre as colunas.

¹ kg.

² kg.dia⁻¹.

³ g.kg⁻¹.

EST= extrato seco total.

⁴ mg/dL.

⁵ Dietas: AP: dieta de alta energia associada ao propilenoglicol; PP: dieta padrão de energia associada ao propilenoglicol; A: dieta de alta energia; P: dieta padrão de energia.

⁶ Probabilidade de efeitos: Supl= efeito da suplementação energética; Dia = efeito de dia; S vs D = efeito da interação entre suplementação e dia.

Houve efeito de dia em relação a massa corporal e concentração de proteína no leite das cabras, independentemente da dieta (Tabela 6). As cabras reduziram a massa corporal a partir do dia do parto (Figura 5a, $p < 0,001$). Já a concentração de proteína no leite foi maior no dia 7 em relação aos dias 14 e 21 pós-parto (Figura 5b, $p < 0,001$).

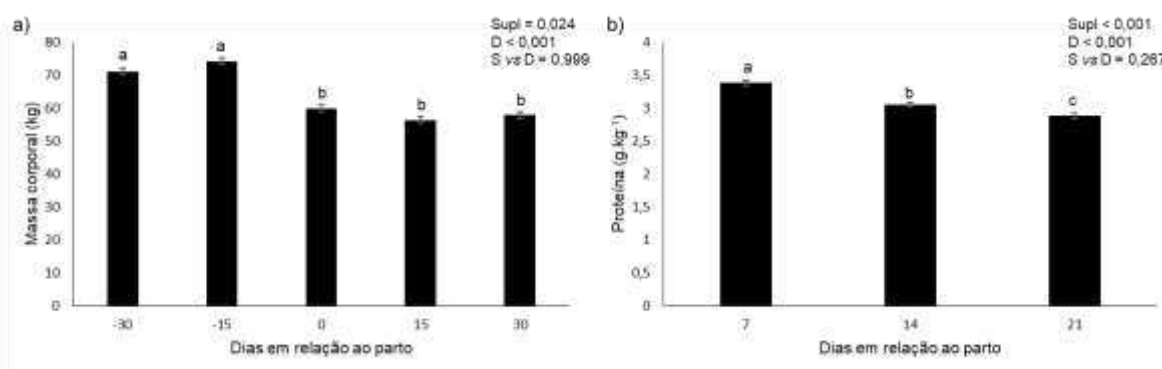


Figura 5. Massa corporal (a) e proteína do leite (b) de cabras leiteiras suplementadas com diferentes estratégias de acréscimo de energia durante o periparto. Probabilidade de efeitos: S= efeito da suplementação energética; D = efeito de dia; S vs D = efeito da interação entre suplementação e dia.

2.5. DISCUSSÃO

Pelos resultados verifica-se que as cabras alimentadas com dieta padrão de energia e PG tiveram menor chance de desenvolver um quadro de cetonemia (BHB $\geq 0,8$ mmol/L). Esses resultados estão de acordo com estudos em vacas leiteiras, nos quais demonstrou-se recuperação mais rápida em vacas cetóticas tratadas com PG (McArt *et al.*, 2011). Em trabalhos anteriores presumia-se que a redução da cetonemia por meio do PG ocorresse com melhora nos marcadores de metabolismo energético e, em especial, aumento das concentrações de glicose e lactato e redução das concentrações de BHB e AGL. Porém, esses marcadores apresentaram médias semelhantes entre as dietas (Tabela 4).

A semelhança do metabolismo energético entre as cabras pode ser explicado pela capacidade da manutenção do *status* energético por todas as dietas fornecidas, por meio de mecanismos distintos. Essa suposição é reforçada a partir da análise da expressão gênica. Cabras alimentadas com dieta de alta energia e dieta padrão de energia tiveram maior abundância relativa na expressão dos genes *PCK1* e *FBP1*. Esses genes participam das principais etapas da gliconeogênese. A *PCK1* realiza a carboxilação do oxaloacetato a fosfoenolpiruvato, enquanto a *FBP1* participa da hidrólise da frutose-1,6-bifosfato (Zhang *et al.*, 2016). Provavelmente, nestes grupos, a gliconeogênese foi mais ativada por meio da utilização de substratos de origem proteica ou via aumento de propionato, no caso do grupo A, por intermédio da adição de milho na ração. Outro mecanismo fisiológico utilizado, pelos grupos A e P, para poupar energia, durante o periparto foi a utilização da cetogênese. Houve maior expressão do gene *HMGCSL1*, reconhecidamente a etapa iniciante e limitante da cetogênese (Hegardt, 1999, Tabela 5).

Nossos resultados demonstram que a suplementação de PG não atua por meio do aumento da gliconeogênese como era proposto anteriormente (Nielsen e Ingvarsen, 2004; McArt *et al.*, 2011). De fato, há redução da cetogênese, o que foi demonstrado pela redução da chance de risco de desenvolver toxemia da gestação, quanto redução da expressão gênica do gene *HMGCSL1*, nos grupos que receberam PG. Entretanto, era suposto que tal efeito ocorria por meio do aumento

dos substratos, como lactato, favorecendo a gliconeogênese, o que não foi demonstrado em nossos resultados (Figura 1 e Tabela 5). Uma justificativa possível foi demonstrada no trabalho realizado por Kristensen e Raun (2007). Os autores sugerem que um dos modos de ação do PG seria por meio da resistência à insulina, induzida pelo aumento de propanol e PG no sangue, poupando, desta maneira, a utilização de glicose pelos tecidos periféricos e reduzindo a lipólise e a cetonemia.

As cabras que foram alimentadas com P apresentaram menor CMS e, conseqüentemente, menor massa corporal (Tabela 6). Presume-se que neste grupo, as funções fisiológicas como a gestação e lactação foram priorizadas, resultando no déficit de energia para manutenção de processos metabólicos secundários, como a manutenção da massa muscular. Essa suposição é reforçada pela demonstração de maior produção de leite no grupo P (Tabela 6). A maior quantidade de substratos que chegam à glândula mamária, por meio da mobilização dos tecidos, contribuem para a síntese dos componentes do leite, o que gera aumento da produção de leite (Bell e Bauman, 1997).

Esperava-se que o acréscimo do nível de energia via dieta de alta energia combinado com PG, promovessem maior aporte de glicose para a função da lactação, o que não foi observado (Tabela 6). Supõe-se que a combinação de alta energia com PG pode modificar o metabolismo ruminal e, conseqüentemente reduz a produção de leite nesse grupo. Em trabalhos anteriores, foi observada que suplementação com PG pode modificar a microbiota ruminal e alterar a produção de intermediários (Nielsen e Ingvarsen, 2004; Wang *et al.*, 2021). Adicionalmente, também foi relatado que a condição de superalimentação reduz o pH ruminal por pelo menos três horas ao dia, alterando a microbiota ruminal e interferindo diretamente na produtividade (Plaizier *et al.*, 2008; Khafipour *et al.*, 2009). Essa suposição é reforçada pela menor concentração de ureia no leite das cabras alimentadas com alta energia e PG, indicando redução da produção de proteína microbiana ruminal, uma vez que as dietas apresentavam conteúdo semelhante de proteína dietética (Tabela 1).

A suplementação energética, no periparto de cabras leiteiras, por meio da dieta padrão de energia, com suplementação de PG, parece ser uma alternativa mais vantajosa, em virtude da redução do risco de desenvolvimento de toxemia da gestação devido à redução da cetogênese. Porém, efeitos proeminentes sobre o *status* metabólico, principalmente sobre as concentrações de glicose e lactato,

podem não ser observados, uma vez que o mecanismo de ação está centralizado na atenuação da síntese de corpos cetônicos.

2.6. CONCLUSÃO

O acréscimo de energia, por meio da dieta padrão de energia com a suplementação de propilenoglicol, previne a ocorrência de toxemia da gestação, reduz a cetonemia no periparto de cabras leiteiras, por meio da inibição das vias cetogênicas.

2.7. AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de doutorado (Processo 140679/2019-7) e da bolsa de Produtividade em Pesquisa (Processo 310676/2016-9 - Chamada CNPq N^o 12/2016).

2.8. REFERÊNCIAS

- AFRC. 1993. Energy and protein requirements of ruminants. Commonwealth Agricultural Bureaux International, ed.
- Barbagianni, M.S., S.A. Spanos, K.S. Ioannidi, N.G.C. Vasileiou, A.I. Katsafadou, I. Valasi, P.G. Gouletsou, and G.C. Fthenakis. 2015. Increased incidence of peri-parturient problems in ewes with pregnancy toxemia. *Small Ruminant Research* 132:111–114. doi:10.1016/J.SMALLRUMRES.2015.10.017.
- Barbosa, L.P., M.T. Rodrigues, J.D. Guimarães, C.A.A. Torres, G.R. Carvalho, L.S. Amorim, and P.A. Dutra. 2016. Influência da condição corporal ao parto no balanço energético e desempenho reprodutivo de cabras leiteiras no pós-parto. *Arq Bras Med Vet Zootec* 68:1283–1291. doi:10.1590/1678-4162-8371.
- Bell, A.W., and D.E. Bauman. 1997. Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2:265–278. doi:10.1023/A:1026336505343.
- Brozos, C., V.S. Mavrogianni, and G.C. Fthenakis. 2011. Treatment and Control of Peri-Parturient Metabolic Diseases: Pregnancy Toxemia, Hypocalcemia,

Hypomagnesemia. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 27:105–113. doi:10.1016/j.cvfa.2010.10.004.

Cal-Pereyra, L., J.R. González-Montaña, A. Benech, J. Acosta-Dibarrat, M. Martín, S. Perini, M. Abreu, S. Da Silva, and P. Rodríguez. 2015. Evaluation of three therapeutic alternatives for the early treatment of ovine pregnancy toxemia. *Ir Vet J* 68:1–7. doi:10.1186/s13620-015-0053-2.

El-Kasrawy, N.I., A.A. Swelum, M.A. Abdel-Latif, A.E.W.A. Alsenosy, N.A. Beder, S. Alkahtani, M.M. Abdel-Daim, and A.H. Abd El-Aziz. 2020. Efficacy of different drenching regimens of gluconeogenic precursors during transition period on body condition score, production, reproductive performance, subclinical ketosis and economics of dairy cows. *Animals* 10. doi:10.3390/ani10060937.

Grummer, R.R. 1993. Etiology of Lipid-Related Metabolic Disorders in Periparturient Dairy Cows. *J Dairy Sci* 76:3882–3896. doi:10.3168/jds.S0022-0302(93)77729-2.

Harmeyer, J., and C. Schlumbohm. 2006. Pregnancy impairs ketone body disposal in late gestating ewes: Implications for onset of pregnancy toxemia. *Res Vet Sci* 81:254–264. doi:10.1016/j.rvsc.2005.10.010.

Hegardt, F.G. 1999. Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase: a control enzyme in ketogenesis. *Biochemical Journal* 338:569. doi:10.1042/0264-6021:3380569.

Johnson, R.B. 1954. The treatment of ketosis with glycerol and propylene glycol. *Cornell Veterinarian* 44:6–21.

Khafipour, E., D.O. Krause, and J.C. Plaizier. 2009. A grain-based subacute ruminal acidosis challenge causes translocation of lipopolysaccharide and triggers inflammation. *J Dairy Sci* 92:1060–1070. doi:10.3168/jds.2008-1389.

Kristensen, N.B., and B.M.L. Raun. 2007. Ruminal and intermediary metabolism of propylene glycol in lactating Holstein cows. *J Dairy Sci* 90:4707–4717. doi:10.3168/jds.2007-0295.

Livak, K.J., and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25:402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262.

- Mach, N., Y. Blum, A. Bannink, D. Causeur, M. Houee-Bigot, S. Lagarrigue, and M.A. Smits. 2012. Pleiotropic effects of polymorphism of the gene diacylglycerol-O-transferase 1 (DGAT1) in the mammary gland tissue of dairy cows. *J Dairy Sci* 95:4989–5000. doi:10.3168/jds.2012-5348.
- McArt, J.A.A., D. V. Nydam, P.A. Ospina, and G.R. Oetzel. 2011. A field trial on the effect of propylene glycol on milk yield and resolution of ketosis in fresh cows diagnosed with subclinical ketosis. *J Dairy Sci* 94:6011–6020. doi:10.3168/jds.2011-4463.
- McFadden, J.W. 2020. Review: Lipid biology in the periparturient dairy cow: contemporary perspectives. *Animal* 14:s165–s175. doi:10.1017/S1751731119003185.
- Mota, C.J.A., C.X.A.D. Silva, and V.L.C. Gonçalves. 2009. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. *Quim Nova* 32:639–648. doi:10.1590/S0100-40422009000300008.
- Nielsen, N.I., and K.L. Ingvarsten. 2004. Propylene glycol for dairy cows: A review of the metabolism of propylene glycol and its effects on physiological parameters, feed intake, milk production and risk of ketosis. *Anim Feed Sci Technol* 115:191–213. doi:10.1016/j.anifeedsci.2004.03.008.
- Plaizier, J.C., D.O. Krause, G.N. Gozho, and B.W. McBride. 2008. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences. *The Veterinary Journal* 176:21–31. doi:10.1016/J.TVJL.2007.12.016.
- Schlumbohm, C., and J. Harmeyer. 2008. Twin-pregnancy increases susceptibility of ewes to hypoglycaemic stress and pregnancy toxæmia. *Res Vet Sci* 84:286–299. doi:10.1016/j.rvsc.2007.05.001.
- Sordillo, L.M., and W. Raphael. 2013. Significance of Metabolic Stress, Lipid Mobilization, and Inflammation on Transition Cow Disorders. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 29:267–278. doi:10.1016/J.CVFA.2013.03.002.
- Vázquez-García, J.M., G. Álvarez-Fuentes, H.O. Orozco-Gregorio, J.C. García-López, M. González-Hernández, and C.A. Rosales-Nieto. 2021. Energy

supplementation during the last third of gestation improves mother–young bonding in goats. *Animals* 11:1–11. doi:10.3390/ANI11020287.

Wang, K., X.M. Nan, Y.G. Zhao, J.J. Tong, L.S. Jiang, and B.H. Xiong. 2021. Effects of propylene glycol on in vitro ruminal fermentation, methanogenesis, and microbial community structure. *J Dairy Sci* 104:2924–2934. doi:10.3168/jds.2020-18974.

Weber, C., C. Hametner, A. Tuchscherer, B. Losand, E. Kanitz, W. Otten, H. Sauerwein, R.M. Bruckmaier, F. Becker, W. Kanitz, and H.M. Hammon. 2013. Hepatic gene expression involved in glucose and lipid metabolism in transition cows: Effects of fat mobilization during early lactation in relation to milk performance and metabolic changes. *J Dairy Sci* 96:5670–5681. doi:10.3168/JDS.2012-6277.

Zainal Ulum, M.T., M.A. Ab Azid, T.W. Shen, H.A. Hassim, M. Zamri-Saad, and A. Salleh. 2021. Histopathological changes in the reproductive organs of does with pregnancy toxemia and their aborted fetuses. *Small Ruminant Research* 199:106363. doi:10.1016/J.SMALLRUMRES.2021.106363.

Zhang, F., X. Nan, H. Wang, Y. Zhao, Y. Guo, and B. Xiong. 2020. Effects of propylene glycol on negative energy balance of postpartum dairy cows. *Animals* 10:1–15. doi:10.3390/ani10091526.

Zhang, Q., S.L. Koser, and S.S. Donkin. 2016. Propionate induces mRNA expression of gluconeogenic genes in bovine calf hepatocytes. *J Dairy Sci* 99:3908–3915. doi:10.3168/JDS.2015-10312.

3. CAPÍTULO 2

Communication

ASSOCIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE BETA-HIDROXIBUTIRATO E ÁCIDOS GRAXOS LIVRES COM O PERFIL METABÓLICO E A PRODUÇÃO DE LEITE DE CABRAS LEITEIRAS DURANTE PERIPARTO²

3.1. RESUMO SIMPLES

A cetonemia é um distúrbio metabólico que apresenta consequências na saúde e produção dos ruminantes. As consequências metabólicas de um único aumento da concentração de beta-hidroxibutirato (BHB) parecem ser suficientes para modificar o metabolismo, sobretudo o energético e a composição do leite. Diante disso, o monitoramento do metabolismo energético torna-se indispensável, podendo ser avaliado por meio dos valores de ácidos graxos não-esterificados e BHB em rebanhos caprinos no periparto.

3.2. RESUMO

Objetivou-se avaliar o perfil bioquímico e suas correlações, em cabras leiteiras, com cetonemia durante o período de transição, bem como seus efeitos sobre a produção e a composição do leite. Foram monitoradas 48 cabras leiteiras, a partir de 135 dias de gestação até 15 dias após o parto. Foram realizadas colheitas de sangue, nos dias 14, 10, 5 e 3 pré-parto, parto e 3, 5, 10 e 14 dias pós-parto. A partir dos resultados obtidos, foi denominado grupo Cetose, ascabras com beta-hidroxibutirato (BHB) $\geq 0,8$ mmol/L. E cabras com valores inferiores foram denominadas grupo Saudável. O perfil bioquímico foi composto pelos metabólitos energéticos, proteicos e enzimáticos. Após o parto, foi medida a produção e a composição do leite nos dias 7, 14 e 21. Os parâmetros bioquímicos e a produção de leite foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA). Foi utilizada a análise de correlação ρ de Spearman para avaliar as relações entre a concentração de BHB e ácidos graxos livres (AGL) com os demais metabólitos do sangue. Referente ao metabolismo energético, cabras com cetose apresentaram maiores concentrações de BHB ($p < 0,001$) e AGL ($< 0,001$) e redução das concentrações de glicose ($p < 0,02$),

² Artigo formatado de acordo com as normas da revista Animals

fosfatase alcalina ($p < 0,001$) e colesterol ($p < 0,049$) em relação às cabras do grupo Saudável. Não houve diferença no metabolismo proteico entre os animais ($p > 0,05$). As cabras que apresentaram cetonemia tiveram acúmulo de triglicerídeos, no fígado, em grau moderado, enquanto cabras saudáveis apresentaram grau leve. O aumento de BHB no sangue apresentou correlação moderadamente forte e significativa com a concentração de AGL ($r = 0,65$, $p < 0,001$) e creatinina ($r = 0,62$, $p < 0,001$). O aumento da concentração de AGL também apresentou correlação moderadamente forte e significativa com a concentração de BHB ($r = 0,59$, $p = 0,0003$) e correlação fraca, mas significativa, com a concentração de proteína total ($r = 0,44$, $p = 0,011$). A produção leiteira foi semelhante entre as cabras. A composição do leite foi modificada em cabras com cetonemia ao longo do tempo. Conclui-se que o aumento de BHB sérico ocorre concomitantemente à redução da glicemia e da concentração de colesterol e fosfatase alcalina. Além disso, conclui-se que o BHB e os AGL podem, ambos, ser utilizados como ferramenta diagnóstica do metabolismo energético de cabras leiteiras, durante o período de transição.

Palavras-chave: ácidos graxos livres, cetose, metabolismo, perfil bioquímico.

3.3. INTRODUÇÃO

O aumento da concentração de corpos cetônicos no sangue, sobretudo beta-hidroxiacetato (BHB), é denominado cetonemia. Usualmente, em cabras leiteiras, consideram-se os valores de ácidos graxos livres (AGL) e BHB, obtidos em gado leiteiro, para caracterizar perdas produtivas e de saúde com o transtorno no pré-parto (AGL $\geq 0,3 - 0,5$ e BHB $\geq 0,6 - 0,8$ mmol/L) e pós-parto (AGL $\geq 0,7 - 1,0$ e BHB $\geq 1,0 - 1,4$ mmol/L)[1]. A denominação de cetonemia, na espécie caprina, pode ser definida como toxemia da gestação quando o aumento de BHB ocorre no pré-parto e cetose lactacional, quando há aumento no pós-parto [2].

Comparando a toxemia da gestação e a cetose lactacional, a primeira foi amplamente estudada em pequenos ruminantes, principalmente com objetivo de prevenir, elucidar e tratar clinicamente este transtorno [3,4]. Foram relatados efeitos na reprodução, como a alta frequência de natimortos (62,5%) [4], na condição corporal, no desenvolvimento de mastite no estágio inicial da lactação [5], alta mortalidade perinatal das crias [6]. Porém, recentemente, estudos demonstraram que há maior frequência do transtorno após o parto, semelhante ao que ocorre no

gado leiteiro [2]. As consequências da cetonemia neste período, principalmente o efeito de um único evento sobre o metabolismo e índices produtivos em cabras leiteiras foram pouco documentadas.

Em vacas leiteiras, o aumento da concentração de BHB no sangue inicialmente promove a redução da glicose sanguínea e adaptação endócrina tanto no pré-parto quanto no pós-parto[7]. E, as consequências da elevação de BHB e AGL séricos foram associadas como precedentes de outras doenças metabólicas como deslocamento de abomaso, metrite e retenção de placenta. Desta maneira, o monitoramento do perfil metabólico do sangue é a primeira etapa que deve ser estabelecida para compreender como os distúrbios subclínicos podem afetar as fêmeas durante o periparto [8]. Outras implicações, como os efeitos sobre a infiltração de gordura hepática e os estoques de glicogênio neste tecido podem ajudar a explicar as consequências metabólicas deste transtorno [9].

Diante do exposto, objetivou-se avaliar o perfil sanguíneo correspondente ao metabolismo energético, proteico e enzimático de cabras leiteiras que apresentaram cetonemia (BHB > 0,8 mmol/L) durante o periparto, bem como seus efeitos sobre a produção leiteira, a fim de avaliar os impactos da cetose na espécie. Também buscou-se elucidar a relação da cetonemia e a mobilização de ácidos graxos livres (AGL) sobre os parâmetros bioquímicos para fins de utilização da bioquímica clínica como ferramenta auxiliar de diagnóstico.

3.4. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção (CEUAP) da Universidade Federal de Viçosa, sob número 21/2018 e o experimento foi conduzido de março a junho de 2021, na Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão (UEPE) em Caprinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa.

Foram monitoradas 48 cabras leiteiras, entre a segunda e a terceira ordens de parto, com gestação simples ou gemelar, a partir de 135 dias de gestação até 15 dias após o parto. Durante este período, foram realizadas colheitas de sangue, às 7h00min, nos dias 14, 10, 5 e 3 pré-parto, e 3, 5, 10 e 14 dias pós-parto. Por meio de punção da veia jugular, foi colhido sangue em tubo com ativador de coágulo

(Vacuplast[®], Cotia, Brasil) para as análises de BHB e demais metabólitos, que serão descritos a seguir.

A partir dos resultados obtidos de BHB, foram observados 39 eventos de cetonemia (BHB \geq 0,8 mmol/L), considerados animais cetóticos (Cetose, n= 17). Esses dados foram contrapostos por seus pares similares, ou seja, mesma data relativa ao parto e mesma dieta e suplementação recebida, porém com valores de BHB inferiores a 0,8 mmol/L, formando o grupo de animais saudáveis ou controle (Saudável, n =23). Os dados referentes aos animais com BHB \geq 0,8 mmol/L, mesmo apresentando valores inferiores ao limiar em outros pontos de coletas, não foram considerados para o grupo Saudável. Desta maneira, 17 cabras foram exclusivamente do grupo Cetose, ainda que tenham apresentado somente um evento de cetonemia.

No mesmo dia da colheita de sangue para a análise de BHB, também foi colhido sangue, em tubos *vacutainer* com fluoreto de sódio (Vacuplast[®], Cotia, Brasil) para análise de glicose. Além do BHB, a partir do soro, foram realizadas análises de AGL, colesterol total, triglicerídeos, ureia, albumina, proteínas totais (PT), creatinina, fosfatase alcalina (FA), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamiltransferase (GGT). Todos os metabólitos foram analisados no Laboratório de Fisiologia e Reprodução Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, em equipamento automático para bioquímica, , marca Mindray (Shenzen, China), modelo BS200E, utilizando-se *kits* de determinação da Bioclin: glicose (K082, Belo Horizonte, Brasil), colesterol (K083), triglicerídeos (k117), ureia (K056), albumina (K040), creatinina (K067), PT (K031), FA (K224-2), ALT (K049), AST (K048) e GGT (K080-2) e da Randox (AGL - FA115 e BHB- RB1007, Antrim, Reino Unido). A globulina foi estimada por meio da subtração da proteína total menos a albumina.

O manejo alimentar das cabras consistiu no fornecimento da dieta total, previamente misturada, duas vezes ao dia, às 8h00min e às 15h00min, com ajuste diário da quantidade ofertada para que as sobras representassem 15% do fornecido. A dieta total foi composta por silagem de milho e concentrado à base de milho e farelo de soja e foi formulada com a finalidade de atender as demandas nutricionais de cabras em gestação, considerando 55 kg de peso corporal médio, aos 145 dias de gestação, com prolificidade de 1,5 cabritos, com a seguinte composição dietética: matéria seca (MS) 445,2 g.kg⁻¹ matéria natural (MN), proteína bruta (PB) 125 g.kg⁻¹

MS, fibra em detergente neutro (FDN) 334 g.kg⁻¹ MS e energia metabolizável (EM) 2,9 Mcal.kg⁻¹ MS. Para cabras em lactação, foram considerados 55 kg de peso corporal médio, produção média de 2,5 kg de leite.dia⁻¹, até 30 dias de lactação, com a composição dietética a seguir: MS 436,4 g.kg⁻¹ MN, PB 188 g.kg⁻¹ MS, FDN 351 g.kg⁻¹ MS e EM 2,8 Mcal.kg⁻¹ MS. As exigências de ambas as categorias animais foram calculadas segundo o AFRC [10]. A partir do 135º dia de gestação, 24 cabras receberam suplementação oral de propilenoglicol (90 mL/animal/dia) até o 15º dia após o parto, acrescentando 0,408 Mcal/dia à EM da ração.

Após o parto, as cabras foram ordenhadas duas vezes ao dia, às 6h30min e às 14h00min, e a produção de leite foi registrada a cada sete dias, do sétimo ao 21º dia pós-parto. Nos mesmos dias, foram colhidas amostras para análise da composição do leite (teores de lactose, gordura e proteína), em frasco de polietileno com conservante bronopol, mantidas sob refrigeração (entre 2 e 6 °C) e enviadas para análise no Laboratório de Qualidade do Leite do Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite (EMBRAPA – Gado de Leite), em Juiz de Fora, MG.

Para a quantificação de triglicerídeos e glicogênio hepático, amostras do tecido hepático foram coletadas dos grupos Cetose (n=10) e Saudável (n=14). A biópsia hepática foi realizada por introdução de uma cânula com trocáter no 12º ou 11º espaço intercostal, na altura da tuberosidade ilíaca, após aplicação de lidocaína a 1%. A amostra de fígado foi depositada em uma placa de Petri para limpeza de coágulos e, posteriormente, armazenada em criotubos, a -20 °C, em botijão com nitrogênio líquido, até a realização da quantificação de triglicerídeos e glicogênio.

A extração dos triglicerídeos do tecido hepático foi realizada de acordo com o método proposto por [11] e quantificados por meio de ensaio enzimático colorimétrico (K117, Bioclin®, Belo Horizonte, Brasil), conforme recomendações do fabricante, em equipamento automático para bioquímica, marca Mindray® (Shenzen, China), modelo: BS200E. Para extração e quantificação do glicogênio hepático, foi utilizada a metodologia proposta por [12], com leitura modificada para microplaca, em espectrofotômetro marca Thermo Fisher Scientific®, modelo Multiskan FC (Vantaa, Finlândia), com comprimento de onda de 420 nm.

Os parâmetros bioquímicos e hepáticos e a produção de leite foram analisados conforme o modelo estatístico: $Y_{ij} = \mu + C_i + e_{ij}$, em que Y é a variável avaliada; μ é a constante; C_i é o efeito fixo da condição cetose e e_{ij} é o erro

aleatório, considerando efeito aleatório de animal. O efeito da condição cetose ou saudável foi analisado pelo teste F. Quando pertinente, as médias foram avaliadas pelo teste de Tukey. Para a composição do leite, os dados foram analisados como medida repetida no tempo, considerando efeito aleatório de animal no tempo. Os efeitos da condição cetose, tempo e interação cetose vs tempo foram analisados pelo teste F. Previamente, os dados foram avaliados quanto à normalidade dos resíduos, pelo teste de Shapiro-Wilk e Bartlett, para verificar a homocedasticidade. Para as variáveis que não apresentaram normalidade, foram realizadas transformações (logarítmica e BoxCox).

As correlações ρ de Spearman foram utilizadas para examinar as relações entre a concentração de BHB ($> 0,8$ mmol/L) e AGL (pré-parto: $> 0,3$ mmol/L e pós-parto: $> 0,7$ mmol/L, [13] com os demais metabólitos do sangue. Os valores de ρ foram calculados por meio da aproximação t assintótica. Todos os procedimentos foram realizados no *software* R.

3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o periparto, as cabras leiteiras apresentaram aumento da concentração de BHB no sangue, tanto no pré-parto (34%), quanto no parto (20%) e no pós-parto (46%, Figura 1). Trabalhos realizados na última década, com cabras leiteiras, demonstram aumento crescente dos casos de cetose (pós-parto) em relação à toxemia da gestação (pré-parto), o que se deve, principalmente, ao aumento da produção de leite, mérito genético, melhorias na nutrição e manejo alimentar, proporcionando aumento expressivo da produção logo nas primeiras semanas após o parto [14,15]. Desta maneira, sugerimos que a atenção e o monitoramento do metabolismo energético se estendam além do pré-parto, até o início da lactação de cabras leiteiras.

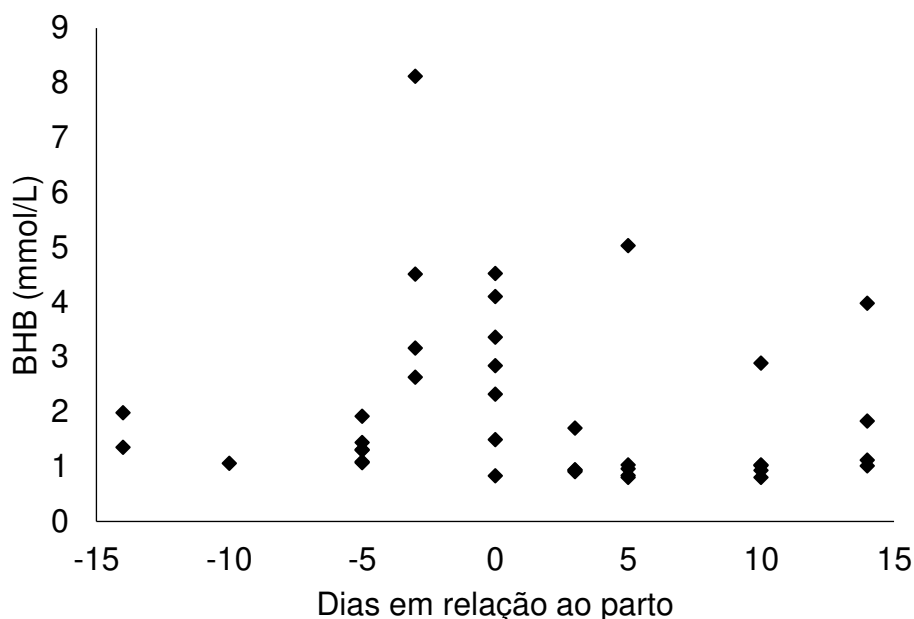


Figura 1. Distribuição dos casos de cetose (β -hidroxibutirato $\geq 0,8$ mmol/L) em cabras leiteiras, durante o parto.

Concomitantemente ao aumento de BHB sérico, foram observadas redução das concentrações de glicose e colesterol e aumento da concentração de AGL em relação às de cabras saudáveis, no mesmo período de coleta (Tabela 1). As concentrações de glicose sérica, em cabras com cetose, foram inferiores aos limites preconizados (50-70 mg/dL)[16], enquanto as cabras saudáveis continuaram normoglicêmicas durante o parto. No organismo dos ruminantes, a hipoglicemia, durante o período de transição, ativa vias metabólicas para reduzir o uso de glicose pelo metabolismo celular adjacente. As vias catabólicas do tecido adiposo aumentam a mobilização lipídica na forma de AGL para o fígado, com a finalidade de promover a utilização dos lipídeos como fonte energética [17]. Desta maneira, há fluxo contínuo de AGL, no hepatócito, os quais podem sofrer oxidação a acetil-CoA, aumentando este intermediário na mitocôndria, que pode ser redirecionado para cetogênese, originando, principalmente, BHB[18]. Diante deste cenário, há redução da síntese de colesterol hepático, reduzindo a disponibilidade deste metabólito no sangue. O decréscimo da concentração de colesterol, em cabras leiteiras, foi sugerido em razão da redução da síntese de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), no fígado de ruminantes, com graus moderados de infiltração de lipídeos [18].

Tabela 1. Perfil bioquímico do metabolismo energético de cabras leiteiras, com cetonemia e saudáveis, durante o parto

Metabólito	Cetonemia	Saudável	EPM ³	P-valor
Glicose ¹	48,4 ^b	54,5 ^a	1,27	0,020
BHB ²	1,57 ^a	0,29 ^b	0,13	<,0001
AGL ²	0,64 ^a	0,12 ^b	0,04	<,0001
Triglicerídeos ¹	12,42	11,94	1,07	0,825
Colesterol ¹	58,7 ^b	66,5 ^a	1,68	0,049

^{a-c} Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as colunas. ¹ mg/dL. ² mmol/L, metabólitos: BHB: beta-hidroxibutirato; AGL: ácidos graxos não-esterificados. ³ EPM: Erro padrão da média.

Em vacas leiteiras, anteriormente, foi relacionado o aumento da concentração de BHB sérico com modificações no metabolismo proteico, provavelmente associadas ao catabolismo muscular provocado pelo balanço energético negativo e balanço proteico negativo, a fim de disponibilizar substratos para gliconeogênese hepática [1,19]. Porém, as cabras leiteiras com cetonemia subclínica não apresentam alterações no metabolismo proteico (Tabela 2).

Tabela 2. Perfil bioquímico do metabolismo proteico de cabras leiteiras, com cetonemia e saudáveis, durante o parto

Metabólito	Cetonemia	Saudável	EPM ³	P-valor
Albumina ¹	2,28	2,35	0,04	0,476
PT ¹	5,22	5,22	0,11	0,980
Globulina ¹	2,89	2,71	0,11	0,572
Ureia ²	29,66	24,28	1,83	0,229
Creatinina ²	1,17	1,05	0,02	0,105

¹ g/dL, metabólito: PT: proteína total. ² mg/dL. ³ EPM: Erro padrão da média.

As cabras com cetonemia subclínica tiveram redução da concentração de FA (Tabela 3), mas concentração semelhante às de cabras saudáveis para as outras enzimas hepáticas. A atividade sérica da FA expressa pouco a função celular hepática, em ruminantes, sendo mais relacionada com sua presença durante a gestação, com a idade e infecções reprodutivas [20]. Não foram encontradas

relações, na literatura, entre casos de cetonemia subclínica e redução da atividade da FA. Há alguns relatos com ausência de efeito em vacas leiteiras cetóticas [21] ou, ainda, aumento da atividade desta enzima no sangue [22].

Verificou-se que um único evento de cetonemia não é suficiente para gerar acúmulo de triglicerídeos no fígado ou interferir no estoque de glicogênio hepático (Tabela 3). Não houve correlação das concentrações de triglicerídeos e glicogênio hepático com o aumento de BHB ($r = 0,05$ e $r = 0,04$, respectivamente, dados não apresentados). Em vacas leiteiras, a relação entre o conteúdo hepático e as concentrações sanguíneas de BHB, está relacionada com a intensidade e a duração do balanço energético negativo [9]. Desta maneira, a baixa duração, no caso de um único evento de cetonemia, pode não ter sido suficiente para promover alterações no tecido hepático.

Tabela 3. Perfil hepático de cabras leiteiras, com cetonemia e saudáveis, durante o periparto

Metabólito	Cetonemia	Saudável	EPM ³	P-valor
FA ¹	24,0	40,4	2,16	<0,001
ALT ¹	12,2	11,4	0,40	0,477
AST ¹	81,8	80,2	3,41	0,844
GGT ¹	38,8	45,6	1,81	0,083
Glicogênio ²	3,27	3,50	0,341	0,751
Triglicerídeos ²	6,15	4,70	0,990	0,242

^{a-c} Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as colunas. ¹U/L, metabólitos: FA: fosfatase alcaline; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; GGT: gama glutamiltransferase. ² mg/g de fígado. ³EPM: Erro padrão da média.

O aumento de BHB no sangue apresentou correlação moderadamente forte e significativa com a concentração de AGL ($r^2 = 0,659$, $p < 0,001$) e creatinina ($r^2 = 0,621$, $p < 0,001$). O aumento da concentração de AGL também apresentou correlação moderadamente forte e significativa com a concentração de BHB ($r^2 = 0,595$, $p = 0,0003$) e correlação fraca, mas significativa, com a concentração de proteína total ($r^2 = 0,440$, $p = 0,01$, Tabela 4). O BHB é o principal marcador do metabolismo energético, enquanto a concentração de AGL no sangue reflete a intensidade do balanço energético negativo, por meio da lipomobilização em vacas

leiteiras [8,23]. De maneira semelhante, no presente trabalho demonstram-se que a associação das concentrações de AGL e BHB também é capaz de descrever a mobilização lipídica e a cetonemia em cabras leiteiras durante o período de transição. Além disso, as correlações com os metabólitos proteicos, creatinina e proteína total, também demonstram que para a espécie caprina ocorre mobilização proteica em conjunto com a mobilização do tecido adiposo, com a finalidade de disponibilizar aminoácidos glicogênicos para a síntese de glicose hepática[24]. Esses resultados são importantes, pois, por meio deles, há possibilidade de prever e associar efeitos diretos da má-adaptação ao balanço energético negativo em cabras leiteiras, semelhante ao que ocorre em vacas leiteiras.

Tabela 4. Correlação de Spearman entre as concentrações de BHB¹ e AGL² e os metabólitos sanguíneos de cabras leiteiras durante o periparto

Variável	BHB ²		AGL ³	
	Correlação	P-valor	Correlação	P-valor
BHB			0,595	0,0003
AGL	0,659	<0,001		
Glicose	0,049	0,768	0,049	0,788
Triglicerídeos	0,261	0,113	0,020	0,912
Colesterol	-0,162	0,328	0,108	0,553
Ureia	0,045	0,786	0,083	0,649
Proteínas totais	0,023	0,889	0,440	0,011
Creatinina	0,621	<0,001	-0,036	0,842
Albumina	-0,089	0,592	0,340	0,056
FA ⁷	0,342	0,035	0,040	0,826
ALT ⁵	0,062	0,708	0,193	0,289
AST ⁴	0,199	0,230	0,196	0,280
GGT ⁶	-0,226	0,170	0,123	0,499

¹BHB: beta-hidroxibutirato. Valores superiores a 0,8 mmol/L. ²AGL: ácidos-graxos livres. Valores superiores a 0,3 mmol/L no pré-parto e 0,7 mmol/L no pós-parto. ⁷FA: fosfatase alcalina. ⁵ALT: alanina aminotransferase. ⁴AST: aspartato aminotransferase. ⁶GGT: gama glutamiltransferase.

A produção de leite das cabras não foi modificada pelo aumento de BHB sérico, embora tenha sido observada redução de 25% na produção do grupo que

teve pelo menos um evento de cetonemia em relação ao grupo saudável (Tabela 5). Porém, alguns componentes do leite, de interesse econômico, apresentaram interação entre a cetose e dia (Tabela 5).

Tabela 5. Produção e composição do leite de cabras leiteiras, com cetonemia e saudáveis, durante o periparto

Variável	Cetonemia	Saudável	EPM ⁵	P-valor ⁶		
				C	D	C vs D
Produção de leite ¹	1,76	2,35	0,126	0,154	0,212	0,09
Gordura ²	4,53	4,30	0,166	0,418	0,237	0,011
Proteína ²	3,01	3,09	0,153	0,360	<0,001	0,069
Estrato Seco ²	12,5	12,5	0,223	0,929	0,394	0,011
Ureia ³	14,7	15,1	0,949	0,974	0,207	0,026
CCS ⁴	6074	4387	512,3	0,178	0,557	0,059

^{a-c} Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as colunas; ¹kg.dia⁻¹. ²g.kg⁻¹. ³ mg/dL. ⁴ 10³ células/mL. ⁵ EPM: Erro padrão da média. ⁶ Probabilidade de efeitos: C= efeito da cetose; Dia = efeito de dia; C vs D = efeito da interação entre cetose e dia.

Cabras com cetonemia tiveram menor percentual de gordura no dia 7 em relação aos dias 14 e 21 após o parto (Figura 2a). Enquanto a concentração de ureia foi maior no dia 7 em relação ao dia 21 também no grupo de animais que tiveram cetonemia (Figura 2c). A proteína, independentemente do grupo, foi maior no dia 7 em relação aos dias 14 e 21 (Figura 2b).

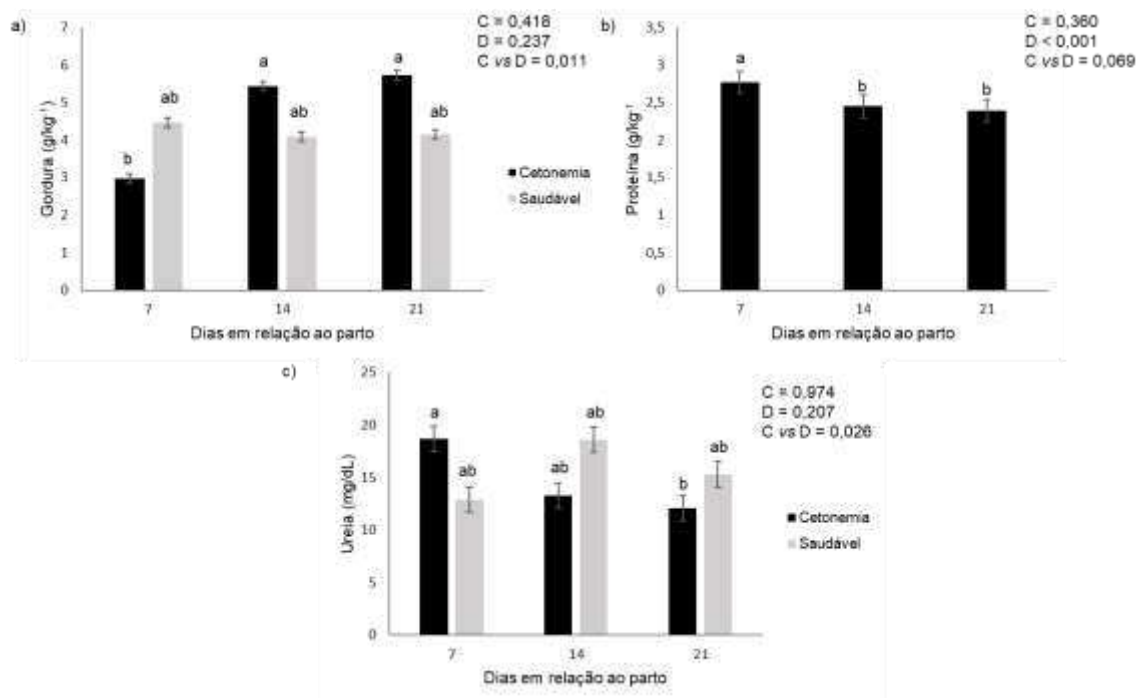


Figura 2. Composição do leite de cabras leiteiras, com cetonemia e saudável, durante o periparto.

O percentual de gordura no leite em cabras leiteiras com cetonemia, aumenta de forma semelhante ao que ocorre em vacas leiteiras com cetose subclínica[25]. O aumento do fluxo de ácidos graxos provenientes da mobilização do tecido adiposo, nos casos de cetonemia, aumentam a síntese desse componente no leite[23]. Além disso, o aumento de BHB e AGL no sangue pode reduzir o consumo alimentar, reduzindo a ingestão de proteína da ração e, por sua vez, reduzir a concentração de ureia no leite[26].

As consequências metabólicas de um único evento de cetonemia parecem ser suficientes para modificar o metabolismo energético e os componentes do leite. Porém, seus efeitos parecem limitados ao acúmulo de triglicerídeos hepáticos e produção leiteira. Os dados apresentados nesse trabalho refletem as consequências da cetonemia em caprinos leiteiros. É importante salientar que esses casos, apesar de terem baixa significância clínica e produtiva, podem evoluir para quadros mais graves, causando prejuízos maiores relativos à morte do animal, custo veterinário, tratamento e redução dos desempenhos produtivo e reprodutivo. Diante disso, o monitoramento do metabolismo energético torna-se indispensável, podendo ser avaliado por meio dos valores de AGL e BHB em rebanhos caprinos.

3.6. CONCLUSÕES

Conclui-se que, em cabras leiteiras, o aumento de BHB sérico modifica o metabolismo energético por meio da redução da glicemia, colesterol total e fosfatase alcalina e da composição do leite. Além disso, conclui-se que o aumento sérico de BHB e AGL apresenta correlação moderada, podendo ambos ser utilizados como ferramenta diagnóstica do metabolismo energético de cabras leiteiras durante o periparto.

3.7. AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de doutorado (Processo 140679/2019-7) e da bolsa de Produtividade em Pesquisa (Processo 310676/2016-9 - Chamada CNPq N^o 12/2016).

3.8. REFERÊNCIAS

1. Overton, T.R.; McArt, J.A.A.; Nydam, D. V. A 100-Year Review: Metabolic Health Indicators and Management of Dairy Cattle. *J Dairy Sci* **2017**, *100*, 10398–10417, doi:10.3168/JDS.2017-13054.
2. Zamuner, F.; DiGiacomo, K.; Cameron, A.W.N.; Leury, B.J. Endocrine and Metabolic Status of Commercial Dairy Goats during the Transition Period. *J Dairy Sci* **2020**, *103*, 5616–5628, doi:10.3168/jds.2019-18040.
3. Barbagianni, M.S.; Spanos, S.A.; Ioannidi, K.S.; Vasileiou, N.G.C.; Katsafadou, A.I.; Valasi, I.; Gouletsou, P.G.; Fthenakis, G.C. Increased Incidence of Peri-Parturient Problems in Ewes with Pregnancy Toxaemia. *Small Ruminant Research* **2015**, *132*, 111–114, doi:10.1016/J.SMALLRUMRES.2015.10.017.
4. Zainal Ulum, M.T.; Ab Azid, M.A.; Shen, T.W.; Hassim, H.A.; Zamri-Saad, M.; Salleh, A. Histopathological Changes in the Reproductive Organs of Does with Pregnancy Toxaemia and Their Aborted Foetuses. *Small Ruminant Research* **2021**, *199*, 106363, doi:10.1016/J.SMALLRUMRES.2021.106363.
5. Barbagianni, M.S.; Mavrogianni, V.S.; Katsafadou, A.I.; Spanos, S.A.; Tsioli, V.; Galatos, A.D.; Nakou, M.; Valasi, I.; Gouletsou, P.G.; Fthenakis, G.C. Pregnancy Toxaemia as Predisposing Factor for Development of Mastitis in Sheep during the

- Immediately Post-Partum Period. *Small Ruminant Research* **2015**, *130*, 246–251, doi:10.1016/j.smallrumres.2015.07.002.
6. Barbagianni, M.S.; Spanos, S.A.; Ioannidi, K.S.; Vasileiou, N.G.C.; Katsafadou, A.I.; Valasi, I.; Gouletsou, P.G.; Fthenakis, G.C. Increased Incidence of Peri-Parturient Problems in Ewes with Pregnancy Toxaemia. *Small Ruminant Research* **2015**, *132*, 111–114, doi:10.1016/j.smallrumres.2015.10.017.
 7. Zarrin, M.; Grossen-Rösti, L.; Bruckmaier, R.M.; Gross, J.J. Elevation of Blood β -Hydroxybutyrate Concentration Affects Glucose Metabolism in Dairy Cows before and after Parturition. *J Dairy Sci* **2017**, *100*, 2323–2333, doi:10.3168/jds.2016-11714.
 8. Chapinal, N.; Carson, M.; Duffield, T.F.; Capel, M.; Godden, S.; Overton, M.; Santos, J.E.P.; LeBlanc, S.J. The Association of Serum Metabolites with Clinical Disease during the Transition Period. *J Dairy Sci* **2011**, *94*, 4897–4903, doi:10.3168/jds.2010-4075.
 9. Arshad, U.; Santos, J.E.P. Hepatic Triacylglycerol Associations with Production and Health in Dairy Cows. *J Dairy Sci* **2022**, *105*, 5393–5409, doi:10.3168/JDS.2021-21031.
 10. AFRC Energy and Protein Requirements of Ruminants. In *AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL - AFRC*; Commonwealth Agricultural Bureaux International, Ed.; 1993; p. 159.
 11. Folch, J.; Lees, M.; Sloane Stanley, G.H. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *J Biol Chem* **1957**, *226*, 497–509, doi:10.1016/s0021-9258(18)64849-5.
 12. Carroll, N. V.; Longley, R.W.; Roe, J.H. The Determination of Glycogen in Liver and Muscle by Use of Anthrone Reagent. *Journal of Biology Chemical* **1955**, *220*, 583–193.
 13. McArt, J.A.A.; Nydam, D. V.; Oetzel, G.R. Epidemiology of Subclinical Ketosis in Early Lactation Dairy Cattle. *J Dairy Sci* **2012**, *95*, 5056–5066, doi:10.3168/jds.2012-5443.
 14. Zobel, G.; Leslie, K.; Weary, D.M.; Von Keyserlingk, M.A.G. Ketonemia in Dairy Goats: Effect of Dry Period Length and Effect on Lying Behavior. *J Dairy Sci* **2015**, *98*, 6128–6138, doi:10.3168/jds.2014-9136.

15. Zamuner, F.; DiGiacomo, K.; Cameron, A.W.N.; Leury, B.J. Short Communication: Associations between Nonesterified Fatty Acids, β -Hydroxybutyrate, and Glucose in Periparturient Dairy Goats. *J Dairy Sci* **2020**, *103*, 6672–6678, doi:10.3168/jds.2019-17163.
16. KANEKO, J.J.; HARVEY, L.W.; BRUSS, M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*; 6th ed.; Academic Press, 2008;
17. Bell, A.W.; Bauman, D.E. Adaptations of Glucose Metabolism during Pregnancy and Lactation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **1997**, *2*, 265–278, doi:10.1023/A:1026336505343.
18. Grummer, R.R. Etiology of Lipid-Related Metabolic Disorders in Periparturient Dairy Cows. *J Dairy Sci* **1993**, *76*, 3882–3896, doi:10.3168/jds.S0022-0302(93)77729-2.
19. Hubner, A.; Canisso, I.F.; Peixoto, P.M.; Coelho, W.M.; Ribeiro, L.; Aldridge, B.M.; Menta, P.; Machado, V.S.; Lima, F.S. Characterization of Metabolic Profile, Health, Milk Production, and Reproductive Outcomes of Dairy Cows Diagnosed with Concurrent Hyperketonemia and Hypoglycemia. *J Dairy Sci* **2022**, *105*, 9054–9069, doi:10.3168/JDS.2021-21327.
20. Peter, A.T.; Bosu, W.T.; MacWilliams, P.; Gallagher, S. Peripartal Changes in Serum Alkaline Phosphatase Activity and Lactate Dehydrogenase Activity in Dairy Cows. *Canadian Journal of Veterinary Research* **1987**, *51*, 521.
21. Huang, Y.; Wen, J.; Kong, Y.; Zhao, C.; Liu, S.; Liu, Y.; Li, L.; Yang, J.; Zhu, X.; Zhao, B.; et al. Oxidative Status in Dairy Goats: Periparturient Variation and Changes in Subclinical Hyperketonemia and Hypocalcemia. *BMC Vet Res* **2021**, *17*, 1–12, doi:10.1186/s12917-021-02947-1.
22. Shi, Z.; Song, Y.; Gao, X.; Looor, J.J.; Aboragah, A.; Yu, H.; Fang, Z.; Zhu, Y.; Du, X.; Li, X.; et al. Disruption of Endoplasmic Reticulum Homeostasis Exacerbates Liver Injury in Clinically Ketotic Cows. *J Dairy Sci* **2021**, *104*, 9130–9141, doi:10.3168/JDS.2021-20238.
23. McArt, J.A.A.; Nydam, D. V.; Oetzel, G.R.; Overton, T.R.; Ospina, P.A. *Elevated Non-Esterified Fatty Acids and β -Hydroxybutyrate and Their Association with Transition Dairy Cow Performance*; Elsevier Ltd, 2013; Vol. 198; ISBN 6072533140.

24. van der Drift, S.G.A.; Houweling, M.; Schonewille, J.T.; Tielens, A.G.M.; Jorritsma, R. Protein and Fat Mobilization and Associations with Serum β -Hydroxybutyrate Concentrations in Dairy Cows. *J Dairy Sci* **2012**, *95*, 4911–4920, doi:10.3168/jds.2011-4771.
25. Duffield, T.F.; Kelton, D.F.; Leslie, K.E.; Lissemore, K.D.; Lumsden, J.H. Use of Test Day Milk Fat and Milk Protein to Detect Subclinical Ketosis in Dairy Cattle in Ontario. *The Canadian Veterinary Journal* **1997**, *38*, 713.
26. Glatz-Hoppe, J.; Boldt, A.; Spiekens, H.; Mohr, E.; Losand, B. Relationship between Milk Constituents from Milk Testing and Health, Feeding, and Metabolic Data of Dairy Cows. *J Dairy Sci* **2020**, *103*, 10175–10194, doi:10.3168/JDS.2019-17981.

4. CAPÍTULO 3

SHORT COMMUNICATION: TÉCNICA DE BIÓPSIA HEPÁTICA PARA ANÁLISES DE TRIGLICERÍDEOS E GLICOGÊNIO NO FÍGADO DE CABRAS LEITEIRAS GESTANTES E LACTANTES³

4.1. RESUMO

O objetivou-se, com este trabalho descrever a técnica de biópsia hepática em cabras gestantes e lactantes, bem como a avaliação dos teores hepáticos de triglicerídeos e glicogênio. Foram selecionadas 50 cabras leiteiras no terço final de gestação e início da lactação, caracterizadas quanto ao número de fetos: gestação simples (n=16) e múltipla (n=34); suplementação: suplementadas com propilenoglicol (n=23) e sem suplementação (n=27); e produção: alta ($3,0 \pm 0,4$ L/dia, n= 15) e baixa ($1,4 \pm 0,4$ L/dia, n=26). As amostras de tecido hepático foram coletadas por meio de biópsia hepática, nos dias -30, -20, -15, -10, -5 e 15 dias em relação ao parto para avaliação do conteúdo de triglicerídeos e glicogênio. A produção de leite foi registrada nas duas primeiras semanas após o parto. As concentrações de triglicerídeos e glicogênio, no fígado, foram analisadas por meio de modelo matemático e os fatores produção de leite, número de fetos, dias em relação ao parto e suplementação foram avaliados estatisticamente pelo teste F a 5% de significância. Após o monitoramento de 24 horas, nenhuma cabra apresentou complicações clínicas após a coleta de tecido hepático, retornando ao consumo alimentar em até oito horas após o procedimento. A concentração de glicogênio hepático foi menor 15 dias após o parto em relação ao pré-parto, exceto ao dia -20. As cabras com alta produção leiteira apresentaram menor concentração de triglicerídeos em relação às cabras de baixa produção. Porém a concentração de glicogênio hepático foi semelhante entre os níveis de produção. Os conteúdos de triglicerídeos e glicogênio não foram influenciados pelo tipo de gestação e o fornecimento de propilenoglicol. Conclui-se que a biópsia é um método seguro para obtenção de tecido e avaliação do conteúdo hepático de cabras leiteiras no terço final da gestação e início da lactação, e o nível produtivo e os dias em relação ao

³ Artigo formatado de acordo com as normas da revista Journal of Dairy Science.

parto influenciam respectivamente as concentrações de triglicerídeo e glicogênio no fígado.

Palavras-chave: gestação, glicogênio, produção de leite, triglicerídeos.

4.2. SHORT COMMUNICATION

A biópsia hepática é uma técnica minimamente invasiva para avaliação hepática, utilizada nas espécies de produção, principalmente em bovinos leiteiros (Duplessis *et al.*, 2020). A técnica, baseada no corte do fígado com trocáter simples e aspiração, foi inicialmente publicada por (Iversen e Roholm, 1939), para amostragem de fígado em humanos, e adaptada para bovinos por (Lamothe *et al.*, 1969). Para a espécie caprina, a técnica também foi anteriormente descrita, por Van den Top *et al.* (1995), para avaliação do efeito da restrição alimentar nas concentrações de triglicerídeos e glicogênio, porém, de forma limitada e pouco instrutiva.

O fígado desempenha papel fundamental para uma transição bem-sucedida entre o período de gestação e início de lactação, em ruminantes. Uma transição de sucesso ocorre quando há equilíbrio entre o influxo de ácidos graxos e a sua oxidação ou exportação pelo tecido hepático (Sordillo e Raphael, 2013). O desequilíbrio entre esses fatores leva ao armazenamento de ácidos graxos no tecido hepático por meio da sua reesterificação na forma de triacilglicerol (Grummer, 1993). O acúmulo de triacilglicerol hepático pode ser acompanhado pela redução da concentração de glicogênio hepático, indicando ocorrência de transtornos metabólicos (Bobe *et al.*, 2004).

Trabalhos anteriores demonstraram que alguns fatores aumentam a predisposição para a ocorrência de transtornos metabólicos em cabras leiteiras, como o período de transição (Brozos *et al.*, 2011; Zamuner *et al.*, 2020b), o número de fetos (Doré *et al.*, 2015), a produção leiteira (Zamuner *et al.*, 2020a) e a alimentação (Brozos *et al.*, 2011). De maneira geral, esses fatores podem aumentar ou reduzir o influxo de triglicerídeos no fígado. Porém, a relação desses fatores com as concentrações de triglicerídeos e glicogênio não foi investigada anteriormente em cabras leiteiras.

Desta maneira, os objetivos com este trabalho foram descrever a técnica de biópsia hepática em cabras gestantes e lactantes, bem como avaliar os teores hepáticos de triglicerídeos e glicogênio, em cabras leiteiras no terço final de gestação e início da lactação e sua relação com a produção de leite, o número de fetos e suplementação com precursor gliconeogênico.

Foram selecionadas 50 cabras leiteiras, com peso médio inicial de 55 kg e com gestação simples (n=16) e gemelar (n=34). As cabras foram mantidas em baias individuais do 120º dia de gestação até o 15º dia após o parto, com livre acesso a alimentação, água e sal mineral. A partir de 135º dia de gestação, 23 cabras receberam suplementação oral diária de propilenoglicol (90 mL/animal/dia) até o 15º dia após o parto, acrescentando 0,408 Mcal/dia à energia metabolizável (EM) da ração.

A dieta total foi composta por silagem de milho e concentrado à base de milho e farelo de soja e foi formulada com a finalidade de atender as demandas nutricionais de cabras em gestação, considerando 55 kg de peso corporal médio, aos 145 dias de gestação, com prolificidade de 1,5 cabritos, com composição dietética: matéria seca (MS) 445,2 g.kg⁻¹ matéria natural, proteína bruta (PB) 125 g.kg⁻¹ MS, fibra em detergente neutro (FDN) 334 g.kg⁻¹ MS e energia metabolizável (EM) 2,9 Mcal.kg⁻¹ MS. Para cabras em lactação, foram considerados 55 kg de peso corporal médio, produção média de 2,5 kg de leite.dia⁻¹ até 30 dias de lactação, com composição dietética: MS 436,4 g.kg⁻¹ matéria natural, PB 188 g.kg⁻¹ MS, FDN 351 g.kg⁻¹ MS e EM 2,8 Mcal.kg⁻¹ MS. As exigências de ambas as categorias animais foram calculadas segundo o (AFRC, 1993).

Após o parto, as cabras foram ordenhadas duas vezes ao dia, às 6h30min e às 14h30min, e a produção de leite foi registrada a cada sete dias, durante as duas primeiras semanas. Nove cabras não tiveram seus dados de produção registrados. A partir dos dados, foi realizada a média de produção de leite por animal e, então, as cabras foram divididas em alta produção (média±desvio padrão, 3,0±0,4 litros/animal/dia, n=15) e baixa produção (1,4±0,4 litros/animal/dia, n=26).

A amostragem de tecido hepático foi única de cada animal, durante todo o período experimental. As coletas foram realizadas nos dias -30 (n = 7), -20 (n = 6), -15 (n = 7), -10 (n = 10), -5 (n = 7) e 15 (n = 13) dias em relação ao parto, considerando dia 0 como o dia do parto, por meio de biópsia hepática. Previamente ao procedimento, as cabras foram alimentadas com a dieta basal. A biópsia hepática

foi realizada às 9h00min, após as cabras serem alocadas em uma plataforma de contenção, permanecendo em estação. Foram aplicados 10 mL de lidocaína a 1%, no local da incisão, no 12º ou 11º espaço intercostal, na altura da tuberosidade ilíaca, cerca de 10 cm abaixo dos processos transversos vertebrais (Figura 1a). A aplicação do anestésico foi colocada superficial e profundamente na camada muscular, para anestesiá-la completamente a área da incisão. Uma cânula para biópsia de medula óssea com trocáter pontiagudo modelo PICKUP nº PJT1115 (11GA x 15 cm, Delebio, Itália), sólido e retrátil foi introduzida cerca de 45º no sentido crânio-ventral (Figura 1b), através de pequena incisão de pele (0,3 cm), após tricotomia e higienização da área com álcool 70%. A cânula com trocáter foi introduzida no parênquima hepático, por três a quatro centímetros. O trocáter foi removido e à cânula foi acoplada uma seringa para tração do tecido. Nesta etapa, realizou-se um movimento sutil de recuo e avanço da ponta da cânula em sentido oblíquo, em direção à porção distal do úmero. A amostra de fígado foi depositada em uma placa de Petri para limpeza de coágulos e, posteriormente, transferida com auxílio de pinça para criotubos e armazenada em nitrogênio líquido até análises. Após a biópsia, foram aplicados 0,2 g/kg de peso vivo de oxitetraciclina intramuscular e pomada cicatrizante no local da incisão, em cada animal.



Figura 1. Biópsia hepática em caprinos leiteiros. Animal disposto em estação. A) visão látero-lateral do local da incisão. Linha traçada entre a tuberosidade ilíaca (TI) e a região média do úmero (U), cerca de 10 cm abaixo dos processos transversos no 12º ou 11º espaço intercostal (EI). B) Visão crânio-ventral oblíqua da angulosidade do trocáter durante biópsia hepática.

A extração dos triglicerídeos do tecido hepático foi realizada de acordo com o método proposto por (Folch *et al.*, 1957) e foram quantificados por meio de ensaio enzimático colorimétrico (K117, Bioclin[®], Belo Horizonte, Brasil), conforme recomendações do fabricante, em equipamento automático para bioquímica, marca Mindray[®] (Shenzen, China), modelo: BS200E. Para extração e quantificação do glicogênio hepático, foi utilizada a metodologia proposta por (Carroll *et al.*, 1955), com leitura modificada para microplaca, em espectrofotômetro marca Thermo Fisher Scientific[®], modelo Multiskan FC (Vantaa, Finlândia), com comprimento de onda de 420 nm.

As concentrações de triglicerídeos e glicogênio, no fígado, foram analisadas de acordo com o modelo matemático:

$$Y_{ijklmn} = \mu + PL_i + NF_j + A_k + M_l + \varepsilon_{ijkl};$$

em que:

Y é a variável resposta; μ é a média geral; PL é o efeito fixo de produção de leite; NF é o efeito fixo do número de fetos em gestação; A é o efeito fixo do tipo de alimentação; M é o efeito fixo do momento de coleta em relação ao parto e ε é o erro aleatório. Os fatores foram avaliados pelo teste F a 5% de significância. Antes da análise final, a normalidade dos resíduos foi testada por meio do teste de Shapiro-Wilk. Todos os procedimentos estatísticos foram realizados no *software* R.

Os animais foram monitorados 24 horas após a coleta. Nenhuma cabra apresentou complicações clínicas e alteração comportamental visível após a coleta de tecido hepático. Após o procedimento, alguns animais retomaram a ingestão de alimentos imediatamente, enquanto outros voltaram a consumir somente após a segunda oferta de alimentos do dia, por volta das 14h00min. Não foi registrada redução de peso dos animais que tiveram amostra de fígado coletada pela técnica de biópsia (dados não apresentados). Com a técnica, foi possível a coleta de 400 mg de fígado, em média, permitindo a avaliação das concentrações de triglicerídeos e glicogênio hepáticos.

Em relação ao terço final da gestação e início da lactação, a concentração de glicogênio hepático foi menor 15 dias após o parto em relação ao pré-parto, excetuando-se o dia -20 (Figura 2). Já a concentração de triglicerídeos foi semelhante durante o pré-parto e o pós-parto (Figura 2). Portanto, sugere-se que cabras leiteiras bem alimentadas passam pelo período de transição sem aumentar a

infiltração de lipídeos no fígado e que a redução da concentração de glicogênio, no pós-parto, pode estar associada com a lactação. Resultados semelhantes foram observados por (Van den Top *et al.*, 1995), em cabras leiteiras com livre acesso à ração.

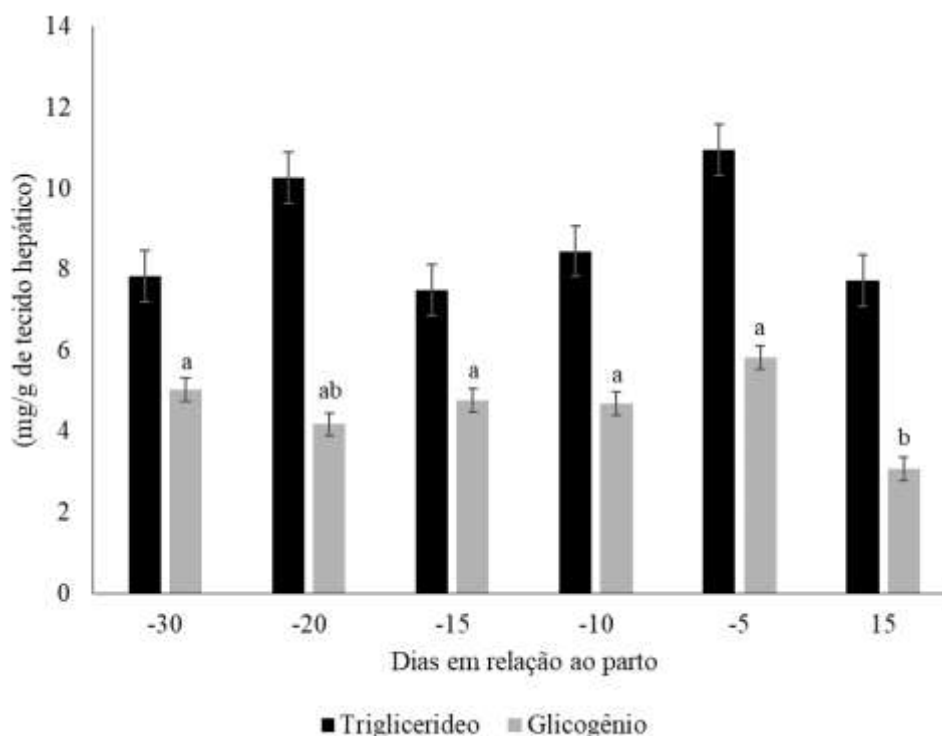


Figura 2. Análise hepática das concentrações de triglicerídeos e glicogênio em cabras leiteiras, durante o terço final da gestação e início da lactação. As letras indicam diferença estatística ($p=0,010$) entre os dias dentro da variável glicogênio.

Cabras com alta produção leiteira (média±desvio padrão, $3,0\pm 0,4$ litros/animal/dia) apresentaram menor concentração de triglicerídeos (6,7 mg/g de tecido hepático) em relação à concentração de triglicerídeos (8,8 mg/g de tecido hepático) de cabras com baixa produção ($1,4\pm 0,4$ litros/animal/dia), enquanto a concentração de glicogênio hepático foi similar entre os níveis de produção (Figura 3). De forma semelhante, em vacas leiteiras, foi observado que a infiltração de gordura superior a 9,5% de tecido hepático, reduz a produção de leite de forma significativa, devido ao dano potencial da infiltração de gordura no hepatócito, que, por sua vez, reduz a capacidade hepática de conversão de propionato em glicose de transformação de amônia em ureia (Bobe *et al.*, 2004), diminuindo consequentemente os componentes para síntese do leite. Porém, quando a

infiltração é menor que 7,5% de tecido hepático, não é observado prejuízo no desempenho animal (Arshad e Santos, 2022).

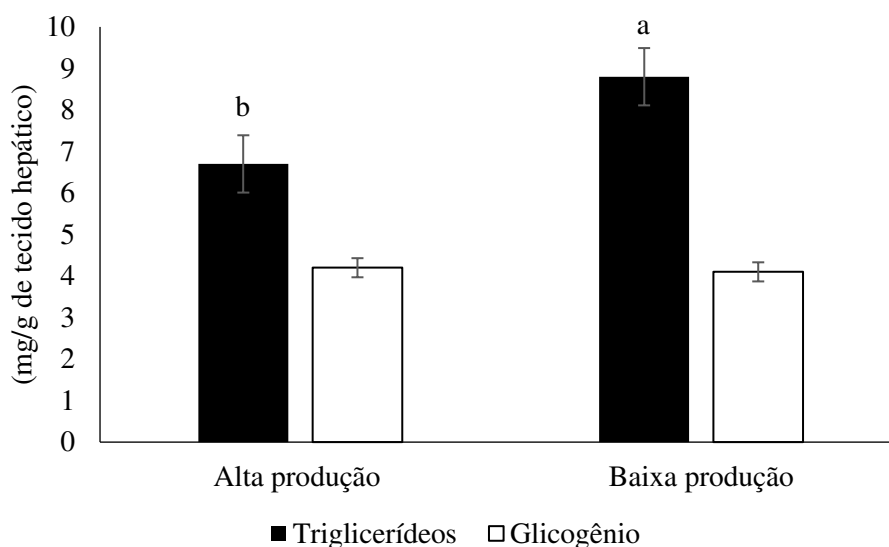


Figura 3. Análise hepática das concentrações de triglicerídeos e glicogênio em cabras leiteiras com alta produção ($3,0 \pm 0,4$ litros/dia) e baixa produção ($1,4 \pm 0,4$ litros/dia). As letras diferentes indicam diferença estatística ($p=0,042$) para a variável triglicerídeos.

As concentrações de triglicerídeos e glicogênio no fígado não foram afetadas pelo número de fetos e pela suplementação de propilenoglicol (Tabela 1).

Tabela 1. Concentrações de triglicerídeos (média±desvio) e glicogênio (média±desvio) e em cabras leiteiras de acordo com o número de fetos e suplementação alimentar

Variável	Triglicerídeos	Glicogênio
<i>Número de fetos</i>		
Simplex	7,9±4,6	4,36±1,8
Gemelar	9,1±5,2	4,36±2,1
P-valor	0,615	0,669
<i>Alimentação</i>		
Padrão	8,0±6,0	4,4±3,4
Propilenoglicol	9,3±4,9	4,5±1,9
P-valor	0,422	0,919

As cabras com gestações simples e gemelar apresentaram concentrações de triglicerídeos e glicogênio hepáticos semelhantes (Tabela 1). Esperava-se que as

cabras com gestação gemelar apresentassem maior acúmulo de triglicerídeos no fígado devido ao fluxo de lipídeos para o fígado aumentado pela exigência nutricional pelo útero gravídico para a manutenção da gestação (Brozos *et al.*, 2011). Doré *et al.* (2015), verificaram que o aumento acentuado na exigência pelo útero gravídico é observado quando o número de fetos é superior a 3 cabritos/gestação, enquanto a mobilização das reservas corporais aconteceu de forma similar em gestações de um feto e dois fetos. Desta maneira, os resultados aqui apresentados são corroborados por esses autores.

Em relação à suplementação com propilenoglicol, apesar deste composto promover a redução do fluxo de ácidos graxos por meio do aumento da disponibilidade de glicose para os tecidos (Nielsen e Ingvarsen, 2004; Zhang *et al.*, 2020), não foram observadas diferenças nas concentrações de triglicerídeos e glicogênio (Tabela 1). Provavelmente, a dieta utilizada foi suficiente para manter o equilíbrio energético durante as mudanças fisiológicas exigidas pelo período, reduzindo a mobilização lipídica, mesmo sem a adição de propilenoglicol.

Em vacas leiteiras o conteúdo hepático foi amplamente analisado em estudos nutricionais e metabólicos (Bobe *et al.* 2004, Arshad e Santos, 2022). Nesta espécie, o aumento da concentração de triglicerídeos hepáticos foi associado à redução da saúde, produção de leite desempenho reprodutivo. Essas associações incentivaram pesquisas mais profundas sobre o *status* hepático nesta espécie. Apesar da intensificação da produção leiteira em caprinos (Miller e Lu, 2019), esse é o primeiro relato da associação de fatores produtivos e conteúdo hepático em cabras gestantes e lactantes.

Conclui-se que a biópsia é um método seguro para obtenção de tecido hepático de cabras leiteiras durante o terço final de gestação e início de lactação. Por meio da técnica, é possível avaliar as concentrações de metabólitos presentes no fígado. As concentrações de triglicerídeos e glicogênio, não são afetadas em gestações simples ou gemelares e pela alimentação. Porém, a concentração de triglicerídeos é menor em cabras leiteiras com produção de leite superior a três litros/dia e a concentração de glicogênio é reduzida no pós-parto.

4.3. REFERÊNCIAS

- AFRC. 1993. Energy and protein requirements of ruminants. Commonwealth Agricultural Bureaux International, ed.
- Arshad, U., and J.E.P. Santos. 2022. Hepatic triacylglycerol associations with production and health in dairy cows. *J Dairy Sci* 105:5393–5409. doi:10.3168/JDS.2021-21031.
- Bobe, G., J.W. Young, and D.C. Beitz. 2004. Invited review: Pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. *J Dairy Sci* 87:3105–3124. doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73446-3.
- Brozos, C., V.S. Mavrogianni, and G.C. Fthenakis. 2011. Treatment and Control of Peri-Parturient Metabolic Diseases: Pregnancy Toxemia, Hypocalcemia, Hypomagnesemia. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 27:105–113. doi:10.1016/j.cvfa.2010.10.004.
- Carroll, N. V., R.W. Longley, and J.H. Roe. 1955. The determination of glycogen in liver and muscle by use of anthrone reagent. *Journal of Biological Chemistry* 220:583–193.
- Doré, V., J. Dubuc, A.M. Bélanger, and S. Buczinski. 2015. Definition of prepartum hyperketonemia in dairy goats. *J Dairy Sci* 98:4535–4543. doi:10.3168/jds.2014-9172.
- Duplessis, M., L. Blais, W. Poisson, and C.L. Girard. 2020. Technical note: Extrapolation of hepatic glycogen concentration of the whole organ by performing a liver biopsy. *J Dairy Sci* 103:4858–4862. doi:10.3168/jds.2019-17905.
- Folch, J., M. Lees, and G.H. Sloane Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues.. *J Biol Chem* 226:497–509. doi:10.1016/s0021-9258(18)64849-5.
- Grummer, R.R. 1993. Etiology of Lipid-Related Metabolic Disorders in Periparturient Dairy Cows. *J Dairy Sci* 76:3882–3896. doi:10.3168/jds.S0022-0302(93)77729-2.
- Iversen, P., and K. Roholm. 1939. On aspiration biopsy of the liver, with remarks on its diagnostic significance. *Acta Med Scand* 102:1–16. doi:10.1111/j.0954-6820.1939.tb11833.x.
- Lamothe, P., P. Guay, M.G. Cote, J.C. Panisset, J. Alary, and J.G. Brodeur. 1969. Biopsie hépatique chez le bovin. *Can J Anim Sci* 10:248–249.

- Miller, B.A., and C.D. Lu. 2019. — Special Issue — Current status of global dairy goat production: An overview. *Asian-Australas J Anim Sci* 32:1219–1232. doi:10.5713/AJAS.19.0253/AJAS_19_0253_PDF.PDF.
- Nielsen, N.I., and K.L. Ingvarsten. 2004. Propylene glycol for dairy cows: A review of the metabolism of propylene glycol and its effects on physiological parameters, feed intake, milk production and risk of ketosis. *Anim Feed Sci Technol* 115:191–213. doi:10.1016/j.anifeedsci.2004.03.008.
- Sordillo, L.M., and W. Raphael. 2013. Significance of Metabolic Stress, Lipid Mobilization, and Inflammation on Transition Cow Disorders. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 29:267–278. doi:10.1016/J.CVFA.2013.03.002.
- van den Top, A.M., A.Th. van 't Klooster, and Th. Wensing. 1995. Liver triacylglycerol concentrations around parturition in goats with either pre-partum restricted or free access to feed. *Veterinary Quarterly* 17:54–59. doi:10.1080/01652176.1995.9694532.
- Zamuner, F., A.W.N. Cameron, E.K. Carpenter, B.J. Leury, and K. DiGiacomo. 2020a. Endocrine and metabolic responses to glucose, insulin, and adrenocorticotropin infusions in early-lactation dairy goats of high and low milk yield. *J Dairy Sci* 103:12045–12058. doi:10.3168/JDS.2020-18625.
- Zamuner, F., K. DiGiacomo, A.W.N. Cameron, and B.J. Leury. 2020b. Endocrine and metabolic status of commercial dairy goats during the transition period. *J Dairy Sci* 103:5616–5628. doi:10.3168/jds.2019-18040.
- Zhang, F., X. Nan, H. Wang, Y. Zhao, Y. Guo, and B. Xiong. 2020. Effects of propylene glycol on negative energy balance of postpartum dairy cows. *Animals* 10:1–15. doi:10.3390/ani10091526.

5. CONCLUSÕES GERAIS

Conclui-se que:

- A combinação da dieta padrão de energia com a suplementação de propilenoglicol reduz o risco de ocorrer cetonemia e reduz a cetogênese;
- O aumento de beta-hidroxibutirato sérico, apresenta-se concomitantemente com a redução de glicemia, colesterol e fosfatase alcalina;
- A biópsia é um método seguro para obtenção de tecido hepático em cabras e o nível produtivo e os dias em relação ao parto influenciam respectivamente as concentrações de triglicerídeos e glicogênio no fígado.

ANEXO A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DE PRODUÇÃO
 CEUAP/UFV

Campus Universitário – Viçosa, MG – 36570-900 – Telefone: (31) 3899.3275 – e-mail: ceuap@ufv.br – site: www.ceuap.ufv.br

Viçosa, 18 de dezembro de 2020

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Propilenoglicol ou dieta de alta densidade energética na prevenção de toxemia da gestação em cabras leiteiras**", protocolo nº 021/2018, sob a responsabilidade de **Cristina Mattos Veloso** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo chordata, subfilo vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi apreciado pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção da Universidade Federal de Viçosa (CEUAP-UFV) em reunião de **18 de dezembro de 2020**.

Finalidade: Pesquisa () Ensino Vigência do Projeto: de **10 de janeiro de 2021 a 31 de Jul de 2021**
 Espécie/linhagem: **Capra (Capra hircus)** Nº de animais: **160**
 Peso: **3,5 Kg a 48 Kg** Idade: **Recém nascido a 02 a 3 anos** Sexo: **Macho/Fêmea** Origem: **Setor de Caprinocultura/DZO/UFV - CNPJ/CPF: 25.944.455/0001-96**

CERTIFICATE

We certify that the project entitled "**Propylene glycol or high energy density diet in the prevention of pregnancy toxemia in dairy goats**", protocol nº 021/2018, under the responsibility of **Cristina Mattos Veloso** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum chordata, subphylum vertebrata (except man), for scientific research purposes (or education) - is in accordance with the law nº. 11.794, of October 8, 2008, Decree nº. 6899 of July 15, 2009, and the rules issued by the Brazilian National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA), and was approved by the Ethics Commission on the use of farm animals of Universidade Federal de Viçosa (CEUAP-UFV) in its meeting on **Dec. 18th, 2020**.

Finality: Research () Education
 Duration of the Project: from **Jan. 10th, 2021 to Jul. 31th, 2021**.
 Species / strain: **Goat (Capra hircus)** Nº of animals: **160**
 Weight: **3,5 Kg a 48 Kg** Age: **born to 02 to 03 years** Sex: **Male/Female** Source: **Setor de Caprinocultura/DZO/UFV - CNPJ/CPF: 25.944.455/0001-96**

Luciana Navajas Rennó

Luciana Navajas Rennó
 Coordenadora da CEUAP/UFV