

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**RELAÇÃO ENTRE RESTRIÇÃO NUTRICIONAL E ACIDOSE RUMINAL COM  
AS ALTERAÇÕES NA PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE**

**DAÍSE WERNCKE**

Engenheira Agrônoma / UDESC  
Mestre em Ciência Animal / UDESC

Tese apresentada como um dos requisitos à obtenção do grau de Doutor em  
Zootecnia

Área de concentração Produção Animal

Porto Alegre (RS), Brasil  
Março, 2017

#### CIP - Catalogação na Publicação

Werncke, Daíse  
RELAÇÃO ENTRE RESTRIÇÃO NUTRICIONAL E ACIDOSE  
RUMINAL COM AS ALTERAÇÕES NA PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO  
LEITE / Daíse Werncke. -- 2017.  
109 f.

Orientadora: Vivian Fischer.  
Coorientador: André Thaler Neto.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de  
Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Restrição alimentar. 2. Acidose ruminal. 3.  
Qualidade do leite. 4. Resposta inflamatória. I.  
Fischer, Vivian, orient. II. Thaler Neto, André,  
coorient. III. Título.

DAISE WERNCKE  
Engenheira Agrônoma e Mestre em Ciências Animais

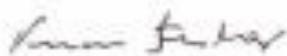
## TESE

Submetida como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de

### DOUTORA EM ZOOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia  
Faculdade de Agronomia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre (RS), Brasil

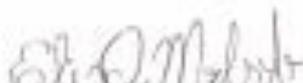
Aprovada em: 31.03.2017  
Pela Banca Examinadora

  
VIVIAN FISCHER  
FEZ Zootecnia/FEZAG  
Orientadora

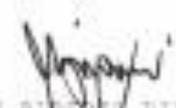
Homologada em: 17.05.2017  
Por

  
PAULO CESAR DE FACCIO CARVALHO  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Zootecnia

  
GERALDO TADEU DOS SANTOS  
FEZ

  
ELISA CRISTINA MODESTO  
Dep. de Zootecnia/FEZAG

  
LUIZ GUSTAVO RIBEIRO PEREIRA  
FEZAG/FA

  
CARLOS ALBERTO BISSANI  
Diretor da Faculdade de Agronomia

***Aos meus pais, Ivo e Marilda, pessoas especiais,  
parceiros na alegria e na tristeza que,  
com simplicidade, carinho e  
amor, me apoiaram e deram condições para  
que eu chegasse até aqui***

***Aos meus “Amigos-Irmãos Lageanos” e ao “Pai Thaler”,  
com toda certeza, sem vocês seria impossível a  
realização de mais essa etapa..***

***Dedico...***

## AGRADECIMENTOS

Aos meus mentores espirituais, aos espíritos de Luz e a Deus que sempre estiveram ao meu lado me guiando, protegendo, dando força, coragem e persistência para concluir mais essa etapa...

Aos meus pais **Ivo** e **Marilda** e ao meu irmão **Diogo**, pela presença ativa em todos os momentos de minha vida, vibrando a cada vitória e estendendo a mão em cada decepção. Em especial a minha mãe **Marilda** pela parceria de sempre nos experimentos.

A Minha Família de Porto Alegre, **Família Serafim**, em especial ao **Seu Pedrinho** e a **Dona Maria**, que me “adotaram” durante o Doutorado, vou sentir falta dos almoços de Domingo...hehehehe

Ao Professor **André Thaler Neto**, “**Pai Thaler**”, pessoa que acreditou em mim quando já tinha desistido de tudo, obrigada pela amizade, pelos incentivos, conselhos, “Pedaladas” e por toda orientação na vida Acadêmica, pessoal e profissional....

Aos amigos e colegas de Doutorado: Sissa, Lidi, Sheila, Gabriela, Micheli, Mari, Lorena, Fer, Vivi, Pati, Evelyn, Eveline, Roberta, Dudu, Matheus, Andress e Itacir. Obrigada pelas risadas, bebedeiras, por tornar os dias mais divertidos....

Aos programas de Pós-Graduação da UFRGS: Ciências Veterinárias, Biotecnologia, Fitotecnia, Solos, Ciências Farmacêuticas, Química, Física, obrigada por ceder equipamentos e espaço para realização de etapa importantes dessa tese...

Ao CAV/UDESC pela parceria nos experimentos...

Ao NUPEEC/Pelotas, ao Alexandre Ferreira Bilhalva, a Josiane de Oliveira Feijó, ao Uriel Secco Londero, a Paola Soares, por todo empenho durante as análises sanguíneas.

Ao Lanagro/MAPA-POA, em especial ao Fabiano Barreto, pelo empenho e colaboração das análises....

A Professora Vivian Fischer, pela amizade, orientação, paciência, ensinamentos durante o doutorado....

Ao programa de Pós-graduação em Zootecnia da UFRGS, pela a oportunidade de aprimorar a formação Acadêmica...

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da bolsa.

**À vocês que ajudaram a deixaram o meu fardo mais leve e a vida mais doce...**

**MUITO OBRIGADA!!!!!!**

## RELAÇÃO ENTRE RESTRIÇÃO NUTRICIONAL E ACIDOSE RUMINAL COM AS ALTERAÇÕES NA PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE <sup>(1)</sup>

Autor: Daíse Werncke  
Orientadora: Vivian Fischer  
Coorientador: André Thaler Neto

**Resumo:** O estudo consistiu de dois experimentos com o objetivo de avaliar os efeitos da acidose ruminal e restrição nutricional na ocorrência de processos inflamatórios nos animais e relacionar com as alterações na produção e composição do leite. Foram utilizadas doze vacas Holandês e Mestiças Holandês Jersey. Experimento 1: Na fase de adaptação, os animais receberam uma dieta formulada para atender 100% das necessidades nutricionais de energia e proteína. Na indução foi administrada uma dieta com restrição de 50% das necessidades em energia e proteína. Na recuperação os animais receberam uma das três dietas experimentais, para recuperar a estabilidade do leite: (1) suprimento somente de energia; (2) suprimento somente de proteína; (3) suprimento de energia e proteína. A restrição nutricional em energia e/ou proteína afeta negativamente a produção de leite, o peso vivo e o escore de condição corporal. Além de reduzir a eficiência de utilização de proteína da dieta e provocar uma maior instabilidade do leite ao teste do álcool. Entretanto, não altera o perfil sanguíneo e metabólico. Experimento 2: Os animais foram divididos em dois grupos (1) controle e (2) acidose. O delineamento experimental foi reversível simples com dois tratamentos e dois períodos experimentais. Foram analisados parâmetros referente às características físico-química, saúde da glândula mamária, medidas fisiológica, perfil metabólico e parâmetros sanguíneos. A indução da acidose ruminal subaguda (SARA) causou redução da produção e estabilidade do leite ao teste do álcool, pH urinário, pH fecal, pH ruminal. Entretanto, a indução a SARA não alterou os parâmetros sanguíneos avaliados. A SARA altera as características físico-químicas do leite, sem influenciar nas concentrações proteínas de fase aguda, caracterizando uma resposta inflamatória. A SARA pode acometer os animais sem apresentar mudanças no perfil sanguíneo dos mesmos.

**Palavras-chave:** balanço energético negativo, qualidade do leite, resposta inflamatória, transtornos metabólicos.

---

<sup>(1)</sup> Tese de Doutorado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (112 p.), Março, 2017.

## RELATIONSHIP BETWEEN NUTRITIONAL RESTRICTION AND RUMINAL ACIDOSE WITH CHANGES IN MILK PRODUCTION AND COMPOSITION <sup>(1)</sup>

Author: Daíse Werncke

Adviser: Vivian Fischer

Co-adviser: Andre Thaler Neto

**Abstract:** The study consisted of two experiments with the aim of evaluating the effects of ruminal acidosis and nutritional restriction on the occurrence of inflammatory processes in animals and correlate with changes in milk production and composition. Twelve Holstein and cross bred Holstein and Jersey cows were used. In the first study, in the adaptation phase, the animals received a diet formulated to supply 100% of the nutritional needs of energy and protein. In the induction, a diet composed by 50% restriction of energy and protein requirements was administered. In the recuperation, the animals received one of the three experimental diets to recover milk stability: (1) only energy supply; (2) supply only of protein; (3) supply of energy and protein. The nutritional restriction in energy and / or protein can affects negatively milk production, weight and condition score body. In addition to reduce the efficiency of protein utilization of the diet and cause greater instability of the milk to the alcohol test. However, it does not changed the blood and metabolic profile. In second study, the animals were divided into two groups (1) control and (2) acidosis. The experimental design was simple reversible with two treatments and two experimental periods. Physiochemical characteristics, health of the mammary gland, physiological measures, metabolic profile and blood parameters were analyzed. Losses in milk production, reduction of alcohol stability test, urinary pH, fecal pH, ruminal pH were caused by Subacute ruminal acidosis (SARA) induction. However, induction of SARA did not changed the blood parameters evaluated. SARA changes the physical-chemical characteristics of the milk, without influencing the acute phase proteins concentrations, characterizing an inflammatory response. SARA can affect the animals without demonstrate changes in the blood profile of the animals.

**Key word:** inflammatory response, metabolic disorders, milk quality, negative energy balance, ruminal pH

---

<sup>(1)</sup> Doctoral Thesis in Animal Science – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (112 p.), March, 2017.

## SUMÁRIO

Relação de Tabelas .....	9
Relação de Figuras .....	10
Relação de Abreviações .....	11
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>13</b>
1. Introdução .....	14
2. Revisão Bibliográfica .....	15
2.1. Restrição Alimentar ou Nutricional .....	15
2.2. Acidose Ruminal Sub-Aguda (SARA) .....	18
3. Hipóteses .....	23
4. Objetivos .....	23
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>24</b>
<b>Restrição No Aporte De Energia E/Ou Proteína E Alterações Nas Características Físico-Química Do Leite, Perfil Metabólico E Imunidade De Vacas Leiteiras</b> .....	<b>24</b>
Implicações .....	27
Introdução .....	28
Material E Métodos .....	29
Resultados .....	35
Discussão .....	36
Conclusão .....	44
Referências Bibliográficas .....	44
<b>CAPÍTULO III</b> .....	<b>57</b>
<b>Acidose Ruminal Subaguda (SARA) E As Alterações Nas Características Físico Químicas Do Leite E Nos Parâmetros Sanguíneos</b> .....	<b>57</b>
Introdução .....	60
Material E Métodos .....	61
Resultados .....	68
Discussão .....	69
Conclusão .....	75
Referências Bibliográficas .....	75
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	<b>88</b>
Considerações Finais .....	89
Referências Bibliográficas .....	90
Vita .....	95
Apêndice .....	96

## RELAÇÃO DE TABELAS

<b>CAPÍTULO II</b>		<b>23</b>
<b>Tabela 1</b>	Quantidade e composição dos alimentos fornecidos nas diferentes fases experimentais, com dietas visando suprir 50 ou 100% das exigências de energia (E) e proteína (P)	<b>50</b>
<b>Tabela 2</b>	Médias e erro-padrão das médias dos parâmetros mensurados no leite e no sangue, de acordo com o período de adaptação, indução e recuperação	<b>51</b>
<b>Tabela 3</b>	Médias e erro-padrão das médias dos atributos mensurados, conforme as dietas utilizadas no período de recuperação	<b>54</b>
<b>CAPÍTULO III</b>		<b>55</b>
<b>Tabela 1</b>	Quantidade alimentos fornecidos nas dietas experimentais de controle e indução	<b>79</b>
<b>Tabela 2</b>	Composição dos alimentos fornecidos no período de indução 1 de acordo com as dietas (Controle: Alto Volumoso/AV e Acidose: Alto Concentrado/AC) utilizadas	<b>80</b>
<b>Tabela 3</b>	Composição dos alimentos fornecidos no período de indução 2 de acordo com as dietas (Controle: Alto Volumoso/AV e Acidose: Alto Concentrado/AC) utilizadas	<b>81</b>
<b>Tabela 4</b>	Médias e erro-padrão das médias dos parâmetros zootécnicos e físico- químicos do leite, de acordo com o período (Indução 1 e Indução 2) e Tratamentos (Controle: Alto Volumoso/AV e Acidose: Alto Concentrado/AC) utilizados	<b>82</b>
<b>Tabela 5</b>	Médias e erro-padrão das médias dos parâmetros Fisiológicos, de acordo com o período (Indução 1 e Indução 2) e Tratamentos (Controle: Alto Volumoso/AV e Acidose: Alto Concentrado/AC) utilizados	<b>83</b>
<b>Tabela 6</b>	Médias e erro-padrão das médias dos parâmetros sanguíneos, de acordo com o período (Indução 1 e Indução 2) e Tratamentos (Controle: Alto Volumoso/AV e Acidose: Alto Concentrado/AC) utilizados	<b>84</b>

## RELAÇÃO DE FIGURAS

<b>CAPÍTULO I</b>	<b>.....</b>	<b>13</b>
<b>Figura 1</b>	Ativação da resposta de fase aguda e a liberação de proteínas de fase aguda (APP) no sangue de bovinos leiteiros desencadeados por acidose ruminal subaguda (SARA) devido a alimentação desequilibrada (adaptado de Zebeli & Metzler-Zebeli, 2012).....	<b>20</b>
<b>CAPÍTULO II</b>	<b>.....</b>	<b>23</b>
<b>Figura 1</b>	Parâmetros zootécnicos. A) Produção de Leite (Kg); B) Peso vivo (Kg); C) Escore de condição corporal. ALTAENPB: dieta de 100% de energia e 100% de proteína; ALTAEN: dieta de 100% de energia e 50% de proteína; ALTAPB: dieta de 100% proteína e 50% de energia .....	<b>52</b>
<b>Figura 2</b>	Parâmetros físicos-químicos do leite. A) Estabilidade ao teste do álcool; B) Teor de proteína no leite; C) Acidez do leite em graus dornic; D) Nitrogênio uréico no leite. ALTAENPB: dieta de 100% de energia e 100% de proteína; ALTAEN: dieta de 100% de energia e 50% de proteína; ALTAPB: dieta de 100% proteína e 50% de energia .....	<b>53</b>

## RELAÇÃO DE ABREVIações

AC: Alto concentrado  
AGNE: Ácidos graxos não esterificados  
APP: Proteína de Fase Aguda  
ATP: Adenosina trifosfato  
AV: Alto Volumoso  
Becef: Excesso de bases na totalidade dos fluídos celulares  
BEM: Balanço energético negativo  
BHBA:  $\beta$ -Hidroxibutirato  
CCS: Contagem de células somáticas  
CETEA: Comitê de ética em experimentação animal  
CIDASC: Companhia integrada de desenvolvimento agrícola de Santa Catarina  
ESC: Escore de Células Somáticas  
FC: Frêquência Cardíaca  
FDN: Fibra detergente neutro  
FR: Frequência Respiratória  
GLUT1: Proteína transportadora de glicose  
GNB: Bactérias gran-negativas  
HCO<sub>3</sub>: Bicarbonato  
ICAR: Internacional committes for animal recording  
Ig-G1: Imunoglobulina Ig-G1  
Ig-G2: Imunoglobulina Ig G2  
LBP: Proteína de Ligação de LPS  
LPS: Lipopolissacario  
MEC: Células epiteliais mamárias  
MID-2: Proteína de diferenciação mieloide -2  
MR: Movimentos ruminais  
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato  
NRC: National Reserach Council  
NUL: Nitrogênio uréico do leite  
PB: Proteína Bruta  
PCO<sub>2</sub>: Pressão de dióxido de carbono  
pO<sub>2</sub>: Pressão de oxigênio  
SARA: Acidose ruminal subaguda  
SGLT1: Cotransportador sódio glicose tipo 1  
SO<sub>2</sub>: saturação de oxigênio  
SSC: Epitélio escamoso estratificado  
tCO<sub>2</sub>: Total de dióxido de carbono  
TNF- $\alpha$ : Fator necrose tumoral  
TR: Temperatura Retal  
UDESC: Universidade do Estado de Santa Catarina  
UNC: Universidade do Contestado  
 $\alpha$ 1: Fração de caseína  $\alpha$ 1  
 $\alpha$ 2: Fração de caseína  $\alpha$ 2  
 $\kappa$ -CN: Fração de Kappa-caseína  
100%E+100%P: Dieta de 100% das necessidades em Energia e Proteína

100%E+100%P: Dieta de 100% das necessidades em proteína e 50% das necessidades em energia

100%E+50%P: Dieta de 100% das necessidades em energia e 50% das necessidades em proteína

## CAPÍTULO I

## 1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura de leite possui um papel importante na economia brasileira. Essa atividade vem se destacando nos últimos anos pela relevante ascendência produtiva e econômica. Para que o Brasil possa se tornar cada vez mais competitivo no cenário internacional é de suma importância que se aumente o volume de leite produzido e que o mesmo, apresente elevada qualidade, bom rendimento sem comprometer o processamento industrial. Para isso é necessário à qualificação de todos os elos que compõem a cadeia produtiva do leite.

Além da importância econômica, a bovinocultura de leite também tem um papel fundamental na questão social, pois essa atividade fixa o homem no campo e contribui para minimizar o desemprego e a exclusão social, favorecendo o desenvolvimento das diversas regiões do país (Ribeiro et al., 2011). A atividade está inserida em um contexto, onde sofre influência de diversos fatores, como por exemplo, relevo, índice pluviométrico, saberes culturais, grau de tecnificação dos produtores dentre outros. Todos esses fatores têm efeito direto e indireto na saúde dos animais, nas características e na qualidade do leite produzido. As características físico-químicas do leite determinam o valor nutritivo, o processamento industrial e a remuneração para o produtor (Barbosa et al., 2014).

Segundo a Instrução Normativa 62 (Brasil, 2011) que regulamenta as normas e os padrões de produção do leite no Brasil, entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. A mesma estabelece que o leite tipo cru refrigerado, deva ser estável ao teste do álcool/alizarol na concentração de 72% v/v, possuir uma acidez titulável de 14 a 18 graus dornic (°D). Prioriza ainda que nessas condições o leite deva conter o mínimo de 2,9% de proteína, 3,0% de gordura e 8,4 de extrato seco desengordurado.

A ocorrência expressiva de leite com baixa estabilidade no teste do álcool é verificada em várias regiões do Brasil, como por exemplo, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e mas também em outros países, Uruguai, Argentina, Cuba, gerando assim uma desconformidade com a legislação vigente. A estabilidade é relacionada aos minerais e sua forma iônica presentes no leite, mas também dependem da proporção das caseínas. Embora esse aspecto seja importante, vários aspectos permanecem relativamente pouco estudados, como os mecanismos pela qual situações estressantes reduzem a estabilidade, como a restrição alimentar, estresse térmico, problemas digestivos ou metabólicos.

Porém, a produção leiteira, o metabolismo do animal e as características do leite produzido sofrem influência da época do ano (Bondan, 2015; Shabani e Ceroni, 2013), disponibilidade de alimento e nutrição, estágio de lactação e condições de saúde dos animais. A ocorrência de acidose ruminal aguda e subaguda é relativamente comum, e as situações de risco são mais comuns em vacas no início da lactação, vacas de alta produção leiteira, vacas consumindo concentrado fornecido separado do volumoso. Por outro lado, em países em desenvolvimento, ou vacas de alta produção ao início da

lactação, é comum ocorrer restrição no aporte nutricional.

Vacas sob restrição alimentar produzem leite com menor estabilidade, de forma proporcional à severidade da restrição e à sua duração (Gabbi et al., 2016); vacas com problemas metabólicos, como a acidose metabólica e cetose, foram mais propensas a produzir leite com menor estabilidade (Fagnani et al., 2014) e ainda vacas sob estresse térmico produziram leite com baixa estabilidade (Abreu, 2015). No entanto, permanecem dúvidas de como esses fatores estressantes provocam alterações no leite e que culminam com a redução de sua estabilidade. Estudos com vacas em isolamento social (Stelwagen et al., 2000) ou em restrição nutricional (Stumpf et al., 2013) indicam que um dos prováveis mecanismos para explicar a relação entre restrição alimentar e redução da estabilidade pode estar relacionada com o aumento da permeabilidade das “tight junctions” das células epiteliais mamárias, e aumento do influxo de sódio e cloro para o lúmen alveolar, com passagem compensatória de lactose e potássio para o sangue. De forma complementar, estudos realizados com estresse térmico agudo (Silanikove et al., 2009) mostram que vacas submetidas ao estresse térmico agudo apresentam modificações nos canais de potássio na parte apical das células epiteliais mamárias, com modificação na passagem de componentes para o lúmen alveolar e redução da síntese de gordura e de proteína, além de alterações da coagulabilidade do leite no processamento de queijos. Esses autores atribuíram esses efeitos à ativação do eixo plasminogênio-plasmina, que degrada especialmente as  $\beta$ -caseínas, formando um peptídeo 1-28, que bloqueia os referidos canais de potássio.

Dada à importância da restrição alimentar e da acidose ruminal na cadeia produtiva do leite e expressiva sua ocorrência, se propôs no presente trabalho estudar os efeitos de ambas sobre a produção e composição do leite e tentar estabelecer os mecanismos de ação sobre a glândula mamária que expliquem as alterações no leite, em especial a sua estabilidade. Dessa forma serão descritos e discutidos dois estudos, o primeiro sobre o efeito da restrição nutricional e posterior fornecimento de somente proteína, somente energia ou ambos na recuperação da produção e composição e nos metabólitos sanguíneos e o segundo sobre os efeitos da acidose ruminal induzida pela inversão da proporção de concentrados e volumosos na dieta.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Restrição alimentar ou nutricional**

A restrição alimentar ou nutricional, especialmente energia e proteína, pode levar a uma série de alterações dos processos fisiológicos e metabólicos de vacas leiteiras, comprometendo a produção, qualidade do leite, além dos efeitos negativos na saúde. Os efeitos da restrição alimentar ou nutricional depende da idade, tipo racial, depende do seu mérito genético, estágio de lactação, intensidade e duração da restrição (Gross et al., 2011; Fruscalso et al., 2016).

Situações de restrição alimentar ao longo da lactação resultam em deficiência de energia e/ou proteína. Nessas situações, para suportar a lactação e manutenção, ocorre a mobilização de reservas corporais para suprir a

demanda de nutrientes, resultando em perda de peso e condição corporal (Fruscalso et al., 2013; Wheelock et al., 2010). As reservas corporais são degradadas para liberar ácidos graxos que são utilizados no fígado para fins energéticos (Remppis et al., 2011). O aumento dos níveis de ácidos graxos não esterificados (AGNE) no plasma é uma característica dos animais que se encontram em balanço energético negativo e representa uma fonte de energia, além de ser o precursor para a síntese de gordura no leite (Baumgard e Rhoads, 2007).

A principal fonte de energia é a glicose, a maior parte da glicose circulante (60-85%) é extraída pelo úbere. O restante é utilizado para participar do fornecimento de ATP (glicólise), na formação de gordura de leite, no fornecimento de glicerol (triose fosfato) e NADPH essencial para o alongamento dos ácidos graxos do leite (Guinard-Flament et al., 2006). A glicose é o principal precursor da síntese de lactose do leite. A lactose é o agente osmótico do leite que responde por 50% da pressão osmótica, permitindo a drenagem da água do sangue para dentro do compartimento alveolar (Guinard-Flament et al., 2006), conseqüentemente, o volume de leite produzido é determinado pela síntese de lactose (Boutinard et al., 2008).

Assim, a captação mamária reduzida de glicose tem efeito limitante na síntese do leite e no volume de leite produzido (Burke et al., 2010). A regulação do volume de leite produzido é baseada nos mecanismos que regem a quantidade de glicose extraída pela glândula mamária e que é transformada em lactose. Na glândula mamária esses mecanismos podem ser cessados e/ou alterados em três níveis principais de regulação: 1) fluxo arterial de glicose, captação de glicose pela glândula mamária e pelas vias metabólicas, além da atividade de secreção das células epiteliais mamárias (MEC) (Guinard-Flament et al., 2006).

O fluxo arterial de glicose no sangue é influenciado pela disponibilidade de nutriente, nível de ingestão, qualidade do alimento, fluxo sanguíneo e número de capilares na glândula mamária (Guinard-Flament et al., 2006), ou seja, com a redução do consumo de matéria seca e redução de disponibilidade de nutrientes, ocorre redução do débito cardíaco e conseqüentemente uma redução no fluxo sanguíneo. A restrição alimentar pode regular o fluxo sanguíneo mamário através da modificação do débito cardíaco e da distribuição sanguínea pelo corpo. O controle de extração mamária e uso de nutriente é complexo e multifatorial. É influenciado pelo número de capilares recrutados, taxa de fluxo sanguíneo, concentração de nutrientes nos capilares, pelo modelo de transporte através das membranas (ativo e passivo), pelo número e atividades das enzimas envolvidas nas diferentes vias sintéticas e oxidativas das células epiteliais (Guinard-Flament et al., 2007). A captação de glicose depende principalmente da capacidade de transporte transmembranar e/ou do metabolismo intracelular da glicose. A mesma ainda é determinada pela quantidade de sangue irrigando a glândula mamária, concentração de glicose arterial e pela capacidade de captar glicose do plasma sanguíneo. Segundo Boutinard et al. (2008), a quantidade de glicose captada pode depender da quantidade de transportadores (GLUT1 – Proteína transportadora de glicose) ativos, que ocorre através do transporte passivo e SGLT-1 (cotransportador sódio glicose tipo 1) na superfície das células

epiteliais mamárias (MEC). Esses mesmos autores destacam que a captação de glicose é dependente também dos níveis de glicose intracelular, sendo que os níveis são controlados pelo uso metabólico da glicose pelas MEC (Boutinard et al., 2008).

Outro aspecto importante, nesta situação é que ocorre redução da glicemia e, conseqüentemente, uma redução da relação da insulina/glucagon no sangue. No estado alimentado, a concentração de insulina no sangue (mais de 2,0 ng/mL de sangue) chega a ser oito vezes mais alta que o glucagon (cerca de 0,25 ng/mL), mas baixa para a cinco a seis vezes em situação de restrição alimentar. Esta redução se deve mais a uma queda na concentração de insulina do que um incremento na concentração de glucagon. A redução da insulinemia diminui os efeitos antagônicos aos do glucagon, principalmente, no tecido hepático, e também aos da adrenalina, principalmente, no tecido adiposo (Kozloski, 2002). Assim, ocorre a neoglicogênese no tecido hepático, por estímulo do glucagon e ocorre estímulo da adrenalina no tecido adiposo, favorecendo a lipólise (mobilização de reservas corporais).

Contudo, o teor de proteína na dieta é um aspecto fundamental a ser considerado, pois a quantidade de proteína mobilizada das reservas corporais é limitada (145 g/dia) quando comparada com a quantidade de gordura mobilizada (Hernández e Ponce, 2006). A mobilização de proteína ocorre através dos tecidos musculares, onde a proteólise é aumentada e os aminoácidos são mobilizados para contribuir como substrato na gliconeogênese e para síntese de proteína no leite (Ingvarsen, 2006).

O baixo suprimento de proteína, ocasionado pela restrição energia e proteína, está associada à redução na disponibilidade de aminoácidos utilizados para a síntese de proteína do leite (Dessauge et al., 2011). De acordo com Remppis et al (2011), os teores de proteína do leite são influenciados pela ingestão de proteína e fornecimento de energia para as bactérias ruminais. Dessa forma, a redução no consumo leva a uma diminuição da proteína microbiana, resultando em também em falta de aminoácidos para a síntese de proteína no leite.

De forma contrária, quando se tem elevado suprimento de proteína na dieta, ocorre aumento dos níveis de nitrogênio ureico no leite (NUL), indicando baixa utilização da proteína bruta da dieta e baixa utilização do nitrogênio (Ferraretto et al., 2014). Com relação aos níveis ideais de nitrogênio ureico, Poncheki et al (2015) em condições brasileiras, sugeriu que o ideal de valores intermediários de NUL fossem de 10-14 mg/dL. Embora alguns fatores ambientais possam afetar este parâmetro, valores abaixo de 10 mg/dL são indicativo de carência de proteína bruta (PB) na dieta, e por outro lado, valores acima de 14 mg/dL seriam indicativo de excesso de PB na dieta.

Dessa forma, a restrição alimentar e/ou de ingestão de energia e proteína provocam diferentes respostas e/ou diferentes reações, que dependem do déficit de nutrientes, magnitude e duração da restrição (Gabbi et al., 2016). Vários estudos têm sido desenvolvidos para relacionar os efeitos da restrição alimentar ou nutricional com a produção de leite, fisiologia, metabolismo e imunidade da vaca. Entre os efeitos mais observados da restrição alimentar sobre a produção de leite, citam-se: redução do volume de leite produzido, redução dos teores de proteína, gordura, lactose, caseína

(Guinard-Flament et al., 2007; Burke et al., 2010; Stumpf et al., 2013; Fruscalso et al., 2013). Por outro lado, a restrição não modificou os teores de gordura e lactose no leite (Gross et al., 2011; Guinard-Flament et al., 2007).

A restrição alimentar provoca aumento dos níveis de ácidos graxos não esterificados (AGNE), acetato e  $\beta$ -Hidroxibutirato (BHBA) no plasma, em decorrência de mobilização das reservas corporais, além de menor concentração de glicogênio no fígado (Drackley et al., 1991; Radcliff et al., 2006; Moyes et al., 2009). Entretanto, segundo Gross et al. (2011) vacas em restrição alimentar apresentam aumento nas concentrações de AGNE, e podem apresentar ou não aumento nas concentrações de BHBA. Ainda de acordo com esses autores, essas variações nas concentrações plasmáticas de BHBA podem ser explicados pelo fato de os AGNE servir como substrato para a produção de corpos cetônicos, ou seja, as concentrações plasmáticas de BHBA atingem um pico mais tarde do que as concentrações de AGNE. Esse pico depende da intensidade, duração, magnitude e da reposta individual de cada animal submetido às condições de restrição alimentar e/ou nutricional.

Em um estudo realizado por Drackley et al. (1991) sobre o efeito da restrição alimentar em vacas, os autores observaram um aumento nas concentrações de AGNE, acetato e  $\beta$ -Hidroxibutirato no plasma, além de uma menor concentração de glicogênio no fígado das vacas submetidas à restrição alimentar. Adicionalmente, o aumento das concentrações plasmáticas de AGNE e BHBA pode contribuir para a redução da capacidade fagocítica, pois a redução da glicose circulante em animais em balanço energético negativo, afeta negativamente a fagocitose, uma vez que a glicose é o “combustível” para os macrófagos realizarem a fagocitose e conseqüentemente ocorre o comprometimento do sistema imune (Moyes et al., 2009).

Em outros estudos realizados com vacas submetidas à restrição alimentar, os autores observaram um aumento dos níveis de cortisol no plasma, o que caracteriza uma condição de estresse para os animais (Toerien e Cant, 2007; Stumpf et al., 2013).

## **2.2. Acidose ruminal sub-aguda (SARA)**

Para atender as demandas de produção de leite, tornou-se comum alimentar as vacas leiteiras com dietas ricas em grãos. Quando alimentadas com esse tipo de dieta, a taxa de produção de ácido ruminal pode exceder a taxa de absorção ruminal e de tamponamento, causando uma desordem digestiva, que é denominada de acidose ruminal (Dionissopoulos et al., 2012). A alimentação com elevadas quantidades de grãos tem sido associada com a depressão do pH ruminal e disbiose microbiana em bovinos (Metzler-Zebeli et al., 2013). Quando o pH do rúmen se acidifica ( $\text{pH} < 5,8$ ) ocorrem alterações nos processos fermentativos, e quando os valores de pH ruminal são menores que 5,5, ocorrem alteração não somente no ambiente intraruminal, como também na sua parede, acarretando em alterações sistêmicas, que levam ao quadro de Acidose Ruminal Subaguda (SARA) (Noro e Noro, 2015). As condições propícias para SARA, também podem ser definidas com redução do pH no conteúdo ruminal em níveis não fisiológicos, depois de receber alimentos concentrados sem propiciar a adaptação ambiental em termos de

microflora ruminal e das membranas das mucosas do epitélio ruminal (Shabani e Ceroni, 2013).

A acidose ruminal provoca alterações no ecossistema do rúmen, interrompendo a simbiose entre as comunidades microbianas e dos tecidos epiteliais do trato gastrointestinal do animal (Zebeli e Metzler-Zebeli, 2012). Além dessas alterações, durante a acidose, as bactérias gram negativas com genes de virulência podem levar vantagens sobre as bactérias comensais, que pode levar à liberação de compostos químicos incomuns presentes no rúmen (Zebeli e Metzler-Zebeli, 2012). Estes compostos são as endotoxinas, também conhecidas como Lipopolissacarídeos (LPS), componentes da parede celular de todas as bactérias gram negativas bioativas e é uma toxina extremamente potente (Emmanuel et al., 2008). A presença de endotoxinas com valores de pH ruminal de 4,5 provoca um aumento de mais de seis vezes na permeabilidade dos tecidos ruminais. Esse aumento na permeabilidade dos tecidos, pode ser devido a efeitos combinados da elevada concentração de LPS, desregulação das funções das barreiras epiteliais e pH ácido provenientes do fornecimento de dietas com alto teor de grãos (Emmanuel et al., 2007).

De acordo com Zebeli e Metzler-Zebeli (2012), as condições de baixo pH ruminal estão associados a grandes alterações no epitélio do rúmen, que incluem uma maior proliferação celular e diferenciação estrutural dos processos, bem como alterações nas proteínas desmossomais e nas junções celulares (Figura 1). A SARA provoca distúrbios no ecossistema ruminal, como mudanças que favorecem as bactérias Gram-negativas (GNB), resultando na liberação de Lipopolissacarídeo livre de células (LPS) no meio ruminal. O LPS livre também pode estar disponível no intestino grosso durante a fermentação intensiva, quando grandes quantidades de substratos fermentáveis passam pelo rúmen devido a SARA. Presume-se que os baixos valores de pH, isquemia (redução de irrigação sanguínea), alta osmolalidade luminal, bem como a presença de determinadas cepas de GNB patogênico e seus produtos (provavelmente LPS isento de células, aminas biogênicas, etanol) contribuam para o aumento da permeabilidade junções e outras proteínas de adesão celular tais como desmossomas de epitélio escamoso estratificado (SSE) do retículo-rúmen.

Existem dois caminhos do LPS translocado para atingir a circulação sistêmica os quais, envolvem os ductos linfáticos e veia porta. Uma vez translocada, a proteína de ligação de LPS (LBP) passam a compor do soro e catalisar a sua transferência para CD14 (ligada à membrana ou muitas vezes solúvel, sCD14), que então associa com TLR-4 e forma a proteína diferenciação mielóide-2 (MID-2), que resulta na ativação de macrófagos (nas células de Kupffer do fígado). Os macrófagos activados libertam diferentes citocinas pró-inflamatórias tais como interleucina IL -1, IL-6, IL-8, factor de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ). Estas citocinas iniciam uma resposta inflamatória, estresse, febre, apatia e a produção de diferentes proteínas de fase aguda (APP) nos hepatócitos e diferentes células de outros órgãos incluindo o intestino. Os hepatócitos constituem o local quantitativo mais importante da produção de APP. As respostas do animal a proteínas de fase aguda ou a uma resposta inflamatória podem ser expressas através de sinais gerais como

febre, ingestão reduzida de dieta, alterações no metabolismo, lipólise e estresse (Zebeli e Metzler-Zebeli, 2012).

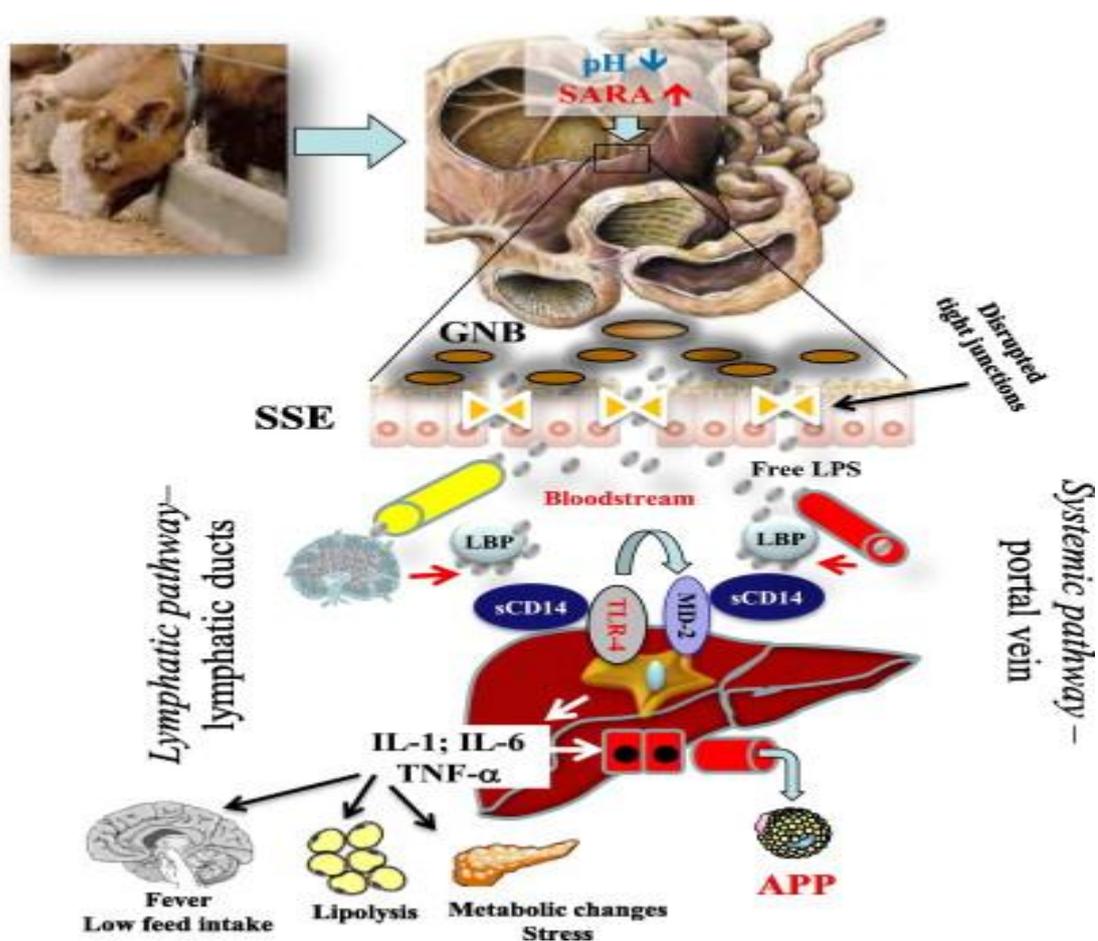


Figura 1. Ativação da resposta de fase aguda e a liberação de proteínas de fase aguda (APP) no sangue de bovinos leiteiros desencadeados por acidose ruminal subaguda (SARA) devido a alimentação desequilibrada (adaptado de Zebeli e Metzler-Zebeli, 2012).

Em um estudo desenvolvido por Emmanuel et al. (2008), alimentação de vacas leiteiras com elevadas proporções de grãos na dieta foi associada com um menor consumo da dieta, menor pH ruminal e um aumento na quantidade de endotoxina no fluido ruminal, além da estimulação de resposta inflamatória. Com o aumento da proporção de concentrado em relação ao volumoso, se tem uma redução da fibra efetiva na dieta e consequentemente uma redução da quantidade de saliva produzida. A saliva e a ruminação têm um papel muito importante na regulação do pH do rúmen, fazendo com que os animais apresentem uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento de acidose ruminal, levando a liberação de endotoxinas e um aumento das respostas inflamatórias (Chen et al., 2011).

O aumento dos níveis de grãos na dieta também foi associado aos aumentos de endotoxinas no rúmen ( $R^2 = 0,27$ ), haptoglobina no plasma ( $R^2$

=0,19) e níveis de amiloide sérica A ( $R^2 = 0,46$ ) (Zebeli et al., 2012; Emmanuel et al., 2008; Zebeli e Ametaj, 2009). A haptoglobina e amiloide sérica A são proteínas de fase aguda positiva, sendo que quando se tem uma resposta inflamatória, as proteínas de fase aguda positivas têm as suas concentrações elevadas no plasma e as proteínas de fase aguda negativas, como por exemplo a albumina tem as suas concentrações reduzidas no plasma (Stockhan & Scott, 2011). Ainda de acordo com Petersen et al. (2004) existe uma diferença no pico da concentração plasmática das proteínas de fase aguda positivas, ou seja, dentre as proteínas de fase aguda positiva, a haptoglobina tem o pico ou aumento no plasma após dois dias do início da resposta inflamatória e a amiloide sérica A apresenta aumento no plasma em menos de um dia após o começo dos primeiros sinais do processo inflamatório (Stockhan & Scott, 2011).

Algumas alterações foram observadas em nível de glândula mamária em condições de acidose ruminal e restrição alimentar. Rustomo et al. (2006) observaram que o percentual de lactose e proteína no leite foi maior quando os animais receberam uma dieta com elevado valor acidogênico. Alterações na síntese de gordura do leite foram observadas por Zebeli e Ametaj (2009), onde a concentração e produção de gordura no leite diminuíram linearmente com o aumento da quantidade de grãos na dieta.

Em um experimento realizado por Hinz et al. (2012), a infusão de endotoxinas em quartos mamários sadios resultou em aumento na contagem de células somáticas. Segundo esses autores, o aumento na contagem de células somáticas no leite pode causar um aumento na quantidade e atividade de enzimas proteolíticas, podendo diminuir o rendimento e a qualidade dos produtos lácteos. Além disso, a exposição às endotoxinas altera profundamente os perfis de proteína no leite, através do aumento da hidrólise de  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\kappa$ -CN (Hinz et al., 2012). Em estudos onde se avaliaram os efeitos da restrição alimentar sobre a produção e a qualidade do leite, os autores verificaram uma redução na produção de leite, redução dos teores de proteína, lactose e caseína, redução de estabilidade do leite ao etanol, aumento na contagem de células somáticas (Toerien e Cant, 2007; Fruscalso et al., 2013; Stumpf et al., 2013; Abreu et al., 2011). Em outro estudo realizado por Lehmann et al. (2013), os quartos mamários desafiados com LPS apresentaram elevados teores de L-Lactato,  $\beta$ -hidroxibutirado, Lactato desidrogenase, Ig G1, Ig G2 e uma maior concentração de L-Lactato no sangue. Também foi observada, em condições de restrição, a presença de lactose no sangue (Stumpf et al., 2013). O aumento da passagem dos componentes do leite para o sangue não é necessariamente um suporte do sistema imune da glândula mamária, mas provavelmente um efeito colateral da redução da integridade da barreira sangue-leite da glândula mamária e vice-versa (Lehmann et al., 2013). Segundo Kolbayashi et al. (2013), em condições adversas a barreira leite-sangue é rompida, fazendo com que ocorra a passagem dos componentes do leite para o sangue e de alguns componentes do sangue para o leite, ocorrendo também mudanças na composição das claudinas das junções firmes da glândula mamária.

Essas condições de acidose ruminal e restrição alimentar favorecem o aparecimento de desequilíbrios na fisiologia e no metabolismo dos animais,

que são prejudiciais para a sua vida produtiva, além de favorecerem a produção do leite com características em desconformidade com a legislação e indesejáveis para processamento industrial.

### **3. HIPÓTESES**

A restrição nutricional e acidose ruminal provocam respostas inflamatórias que alteram a produção e a composição do leite.

### **4. OBJETIVOS**

Avaliar os efeitos da restrição nutricional e acidose ruminal sobre a ocorrência de processos inflamatórios nos animais e relacionar com as alterações na produção e composição do leite.

#### **4.1 Objetivos específicos:**

Avaliar o efeito da restrição nutricional e acidose ruminal sobre a ocorrência de processos inflamatórios;

Relacionar os efeitos da restrição nutricional e acidose ruminal com as alterações na produção e composição do leite;

Investigar o efeito a acidose ruminal sobre o perfil dos metabólitos sanguíneos;

**CAPÍTULO II**  
**Restrição no aporte de energia e/ou proteína e alterações nas**  
**características físico-química do leite, perfil metabólico e imunidade de**  
**vacas leiteiras<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup>Elaborado de acordo com as normas da Animal.

## **Restrição no aporte de energia e/ou proteína e alterações nas características físico-química do leite, perfil metabólico e imunidade de vacas leiteiras**

**Resumo:** Foram utilizadas doze vacas Holandês e Mestiças Holandês, com objetivo de avaliar os efeitos da restrição em energia e/ou proteína sobre a ocorrência de processos inflamatórios e relacionar com as alterações na produção e composição do leite. O delineamento experimental foi em quadrado latino múltiplos 3x3, com três tratamentos e três períodos experimentais, com duração de 24 dias. Cada período experimental foi dividido em três fases. Durante a fase de adaptação (dias 1 a 13), os animais receberam uma dieta formulada para atender 100% das necessidades nutricionais de energia e proteína. Na fase de indução (dias 13 a 17) foi administrada uma dieta com restrição de 50% das necessidades em energia e proteína. Durante a fase de recuperação (dias 17 a 24), os animais receberam uma das três dietas experimentais, para recuperar a estabilidade do leite: (1) suprimento somente de energia; (2) suprimento somente de proteína; (3) suprimento de energia e proteína. Foram avaliados parâmetros referentes às características físico-químicas do leite, perfil sanguíneo e metabólico. O adequado balanceamento em energia e proteína da dieta favorece a produção de leite, estabilidade do leite ao teste do álcool, acidez e teor de proteína na dieta. O aumento da Proteína na dieta aumenta nitrogênio uréico no leite e reduz o peso vivo e a condição corporal. A restrição nutricional em energia e/ou proteína afeta negativamente a produção de leite, o peso vivo e o escore de condição

corporal. Além de reduzir a eficiência de utilização de proteína da dieta e provocar uma maior instabilidade do leite ao teste do álcool. Entretanto, a restrição nutricional em energia e/ou proteína não alterou a concentração de beta-hidroxibutirato, haptoglobina e galactose no plasma. Não foi possível relacionar a restrição nutricional e seu tratamento com processo inflamatório e com a permeabilidade das junções firmes da glândula mamária.

**Palavras-chave:** balanço energético negativo, deficiência nutricional, qualidade do leite, resposta inflamatória

**Restriction energy and/or protein intake and changes in the physical-chemical characteristics of milk, metabolic profile and immunity of dairy cows**

**Abstract:** Twelve Holstein and cross bred Holstein and Jersey cows were used to evaluate the effects of energy and/or protein restriction on the occurrence of inflammatory processes and relate with changes in milk production and composition. The experimental design was 3x3 Multiple Latin Square with three treatments and three experimental periods which lasted 24 days. Each experimental period was composed by three phases. During adaptation phase (days 1 to 13), the animals received a diet formulated to provide 100% of the nutritional requirements of energy and protein. In the induction phase (days 13 to 17) a diet with 50% restriction of energy and protein requirements was provided. During the recovery phase (days 17 to 24), the animals received one

of three experimental diets to recover milk stability: (1) only full energy supply; (2) only full protein supply; (3) full energy and protein supply. The parameters related to the physical-chemical characteristics of the milk, blood and metabolic profile were evaluated in the present study. The adequate supply of energy and protein of the diet favored milk production, milk stability to the alcohol test, acidity and protein content in the diet. The increase of protein in the diet elevates to urea nitrogen in milk, reduced live weight and body condition. The nutritional restriction of energy and/or protein negatively affected milk production, body weight and body condition score. In addition, nutritional restriction reduced the efficiency of dietary protein utilization and caused greater milk instability to the alcohol test. However, nutritional restriction in energy and/or protein did not alter the concentration of beta-hydroxybutyrate, haptoglobin and galactose in plasma. It was not possible to relate the nutritional restriction and its treatment with inflammatory process and with the permeability of the firm junctions of the mammary gland.

**Keywords:** inflammatory response, negative energy balance, nutritional deficit, quality of milk

### **Implicações**

Os sistemas de produção de leite estão sujeitos às várias condições climáticas e disponibilidade de alimentos, que interferem de forma direta ou indireta no desempenho produtivo, na fisiologia e no metabolismo do animal. Em situações de restrição nutricional em energia e proteína podem provocar

alguns distúrbios no organismo do animal, como balanço energético negativo os quais podem estar associados ao aumento da resposta inflamatória, da permeabilidade das *tight junctions* da glândula mamária. Além disso, esses distúrbios podem exercer efeito negativo direto ou indireto no volume e na qualidade do leite produzido, e conseqüentemente trazer prejuízos para os produtores, que tem o seu leite descartado ou desvalorizado ou sub-valorizado pelas indústrias.

## **Introdução**

Em condições de clima tropical e subtropical é observada uma grande diversidade de clima, relevo, solo, índices pluviométricos, a qual pode ter efeito direto e indireto sobre os sistemas de produção, influenciando a disponibilidade, qualidade e a oferta de alimentos ao longo do ano, o que acarreta na oferta de dietas deficientes ou de baixa qualidade utilizadas na alimentação animal. Além disso, por falta de informação técnica adequada, os produtores utilizam dietas que geralmente não apresentam o balanceamento adequado em energia e/ou proteína para suprir as necessidades nutricionais das vacas.

Essas deficiências nutricionais têm como consequência um quadro de balanço energético negativo induzido (BEN) (Remppis *et al.*, 2011). Durante o BEN, vacas tentam compensar a falta de nutrientes da dieta, com a mobilização de reservas corporais, que são utilizadas para a manutenção e produção de leite.

Estudos prévios observaram que durante a restrição alimentar, ocorre redução na produção de leite (Burke *et al.*, 2010), nos teores de gordura e proteína, no peso e condição corporal, no fluxo sanguíneo, no batimento cardíaco (Guinard-Flament *et al.*, 2007), na atividade das células secretoras (Dessaugue *et al.*, 2011) e geralmente ocorre aumento nas concentrações de ácidos graxos não esterificados (AGNE),  $\beta$ -Hidroxibutirato (BHBA) (Radcliff *et al.*, 2006). A restrição alimentar pode provocar o comprometimento do sistema imune, ocasionando aumento nas proteínas de fase aguda positivas e redução das proteínas de fase aguda negativa (Moyes *et al.*, 2009), podendo levar à uma reação inflamatória na glândula mamária e comprometimento das *tight junctions*, caracterizada através do aumento de permeabilidade da membrana epitelial mamária, com a detecção de lactose no plasma (Stumpf *et al.*, 2013).

Até momento, estudos envolvendo restrição alimentar foram desenvolvidos. Entretanto, existem poucos trabalhos envolvendo a restrição nutricional em energia e/ou proteína, e relacionando seus efeitos no metabolismo animal, assim como os seus efeitos nas características físico-químicas de leite e saúde da glândula mamária. Assim, objetivou-se avaliar os efeitos da restrição nutricional em energia e/ou proteína sobre a ocorrência de processos inflamatórios e relacionar com as alterações na produção e composição do leite.

## **Material e Métodos**

### *Considerações Éticas*

Todos os procedimentos com os animais tiveram a aprovação do comitê de ética em experimentação Animal – CETEA, da universidade do estado de Santa Catarina- UDESC, sob o processo 1.29.13.

#### *Descrição do Local, Animais e Manejo*

Este estudo utilizou amostras de leite e sangue coletadas durante o experimento realizado por Schimdt (2014), que foi conduzido na estação experimental da UDESC, localizada nas coordenadas 27°47'06.32"S 50°18'16.76'O, com 914 metros de altitude, em uma região que apresenta Clima Cfb (Alvares *et al.*, 2013), com temperatura média anual de 14,3°C. O experimento foi realizado no período de maio a julho de 2013, em Lages, Santa Catarina, Brasil. Foram utilizadas doze vacas Holandês e Mestiças x Holandês Jersey, divididas em três grupos homogêneos quanto à produção de leite ( $18,93 \pm 5,46$  L/dia), número de partos ( $2,67 \pm 1,56$ ), dias em lactação ( $146,33 \pm 50,4$ ), escore de condição corporal ( $2,67 \pm 0,32$ ) e peso vivo ( $575,42 \pm 70,57$  kg). As vacas foram confinadas em três piquetes a céu aberto, com livre acesso água durante todo o experimento. As dietas foram fornecidas exclusivamente no cocho, as quais foram formuladas seguindo as recomendações de exigências nutricionais do National Research Council - NRC (2001).

O delineamento experimental foi em quadrado latino múltiplos 3x3, com três tratamentos e três períodos experimentais. Cada período experimental foi composto por 3 fases: Adaptação, Indução e recuperação. Durante a fase de adaptação (dias 1 a 13), os animais receberam uma dieta formulada para

atender 100% das necessidades nutricionais de energia e proteína (100%E+100%P), com o intuito de garantir a estabilidade do leite em todas as vacas. Na fase de indução (dias 13 a 17) foi administrada uma dieta com restrição de 50% das necessidades em energia e proteína (50%E e 50%P), para induzir à perda de estabilidade ao teste do álcool. Durante a fase de recuperação (dias 17 a 24), os animais receberam uma das três dietas experimentais, para recuperar a estabilidade do leite: 1) suprimento somente de energia (dieta 100%E+50%P); 2) suprimento somente de proteína (dieta 100%P+50%E; 3) suprimento de energia e proteína (dieta 100%E+100%P) (Tabela 1).

Os alimentos foram fornecidos aos animais após as ordenhas, duas vezes ao dia. As amostras dos alimentos fornecidos, TMR e eventuais sobras, foram coletadas e congeladas a -20°C para posterior análise. As análises realizadas nos alimentos foram: Fibra em Detergente Neutro (FDN) pelo método proposto por Van Soest *et al.* (1991), utilizando Fiber Analyzer Ankom® e a proteína bruta (PB), através da mensuração de Nitrogênio total pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1995). Os níveis de energia foram calculados como nutrientes digestíveis totais (NDT), determinados pelo método descrito por Weiss *et al.* (1992).

As vacas foram ordenhadas mecanicamente duas vezes ao dia, 0700 h e 1700 h (GMT -03:00), em sala de ordenha disposta em formato espinha de peixe 2x4. Em todas as ordenhas foram registrados os dados de produção de leite, com auxílio do medidor WAIKATO® Multi Meter aprovado pelo ICAR (*International Committee for Animal Recording*).

### *Coleta e Análise do Leite*

Foram coletadas amostras de leite a cada ordenha (Manhã e Tarde) e enviadas para o Laboratório da Universidade do Contestado (CIDASC/UnC), Concórdia/SC, em frascos contendo Bronopol. Essas amostras foram submetidas às análises de Contagem de Células Somáticas (CCS) através de citometria de fluxo (*Delta Combiscope, Advanced Instruments®, Inc., U.S.A*) e gordura, proteína, lactose e nitrogênio ureico no leite (NUL) por infravermelho (*Bentley Combisystem, Bentley Instruments®, Inc., U.S.A*). Para se obter o ECS (Escore de Células Somáticas) foi realizada a transformação utilizando a seguinte fórmula, a partir da contagem de células somáticas:  $ECS = ((\log_2(CCS/100.000) + 3)$  (Ali e Schook, 1980).

A cada ordenha foram coletadas amostras de leite adicionais para serem submetidas às análises físico-químicas, sendo armazenadas em refrigeração entre 3 a 8°C e analisada 12 horas após a coleta com tampa aberta, para facilitar a evaporação do CO<sub>2</sub> presente na amostra. O teste do álcool (Tronco, 2010) consistiu da mistura de 2 mL de leite e 2mL de solução alcoólica em concentrações variando de 56 a 82% v/v, com intervalos de 2%. Acidez titulável foi realizada por titulação com solução de 0,1 N de NaOH (Tronco, 2010) e o pH através de potenciometria.

### *Coleta e Análise do Sangue*

No penúltimo dia de cada período experimental, antes da ordenha da tarde foi coletado sangue através de punção na veia jugular, em tubos

vacutainer de 4 mL heparinizados. Os tubos de 4 mL foram centrifugados por 10 min a 3.000 rpm para separar o plasma. O plasma foi separado em alíquotas utilizando microtubos eppendorf de 2,0 mL e armazenado a - 20° C para posterior análise. A determinação da concentração de BHBA foi realizada através do método descrito por Ballou *et al.* (2009) utilizando um kit comercial (Ranbut, Randox, Oceanside, CA). A aferição da concentração de haptoglobina foi realizada utilizando o método colorimétrico descrito por Jones e Mould (1984), adaptado por Schneider *et al.* (2013). A albumina plasmática foi determinada seguindo as especificações de kit comercial (Labtest, MG, Brasil) utilizando o analisador bioquímico automático de microplacas Labmax Pleno (Labtest, MG, Brasil). A concentração de Galactose Plasmática foi determinada através do kit Galactose and Lactose Assay Kit (ab83378), conforme protocolo abcam®.

#### *Avaliação da Condição Corporal e Peso Vivo*

A avaliação do escore condição corporal e pesagem dos animais foram realizadas nos dias 1, 13, 17 e 24 de cada período experimental, após a ordenha da manhã e antes do fornecimento da alimentação. Para avaliação do escore de condição corporal foi utilizada a metodologia proposta por Ferguson *et al.* (1994), a qual consiste da visualização de sete regiões no animal, utilizando escala de 1 a 5 e pesagem das vacas para a determinação do peso corporal.

#### *Análise Estatística*

Os parâmetros avaliados foram: produção de leite, escore de condição corporal, peso vivo, estabilidade ao teste do álcool, acidez do leite, pH do leite, gordura, proteína, lactose, extrato seco desengordurado, sólidos totais, escore de células somáticas, nitrogênio ureico do leite, Haptoglobina, Albumina,  $\beta$ -hidroxibutirato (BHBA). Os dados referentes aos parâmetros avaliados de cada período foram submetidos à análise de variância, delineamento quadrado latino com medidas repetidas no tempo, sendo que vaca foi utilizada como variável aleatória. Foi utilizado o procedimento MIXED do pacote estatístico SAS ® (v. 9,4). Os dados foram previamente testados para normalidade dos resíduos pelo Teste de Shapiro-Wilk. O nível de significância considerado foi de  $P \leq 0,05$ . Os dados foram analisados de acordo com o modelo estatístico:

$$Y_{ij} = \mu + P_i + T_j + P * T_{ij} + e_{ij},$$

onde:

$Y_{ij}$  = Produção de Leite, escore de condição corporal, peso vivo, estabilidade ao teste do álcool, acidez do leite, pH do leite, gordura, proteína, lactose, extrato seco desengordurado, sólidos totais, escore de células somáticas, nitrogênio ureico do leite, haptoglobina, albumina,  $\beta$ -hidroxibutirato de vacas pertencentes ao  $i$ -ésimo período, no seu  $j$ -ésimo tratamento.

$\mu$  = média geral

$P_i$  = efeito do  $i$ -ésimo período ( $i$ =Adaptação, Indução, Recuperação)

$T_j$  = efeito do  $j$ -ésimo tratamento ( $j$ = alta energia e proteína, alta energia e baixa proteína, altaproteína e baixa energia)

$e_{ij}$  = erro experimental

## Resultados

Vários parâmetros avaliados nesse estudo foram influenciados pelo período (Tabela 2). Com relação às características físico químicas do leite, o pH do leite foi o único atributo influenciado somente pelo período ( $P < 0,0001$ ), sendo menor na adaptação em relação aos períodos indução e recuperação (6,76, 6,85 e 6,82, respectivamente). A composição do leite foi afetada pelos períodos, onde os maiores teores de gordura ( $P < 0,0001$ ), lactose ( $P = 0,034$ ), extrato seco desengordurado ( $P = 0,0047$ ), teor de sólidos totais ( $P < 0,0001$ ) foram observados durante a indução.

O escore de células somáticas ( $P = 0,007$ ),  $\beta$ -hidroxibutirato ( $P = 0,01$ ), albumina ( $P = 0,0001$ ) e a galactose plasmática ( $P = 0,01$ ) também foram influenciados pelo período (Tabela 2). O maior escore de células somáticas foi observado na indução e o menor na adaptação. As concentrações plasmáticas de Albumina e de  $\beta$ -hidroxibutirato foram maiores na indução em relação aos demais períodos. A concentração galactose plasmática foi maior no período de indução e recuperação. Entretanto, a concentração plasmática de haptoglobina ( $P = 0,66$ ) não foi influenciada pelos períodos.

Houve efeito da interação entre período e tratamento (Tabela 2, figura 1 e 2 para os seguintes atributos avaliados: produção de leite ( $P < 0,0001$ ), escore de condição corporal ( $P < 0,0001$ ), peso vivo ( $P < 0,0001$ ), estabilidade ao teste do álcool ( $P < 0,0001$ ), acidez do leite ( $P = 0,0015$ ), teor de proteína no leite ( $P = 0,011$ ) e nitrogênio ureico do leite ( $P < 0,0001$ ).

Ao analisar apenas o período de recuperação, com foco nos tratamentos estudados (Tabela 3), observa-se que não houve efeito de tratamento para os parâmetros avaliados.

## **Discussão**

Nossa hipótese para o presente estudo foi de que a restrição nutricional provocaria um déficit de nutrientes no organismo do animal, causando implicações no sistema imune e conseqüentemente provocaria resposta inflamatória, alterando a permeabilidade das “*tight junctions*” do tecido epitelial mamário, com reflexos negativos na composição e nas características físico-químicas do leite.

Os maiores teores de gordura, lactose, extrato seco desengordurado e sólidos totais no leite observados no período de indução podem ser explicados pela redução no volume de leite produzido nesse período (Tabela 2), que teve como consequência um efeito de concentração dos componentes do leite (Guinard-Flament *et al.*, 2007). Apesar de ser observados diferenças significativas para os valores de pH do leite nos períodos (Tabela 2), nota-se que os valores de pH do leite obtidos nesse estudo ficam dentro da faixa normal do leite que é de 6,6 a 6,8 (Santos e Fonseca, 2007).

A contagem de células somáticas encontrada nesse estudo ficou dentro dos padrões exigidos pela IN62 (Brasil, 2011) que é de 400.000 cel/mL. Porém, foi observado maior escore de células somáticas na indução e menor na adaptação (Tabela 2), o que pode ser explicado pela restrição em energia e

proteína que esses animais sofreram durante esse período, juntamente com a menor volume de leite produzido, levando ao efeito da concentração das células somáticas no leite.

As concentrações plasmáticas de albumina e de  $\beta$ -hidroxibutirato foram maiores na indução em relação aos demais períodos, o que se explica pela redução severa no aporte de nutrientes, aumentando a mobilização tecidual (Bjerre-Harpoth *et al.*, 2012; Esposito *et al.*, 2014), apesar de os valores encontrados para  $\beta$ -hidroxibutirato terem ficado abaixo de 1,2 mmol/L (Gantner *et al.*, 2016). As maiores concentrações plasmáticas de galactose observadas foram no período de indução e recuperação, isso pode ser resultante das condições estressantes que os animais foram submetidos durante esses períodos. A galactose participa na formação da molécula de lactose (Guinard-Flament *et al.*, 2006). Segundo Stelwangen *et al.* (2000) o aumento da permeabilidade das “tight junctions” do tecido epitelial mamário, pode ser mensurado através da presença de lactose no sangue, pois a mesma é secretada apenas na glândula mamária. Assim, qualquer vestígio de traços desse dissacarídeo no sangue sugere sua saída do leite para a corrente sanguínea, devido ao aumento da permeabilidade das “tight junctions” do tecido epitelial mamário (Stumpf *et al.*, 2013).

A restrição nutricional provoca comprometimento do sistema imune, pois a falta de nutrientes acaba debilitando o animal, favorecendo o desenvolvimento de doenças (Moyes *et al.*, 2009; Bertoni *et al.*, 2015). Seria esperado em casos de restrição nutricional um aumento das proteínas de fase positiva (APP positiva) e a redução das proteínas de fase aguda negativa (APP

negativa). Em nosso estudo optamos por mesurar a haptoglobina (APP positiva) e albumina (APP negativa), mas verificamos uma maior concentração plasmática de albumina no período de indução. Resultados contrários ao nosso estudo foram observados por Gonzaga Neto *et al.* (2011), que observaram uma redução nas concentrações plasmática de albumina, quando os animais foram submetidos a uma restrição de 40% das suas necessidades nutricionais.

Entretanto, a concentração plasmática de haptoglobina não sofreu influência do período e de tratamento. A elevação das concentrações plasmáticas de haptoglobina ocorre em torno de 48 horas após a resposta inflamatória (Stockhan e Scott, 2011). O momento de coleta das amostras pode não ter sido o mais apropriado para a detecção das maiores concentrações plasmáticas de haptoglobina, o que pode ter influenciado os resultados.

Em relação à produção de leite, quando se avalia o efeito de período isoladamente (Figura 1, Gráfico A), observa-se que houve diferença entre os tratamentos apenas durante o período de recuperação, onde o tratamento de 100% de energia e 50% de proteína não recuperou o nível de produção de leite. Entretanto, ao comparar os períodos, observa-se que na adaptação, onde os animais receberam uma dieta que supriu 100% das necessidades nutricionais em energia e proteína, houve o maior volume de leite produzido. Essa maior produção de leite, é explicada pelo maior aporte de nutrientes para a síntese do leite que são transportados para glândula mamária (Guinard-Flament *et al.*, 2007).

Na indução, a oferta da dieta que restringia o aporte nutricional em 50% das necessidades em energia e proteína, provocou uma redução de aproximadamente 35% na produção de leite em relação ao período de adaptação (Figura 1, Gráfico A). A redução no volume de leite produzido deve-se à menor disponibilidade de nutrientes para a síntese do leite, com prováveis efeitos negativos sobre a concentração de glicose na corrente sanguínea, débito cardíaco, fluxo sanguíneo e conseqüentemente captação de glicose, que é precursora da lactose, pela glândula mamária (Guinard-Flament *et al.*, 2006; Guinard-Flament *et al.*, 2007; Boutinard *et al.*, 2008; Burke *et al.*, 2010; Dessauge *et al.*, 2011).

Segundo Dessauge *et al.* (2011) em situação de restrição, ocorre redução e/ou inativação da atividade das células epiteliais mamárias, reduzindo a síntese de leite. Porém, quando se retoma a dieta balanceada, ocorre reativação da atividade das células epiteliais mamárias, contribuindo para uma maior síntese de leite (Boutinard *et al.*, 2008).

O tratamento de alta energia e baixa proteína apresentou uma produção de leite intermediária e o menor volume de leite produzido ocorreu com os animais que receberam a dieta com alta proteína e baixa energia (Figura 1, Gráfico A). A produção de leite intermediária promovida pelo tratamento alta energia e baixa proteína, é resultado da maior disponibilidade de glicose para a síntese de lactose. Como a lactose é um regulador osmótico na glândula mamária, a sua síntese está diretamente relacionada com o volume de leite, ou seja, com a maior disponibilidade de glicose, maior é a síntese de lactose e

maior o volume de leite produzido (Alessio *et al.*, 2016). O contrário ocorre com o tratamento alta proteína e baixa energia.

O escore de condição corporal não se diferenciou entre os tratamentos dentro dos períodos (Figura 1, Gráfico C). Mas, durante a adaptação os animais apresentaram o maior escore de condição corporal. Na indução, os animais reduziram o escore de condição corporal devido à restrição de 50% de energia e proteína. O tratamento alta proteína e baixa energia não promoveu o aumento da condição corporal em relação aos demais tratamentos no período de recuperação. Como já esperado uma situação semelhante ao que ocorreu com escore de condição corporal, também foi observada para o peso vivo (Figura 1, gráfico B). A redução da condição corporal e do peso vivo é resultado da restrição nutricional provocada na indução, onde se tem um balanço energético negativo induzido pela restrição e conseqüentemente uma mobilização das reservas corporais para a manutenção e para suportar a lactação (Esposito *et al.*, 2014 Gantner *et al.*, 2016).

Apesar de não haver diferenças significativas (Tabela 3) nas concentrações plasmáticas de  $\beta$ -hidroxibutirato nos tratamentos do período de recuperação, observa-se que a maior concentração plasmática média de  $\beta$ -hidroxibutirato foi na indução (Tabela 2), sugerindo uma mobilização das reservas corporais e balanço energético negativo induzido. Uma situação semelhante foi observada por Guinard-Flament *et al.* (2007), os quais também não encontraram aumento nas concentrações plasmáticas de  $\beta$ -hidroxibutirato para os animais submetidos à restrição alimentar e/ou nutricional. Segundo Gross *et al.* (2011) vacas em restrição alimentar apresentam aumentos nas

concentrações de AGNE, podendo apresentar ou não aumentos nas concentrações de BHBA. Ainda de acordo com estes autores, essas variações nas concentrações plasmáticas de BHBA podem ser explicadas pelo fato do AGNE servir como substrato para a produção de corpos cetônicos, ou seja, as concentrações plasmáticas de BHBA atingem um pico mais tarde do que as concentrações de AGNE. Esse pico depende da intensidade, duração, magnitude e da resposta individual de cada animal submetido às condições de restrição alimentar e/ou nutricional (Gabbi *et al.*, 2016).

A Instrução Normativa 62 (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2011) regulamenta normas e padrões de produção do leite no Brasil. A mesma estabelece que o leite tipo cru refrigerado, deva ser estável ao teste do álcool/alizarol na concentração de 72% v/v, possuir uma acidez titulável de 14 a 18 graus dornic ( $^{\circ}$ D). Prioriza ainda que, o leite deva conter o mínimo de 2,9% de proteína, 3,0% de gordura e 8,4 de extrato seco desengordurado.

Houve diferenças significativas para a estabilidade ao teste do álcool na recuperação, onde a dieta de alta proteína e baixa energia provocou uma maior redução na estabilidade ao teste do álcool (Figura 2, gráfico A). O período teve efeito sobre a estabilidade do leite ao teste do álcool, podendo ser observado que, durante a adaptação, a estabilidade estava acima dos padrões exigidos pela IN62. A restrição de 50% de energia e 50% de proteína provocada no período de indução reduziu a estabilidade a valores muito aquém dos níveis exigidos pela IN62. Na tentativa de corrigir essa baixa estabilidade, durante a fase de recuperação, se observa que a dieta alta energia e alta proteína

recuperou a estabilidade aos níveis da IN62. A dieta alta energia e baixa proteína elevou a estabilidade a níveis intermediários e a dieta de alta proteína e baixa energia não conseguiu recuperação da estabilidade do leite a níveis aceitáveis pela IN62. Os resultados semelhantes a este estudo, onde a restrição alimentar diminuiu a estabilidade do leite (Stumpf *et al.*, 2013, Fruscalso *et al.*, 2013) e o adequado suprimento em energia e proteína na dieta promoveu maior estabilidade do leite (Marques *et al.*, 2010; Werncke *et al.*, 2016). Ao relacionar a figura 1/gráfico A com a figura 2/gráfico A, pode ser ressaltada a importância do aporte energético e protéico adequado para sustentar a produção e a síntese dos componentes lácteos, com reflexos positivos sobre a estabilidade do leite (Werncke *et al.*, 2016).

Ao relacionar a estabilidade do leite (figura 2, Gráfico A) com o pH do leite (Tabela 2), pode-se observar que o menor valor para o pH do leite ocorreu durante a adaptação (6,76), enquanto que durante no período de indução houve um aumento no pH do leite (6,85). Quando se compara os tratamentos entre períodos, pode ser observado que, na recuperação, o maior valor de pH ocorreu para o tratamento alta energia e baixa proteína. Ao relacionar o Gráfico 1/Figura A com a Tabela 2, pode-se notar que no período de indução se teve menor estabilidade do leite com maior pH do leite. Observa-se ainda que no período de adaptação ocorreu maior estabilidade do leite com um menor pH do leite. De forma semelhante, Sing (2004) e Horne (2015) observaram que quando o pH do leite está entre 6,7 e 7,0, ocorre separação das k-caseínas (camada externa da caseína) das micelas de caseína, reduzindo a estabilidade do leite.

Independente o período e do tratamento utilizado, a acidez do leite apresentou-se dentro dos padrões exigidos pela IN62 (Figura 2, gráfico C). Ao analisar o efeito de tratamento dentro dos períodos, observa-se diferença no período de recuperação, onde a maior acidez do leite foi observada no tratamento de alta energia e alta proteína em relação aos demais tratamentos. No período de indução, nota-se que houve redução da acidez do leite. A redução observada na acidez do leite no período de indução pode ser explicada pelo menor volume de leite produzido, tendo como consequência a potencialização na concentração dos solutos presentes no leite e pelo aumento do teor de proteína no leite, sendo que estes têm efeito na acidez do leite.

Ao comparar os gráficos A e C da figura 2, observa-se que o leite com baixa estabilidade apresentou acidez titulavel dentro da faixa de 14 a 18°D, sendo caracterizado como leite instável não ácido (Zanela *et al.*, 2009). Este tipo de leite pode acarretar em prejuízos para o produtor, que tem o seu leite descartado de forma injustificada, por não resistir ao teste do álcool/alizarol (Fischer *et al.*, 2012).

Ao se analisar o teor de proteína no leite dentro dos períodos, não foram observadas diferenças significativas (Figura 2, Gráfico B). Entretanto, ao observar os tratamentos entre os períodos, verifica-se que, na indução, o teor de proteína foi maior para o grupo da alta energia/baixa proteína e na recuperação a dieta de alta energia e baixa proteína promoveu uma redução do teor de proteína no leite em relação aos demais períodos. Isso se deve ao efeito do menor volume de leite produzido na indução (efeito concentração) e ao volume de leite produzido na recuperação no tratamento alta energia/baixa

proteína (efeito de diluição) e da falta de precursores para realizar a síntese proteica (Hernandez e Ponce, 2006).

A concentração de nitrogênio ureico (NUL) no leite é um indicador de eficiência de utilização de proteína da dieta. Assim, a concentração de nitrogênio ureico no leite tem relação com o adequado balanceamento da dieta (Doska *et al.*, 2012). No período de recuperação, se pode observar que a dieta alta proteína e baixa energia apresentaram elevados níveis de nitrogênio uréico no leite. O inverso se observa na dieta de baixa proteína e alta energia, onde os níveis de nitrogênio uréico no leite foram muito baixos. Nossos resultados estão de acordo com aqueles descritos por Aguilar *et al.* (2012), os quais também verificaram maiores concentrações de nitrogênio ureico com dietas desbalanceadas, sendo que a maior concentração de NUL pode estar associada à menor utilização de proteína bruta dietética, levando a uma menor eficiência de nitrogênio (Cao *et al.*, 2010).

## **Conclusão**

A restrição nutricional em energia e/ou proteína afeta negativamente a produção de leite, o peso vivo e o escore de condição corporal. Além de reduzir a eficiência de utilização de proteína da dieta e provocar uma maior instabilidade do leite ao teste do álcool. Entretanto, a restrição nutricional em energia e/ou proteína não alterou as concentrações plasmáticas das proteínas de fase aguda e  $\beta$ -hidroxibutirato.

## Referências Bibliográficas

- Aguilar M, Hanigan MD, Tucker HA, Jones BL, Garbade SK, Mcgilliard ML, Stallings CC, Knowlton KF and James RE 2012. Cow and herd variation in milk urea nitrogen concentrations in lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 95, 7261-7268.
- Alessio DRM, Thaler Neto A, Velho JP, Pereira IB, Miquelluti DJ, Knob DA and Silva CG 2016. Análise multivariada do teor de lactose do leite de vacas holandês e Jersey. *Semina: Ciências Agrárias* 37, 2641-2652.
- Ali Aka and Shook GE 1980. Na optimum transformation for somatic cell concentration in milk. *Journal of Dairy Science* 63, 487-490.
- Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC, Gonçalves JLM and Sparovek G 2013. Köppen's climate classification map for Brazil, *Meteorologische Zeitschrift* 22, 711–728.
- Association of Official Analytical Chemists – AOAC 1995, Official methods of analysis. 16 ed, 474p, Washington, DC, USA.
- Ballou MA, Gomes RC, Juchem SO and Depeters EJ 2009. Effects of dietary supplemental fish oil during the peripartum period on blood metabolites and hepatic fatty acid compositions and total triacylglycerol concentrations of multiparous Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 92, 657-669.
- Bertoni G, Minuti A and Trevisi E 2015. Immune system, inflammation and nutrition in dairy cattle. *Animal Production Science* 55, 943-948.
- Bjerre-Harpøth V, Friggens NC, Thorup VM, Larsen T, Damgaard B M, Ingvarsen KL and Moyes K M 2012. Metabolic and production profiles

of dairy cows in response to decreased nutrient density to increase physiological imbalance at different stages of lactation. *Journal of Dairy Science* 95, 2362-2380.

Boutinaud M, Ben Chedly MH, Delamaire E and Guinard-Flament J 2008. Milking and Feed Restriction Regulate Transcripts of Mammary Epithelial Cells Purified from Milk. *Journal of Dairy Science* 91, 988-998.

Burke CR, Willians JY, Hofmann L, Kay JK, Phyn CVC and Meier S 2010. Effects of an acute feed restriction at the on set of the seasonal breeding period on reproductive performance and milk production in pasture – grazed dairy cows. *Journal of Dairy Science* 93, 1116-1125.

Cao Z, Huang W, Wang T, Wang Y, Wen W, Ma M and Li S 2010. Effects of Parity, Days in Milk, Milk Production and Milk Components on Milk Urea Nitrogen in Chinese Holstein. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 9, 688-695.

Dessaige F, Lollivier V, Ponchon B, Bruckmaier K, Finot L, Wiat S, Cutullic E, Disenhaus C, Barbey C and Boutinaud M 2011. Effects of nutrient restriction on mammary cell turnover and mammary gland remodeling in lactation dairy cows. *Journal of Dairy Science* 94, 4623-4635.

Doska MC, Silva DFF, Horst JA, Valloto AA, Rossi Jr P and Almeida K 2012. Sources of variation in milk urea nitrogen in Paraná dairy cows. *Revista Brasileira de Zootecnia* 41, 692-697.

Esposito G, Irons PC Webb EC and Chapwanya A 2014. Interactions between negative energy balance, metabolic diases, uterine health and imune

response in transition dairy cows. *Animal Reproduction Science* 144, 60-71.

Ferguson JD, Galligan DT and Thomsen N 1994. Principal Descriptors of Body Condition Score in Holstein Cows. *Journal of Dairy Science* 77, 2695-2703.

Ferraretto LF, Gencoglu H, Hackbart KS, Nascimento AB, Dalla Costa F, Bender RW, Guenther JN, Shaver RD and Wiltbank MC 2014. Effect of feed restriction on reproductive and metabolic hormones in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 97, 754-763.

Fischer, V, Ribeiro MER, Zanela MB, Marques LT, Abreu ASD, Machado SC, Fruscalso V, Barbosa RS and Stumpf MT 2012. Leite instável não ácido: um problema solucionável? *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal* 13, 838-849.

Fruscalso V, Stumpf MT, Mcmanus CM and Fischer V 2013. Feeding restriction impairs milk yield and physicochemical properties rendering it less suitable for sale. *Scientia Agricola* 70, 237-241.

Gabbi AM, Mcmanus CM, Zanela MB, Stumpf MT, Barbosa RS, Fruscalso V, Thaler Neto A, Schmidt FA and Fisher V 2016. Milk traits of lactating cows submitted to feed restriction. *Tropical Animal Health Production* 48, 37-43.

Gantner V, Bobic T and Potocnik K 2016. Prevalence of metabolic disorders and effect on subsequent daily milk quantity and quality in holstein cows. *Archives. Animal Breeding* 59, 381-386.

- Gonzaga Neto S, Bezerra LR, Medeiros AN, Ferreira MA, Pimenta-Filho EC, Cândido EP and Oliveira RL 2011. Feed Restriction and Compensatory Growth in Guzerá Females. *Asian-Australian Journal Animal Science* 24, 791-799.
- Guinard-Flament J, Delamaire E, Lamberton P and Peyraud JL 2007. Adaptations of Mammary Uptake and Nutrient Use to Once-Daily Milking and Feed Restriction in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 90, 5062-5072.
- Guinard-Flament J, Delamaire E, Lemosquet S, Boutinaud M and David Y 2006. Changes in mammary uptake and metabolic fate of glucose with once-daily milking and feed restriction in dairy cows. *Reproduction Nutritional Development* 46, 589-98.
- Gross J, Van Dorland HA, Bruckmaier RM and Schwarz FJ 2011. Performance and metabolic profile of dairy cows during a lactational and deliberately induced negative energy balance with subsequent realimentation. *Journal of Dairy Science* 94, 1820-1830.
- Horne, D. S. 2015. Ethanol stability and milk composition. In: *Advanced Dairy Chemistry. Volume 1B: Proteins: Applied Aspects*. 4<sup>th</sup> ed. McSweeney, P.L.H. and O'Mahony, J.A., ed. Springer, Cork.
- Jones, G. and D. Mould. 1984. Adaptation of the guaiacol (peroxidase) test for haptoglobins to a microtitration plate system. *Research in Veterinary Science* 37, 87-92.
- Marques LT, Fischer V, Zanela MB, Ribeiro MER, Stumpf Junior W and Manzke N 2010. Fornecimento de suplementos com diferentes níveis de energia

e proteína para vacas Jersey e seus efeitos sobre a instabilidade do leite. *Revista Brasileira de Zootecnia* 39, 2724-2730.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento 2011. Alteração do caput da Instrução Normativa MAPA n.51, de 18 de Setembro de 2002 (Instrução Normativa n.62). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, Brazil.

Moyes KM, Drackley JK, Salak-Johnson JL, Morin DE, Hope JC and Looor JJ 2009. Dietary-induced negative energy balance has minimal effect on innate immunity during a streptococcus uberis mastitis challenge in dairy during mid lactation. *Journal of Dairy Science* 92, 4301-4316.

National Research Council 2001. Subcommittee on Dairy Cattle Nutrition. Nutrient requirements of dairy cattle. National Academy Press, Washington, DC, United States of America, 381pp.

Henandez R and Ponce P 2006. Relación entre desbalance nutricionales, el metabolism y la composición de la leche em vacas holstein friesland. *Revista Salud Animal* 28, 13-20.

Radcliff RP, Mc Cormack BL, Keisler DH, Crooker BA and Lucy MC 2006. Partial feed restriction decrease growth hormone receptor 1AmRNA expression in postpartum dairy cows. *Journal of Dairy Science* 89, 611-619.

Remppis S, Steingass H, Gruber L and Schenkel H 2011. Effects of energy intake on performance, mobilization and retention of body tissue, and metabolic parameters in dairy cows with special regard to effects of pre-

- partum nutrition on lactation- A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 24, 540-572.
- Santos MV and Fonseca LFL 2007. Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite. Manole, Barueri. 314p.
- Schneider A, M Corrêa M, AND W. Butler. 2013. Short communication: acute phase proteins in Holstein cows diagnosed with uterine infection. *Research in veterinary science* 95, 269-271.
- Schmidt FA 2014. Efeito do suprimento das exigências de energia e/ou proteína na recuperação da instabilidade do leite ao teste do álcool. MSc Thesis, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, Brasil.
- Singh, H 2004. Heat Stability of Milk. *International Journal Dairy Technology* 57, 111-119.
- Stelwagen K, Hopstert H, Van Der Werf Jtn And Blokhuis HJ 2000. Short communication: effects of isolation stress on mammary tight junctions in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 83, 48–51.
- Stockhan LS and Scott M A 2011 *Fundamentos de patologia clínica Veterinária*, 2ed, Rio de Janeiro: Guanabara Kogan, 729 p.
- Stumpf MT, Fischer V, McManus CM, Kolling GJ, Zanela MB, Santos CS, Abreu AS and Montagner P 2013. Severe feed restriction increases permeability of mammary gland cell tight junctions and reduces ethanol stability of milk. *Animal* 7, 1137-1142.
- Tronco V M 2010. Manual para inspeção da qualidade do leite. 4ª ed., Santa Maria. Editora da UFSM. 195p.

- Van Soest, PJ, Robertson JB and Lewis BA 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74, 3583-3597.
- Weiss WP, Conrad HR and Pierre NRSt 1992. A theoretically-based model for predicting total digestible nutrient values of forages and concentrates. *Animal Feed Science and Technology* 39, 95-110.
- Werncke, D, Gabbi AM, Abreu AS, Felipus NC, Machado NL, Cardoso LL Schmidt FA, Alessio DRM, Fischer V and Thaler Neto A 2016 Qualidade do leite e perfil das propriedades leiteiras no sul de Santa Catarina: abordagem multivariada. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 68, 506-516.
- Zanela MB, Ribeiro MER, Fischer V, Gomes JF and Stumpf Jr. W 2009. Ocorrência do leite instável não ácido no noroeste do Rio Grande do Sul. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 61, 1009-1013.
- .

**Tabela 1-** Quantidade e composição dos alimentos fornecidos nas diferentes fases experimentais, com dietas visando suprir 50 ou 100% das exigências de energia (E) e proteína (P).

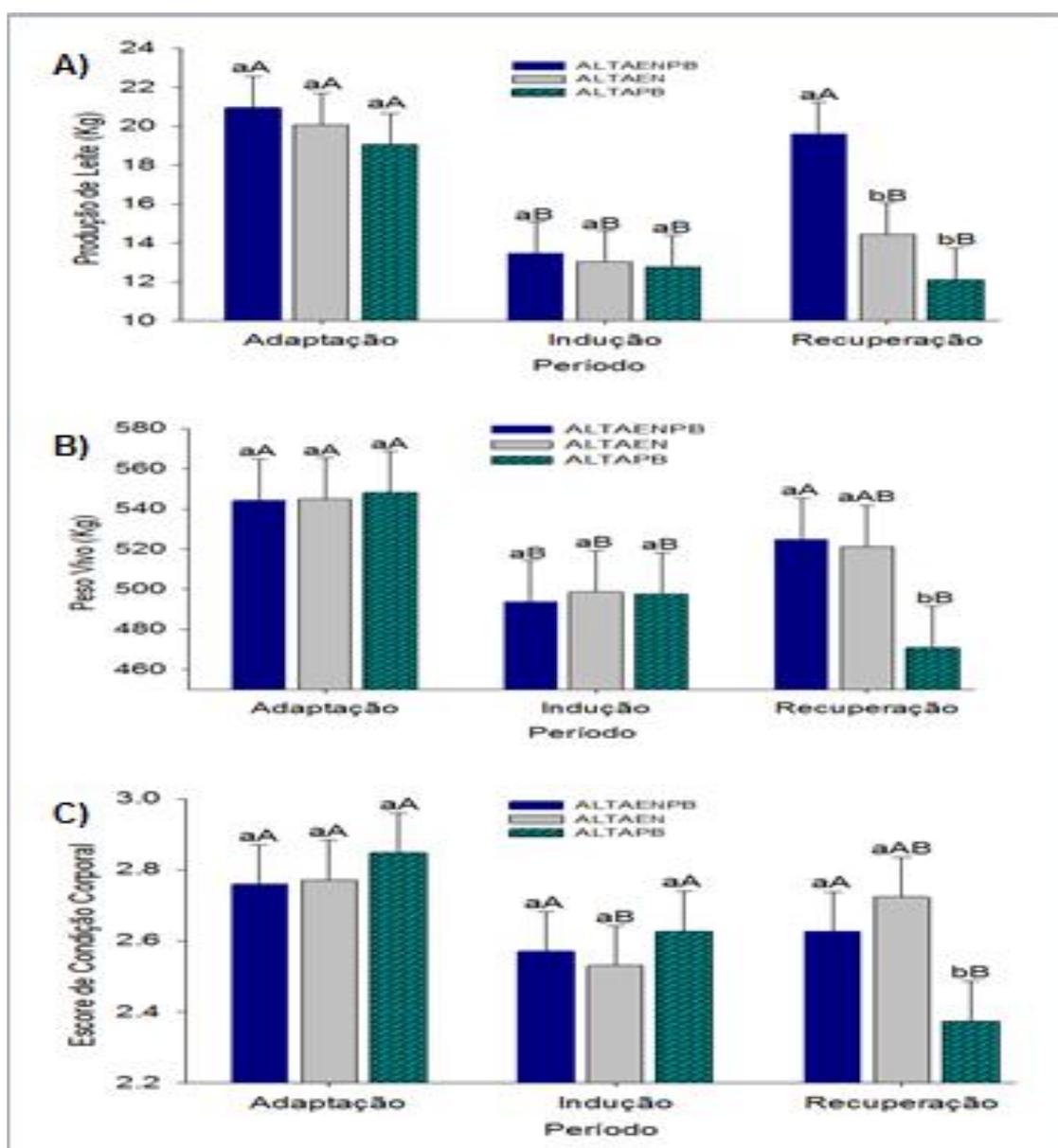
Alimentos	Composição Bromatológica <sup>1</sup>				Dietas Experimentais <sup>2</sup> (kg/vaca/dia)			
	MS (%)	PB (%)	FDN (%)	NDT (%)	Indução		Recuperação	
					50E +50P	100E +100P <sup>3</sup>	100E+	50E+
Pré-secado de Tifton	72,20	9,90	72,90	54,00	10,00	4,00	6,00	12,00
Farelo de Soja	87,20	53,90	15,10	84,90	1,20	4,00	-	0,50
Soja Tostada	91,00	43,00	22,10	98,75	-	-	-	2,70
Milho moído	88,10	9,40	9,50	84,98	-	3,40	4,40	-
Núcleo Mineral <sup>4</sup>	-	-	-	-	0,30	0,40	0,40	0,40
Sal comum	-	-	-	-	0,05	-	-	-
Bicarbonato de Sódio	-	-	-	-	-	0,16	0,16	-

<sup>1</sup>MS = Matéria Seca, PB = Proteína Bruta, FDN = Fibra em Detergente Neutro, NDT = Nutrientes Digestíveis Totais; <sup>2</sup>E= Energia, P= Proteína; <sup>3</sup>Dieta também utilizada na fase de adaptação; <sup>4</sup>Núcleo Mineral: em g/kg min Ca 190, P 60, S 20, Mg 20, K 35, Na 70, em mg/kg Co 15, Cu 700, Cr 10, Fe 700, I 40, Mn 1600, Se 19, Zn 2500, UI/kg vit A 200000, Vit D3 50000, Vit E 1500, F(max) 600 mg/kg.

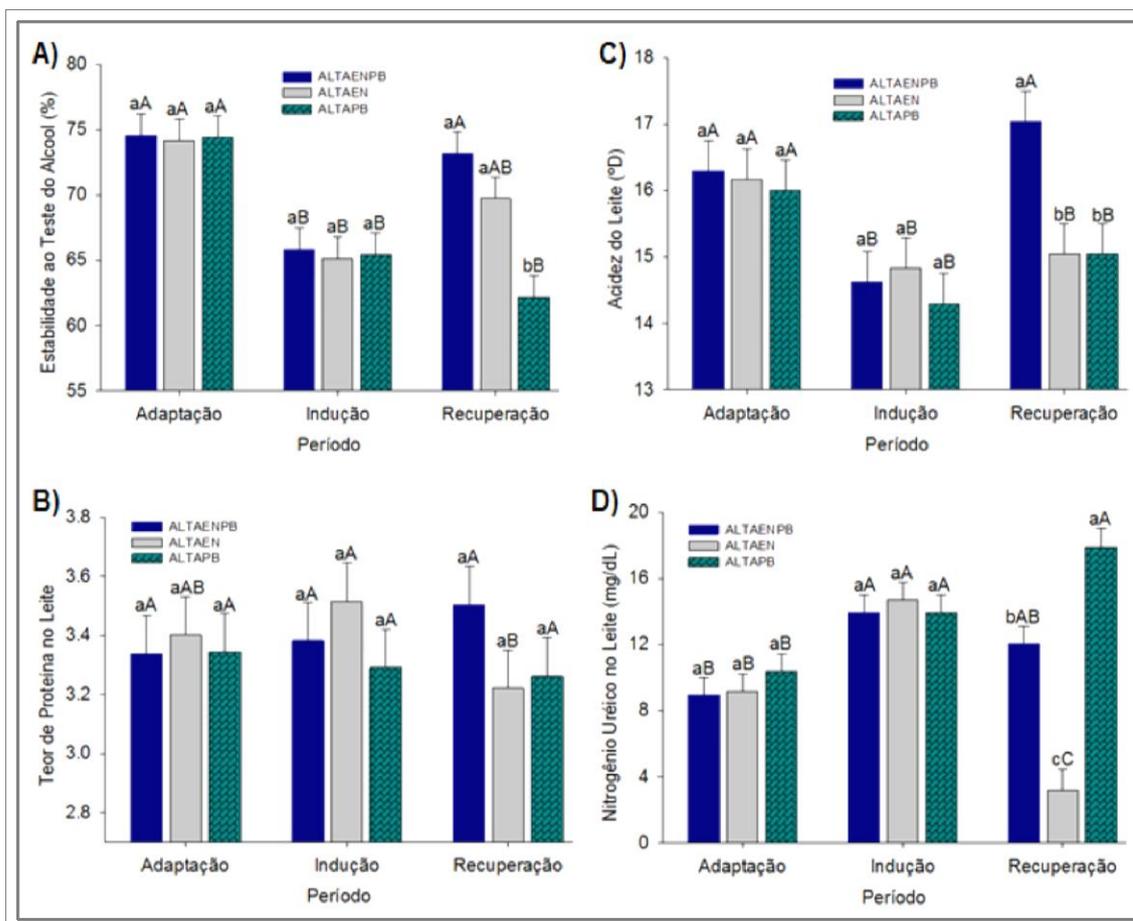
**Tabela 2-** Médias e erro-padrão das médias dos parâmetros mensurados no leite e no sangue, de acordo com o período de adaptação, indução e recuperação.

Parâmetros	Períodos			EPM <sup>4</sup>	P <sub>per</sub>	P <sub>per*trat</sub>
	Adaptação <sup>1</sup>	Indução <sup>2</sup>	Recuperação <sup>3</sup>			
Atributos medidos nos animais						
Produção de Leite (Kg)	20,02 <sup>a</sup>	13,09 <sup>c</sup>	15,39 <sup>b</sup>	1,53	<,0001	<,0001
Score de condição Corporal (ECC)	2,79 <sup>a</sup>	2,58 <sup>b</sup>	2,57 <sup>b</sup>	0,10	<,0001	<,0001
Peso Vivo (Kg)	545,78 <sup>a</sup>	496,6 <sup>b</sup>	505,58 <sup>b</sup>	19,96	<,0001	<,0001
Atributos medidos no leite						
Estabilidade ao Álcool (%)	74,39 <sup>a</sup>	65,47 <sup>c</sup>	68,36 <sup>b</sup>	1,35	<,0001	<,0001
Acidez (°D)	16,15 <sup>a</sup>	14,58 <sup>b</sup>	15,71 <sup>a</sup>	0,39	<,0001	0,0015
pH	6,76 <sup>b</sup>	6,85 <sup>a</sup>	6,82 <sup>a</sup>	0,02	<,0001	0,053
Gordura (%)	3,74 <sup>c</sup>	4,69 <sup>a</sup>	4,29 <sup>b</sup>	0,20	<,0001	0,16
Proteína (%)	3,36 <sup>a</sup>	3,39 <sup>b</sup>	3,32 <sup>ab</sup>	0,07	0,43	0,011
Lactose (%)	4,39 <sup>ab</sup>	4,50 <sup>a</sup>	4,31 <sup>b</sup>	0,10	0,034	0,78
Extrato Seco Desengordurado (%)	8,74 <sup>ab</sup>	9,01 <sup>a</sup>	8,59 <sup>b</sup>	0,15	0,0047	0,34
Sólidos Totais (%)	12,47 <sup>b</sup>	13,71 <sup>a</sup>	12,88 <sup>b</sup>	0,32	<,0001	0,21
Score de células somáticas (ECS)	1,96 <sup>b</sup>	2,17 <sup>a</sup>	2,04 <sup>ab</sup>	0,15	0,007	0,12
Nitrogênio Ureico no Leite (mg/dL)	9,50 <sup>b</sup>	14,20 <sup>a</sup>	11,05 <sup>b</sup>	0,71	<,0001	<,0001
Atributos medidos no sangue						
Haptoglobina (g/L)	0,54 <sup>a</sup>	0,38 <sup>a</sup>	0,56 <sup>a</sup>	0,15	0,66	0,69
Albumina (g/L)	30,17 <sup>b</sup>	32,15 <sup>a</sup>	31,38 <sup>a</sup>	0,65	0,0001	0,09
β-hidroxibutirato (BHBA) (mmol/L)	0,44 <sup>ab</sup>	0,49 <sup>a</sup>	0,42 <sup>b</sup>	0,03	0,01	0,26
Galactose (nmol/μL)	0,226 <sup>b</sup>	0,243 <sup>ab</sup>	0,245 <sup>a</sup>	0,008	0,01	0,92

<sup>1</sup>Dieta de 100% de energia e 100% de Proteína; <sup>2</sup> Dieta de 50% de energia e 50% de proteína; <sup>3</sup>Dieta de 100% de energia e 100% de proteína, Dieta de 100% de energia e 50% de proteína, Dieta de 100% de proteína e 50% de energia; <sup>4</sup> Erro padrão da média



**Figura 1.** Parâmetros zootécnicos. A) Produção de Leite (Kg); B) Peso vivo (Kg); C) Escore de condição corporal. ALTAENPB: dieta de 100% de energia e 100% de proteína; ALTAEN: dieta de 100% de energia e 50% de proteína; ALTAPB: dieta de 100% proteína e 50% de energia. Letras minúsculas teste dentro de período; Letras maiúsculas teste entre períodos. Letras minúsculas iguais e letras maiúsculas iguais não diferem pelo Teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).



**Figura 2.** Parâmetros físico-químicos do leite. A) Estabilidade ao teste do álcool; B) Teor de proteína no leite; C) Acidez do leite em graus dornic; D) Nitrogênio uréico no leite. ALTAENPB: dieta de 100% de energia e 100% de proteína; ALTAEN: dieta de 100% de energia e 50% de proteína; ALTAPB: dieta de 100% proteína e 50% de energia. Letras minúsculas teste dentro de período; Letras maiúsculas teste entre períodos. Letras minúsculas iguais e letras maiúsculas iguais não diferem pelo Teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 3** - Médias e erro-padrão das médias dos parâmetros mensurados, conforme as dietas utilizadas no período de recuperação.

Parâmetros	Recuperação			EPM <sup>4</sup>	P <sub>trat</sub>
	ALTAENPB <sup>1</sup>	ALTAEN <sup>2</sup>	ALTAPB <sup>3</sup>		
Haptoglobina (g/L)	0,41	0,36	0,71	0,15	0,20
Albumina (g/L)	30,83	31,51	31,34	0,65	0,27
β-hidroxibutirato (BHBA) (mmol/L)	0,44	0,46	0,46	0,03	0,81
Galactose (nmol/μL)	0,238	0,242	0,236	0,008	0,67

<sup>1</sup>Dieta de 100% de energia e 100% de proteína; <sup>2</sup>Dieta de 100% de energia e 50% de proteína; <sup>3</sup> Dieta de 100% de proteína e 50% de energia; <sup>4</sup> Erro padrão da média

**CAPÍTULO III**  
**Acidose ruminal subaguda (SARA) e as alterações nas características físico químicas do leite e nos parâmetros sanguíneos<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup> Elaborado de acordo com as normas da Animal

## **Acidose ruminal subaguda (SARA) e as alterações nas características físico químicas do leite e nos parâmetros sanguíneos**

**Resumo:** A acidose ruminal subaguda (SARA) é um transtorno metabólico que acomete vacas leiteiras, tendo efeito negativo no metabolismo, na saúde do animal com comprometimento da produção e qualidade do leite produzido. Objetivou-se com este estudo foi avaliar os efeitos da acidose ruminal sobre a ocorrência de processos inflamatórios e relacionar com as alterações na produção e composição do leite. Foram utilizadas doze vacas Holandês e Mestiças x Holandês Jersey, divididas em dois grupos (1) controle e (2) acidose. O delineamento experimental foi reversível simples com dois tratamentos e dois períodos experimentais. Foram analisados parâmetros referente às características físico-química do leite, saúde da glândula mamária, medidas fisiológicas, perfil metabólico e parâmetros sanguíneos. Os dados da fase de indução à acidose foram submetidos à análise de variância utilizando-se o procedimento MIXED. A indução a SARA causou redução da produção e estabilidade do leite ao teste do álcool, pH urinário, pH fecal e pH ruminal. Entranto, a indução a SARA não alterou os parâmetros sanguíneos avaliados. A acidose subaguda altera as características físico-químicas do leite, porém nas condições, a qual o estudo foi desenvolvido não foi possível observar alterações nas proteínas de fase aguda, caracterizando uma resposta inflamatória. A acidose subaguda pode acometer os animais sem apresentar mudanças no perfil sanguíneo dos mesmos.

**Palavras-chave:** perfil sanguíneo, pH ruminal, qualidade do leite, resposta inflamatória

**Subacute ruminal acidosis (SARA) and changes in physical and chemical characteristics of milk and blood parameters**

**Abstract:** Subacute ruminal acidosis (SARA) is a metabolic disorder that affects dairy cows, with a negative effect on metabolism, on the health of the animal with impaired production and quality of milk produced. The aim of the study was to evaluate the effects of acidosis on the occurrence of inflammatory processes and relate to changes in production and composition of milk. Twelve Holstein and cross bred Holstein and Jersey cows were divided into two groups (1) control and (2) acidosis. The experimental design was simple reversible with two treatments and two experimental periods. Physiochemical characteristics, health of the mammary gland, physiological measures, metabolic profile and blood parameters were analyzed. Data from the acidosis induction phase were submitted to analysis of variance using the MIXED procedure. SARA induction caused reduced milk production and stability to alcohol test, urinary pH, fecal pH, ruminal pH. Therefore, induction of SARA did not change the blood parameters evaluated. Subacute acidosis changes the physico-chemical characteristics of the milk, but in the conditions to which the studies were developed it was not possible to observe changes in the acute phase proteins, characterizing an inflammatory response. Sara can affect the animals without presenting changes in the blood profile of the animals.

**Keywords:** blood profile, inflammatory response, milk quality, ruminal pH.

### **Implicações**

A ocorrência de acidose ruminal aguda e subaguda é relativamente comum, e as situações de risco são mais comuns em vacas no início da lactação, vacas de alta produção leiteira, vacas consumindo concentrado fornecido separado do volumoso. A forma desequilibrada de ingresso dos nutrientes no organismo do animal, a biotransformação dos mesmos, podem resultar em substâncias que ocasionam alterações no organismo do animal. Essas alterações podem ter impacto negativo na produção, síntese dos componentes e na qualidade do leite produzido, ocasionando o comprometimento da matéria prima no processamento industrial.

### **Introdução**

A alta incidência de doenças, incluindo cetose, febre do leite, mastite, laminite, deslocamento de abomaso, acidose ruminal entre outras, pode causar um declínio substancial na lucratividade da maioria dos processos, a qual o leite é submetido dentro da indústria (Ametaj et al., 2010a). A acidose ruminal subaguda (SARA) é uma patologia muito insidiosa em vacas leiteiras (Cannizzo *et al.*, 2012). A SARA ocorre quando se tem redução pH ruminal em níveis não fisiológicos, depois de receber alimentos concentrados de alto valor acidogenico (Shabani e Ceroni, 2013). SARA é um distúrbio digestivo sendo um problema de saúde crescente na maioria dos rebanhos leiteiros, com

estudos que sugerem uma incidência de entre 19% e 26% durante a lactação (Zangh *et al.*, 2017). Esse distúrbio digestivo provoca alterações na flora ruminal, favorecendo a presença de bactérias gram-negativas e consequentemente a liberação de endotoxinas (LPS) no ambiente ruminal (Emmanuel *et al.*, 2008; Zebeli e Metzler-Zebeli *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2017). Diversos estudos relacionaram a liberação de endotoxinas com a ocorrência de respostas inflamatórias, através do aumento das concentrações plasmáticas das proteínas de fase aguda (APP) (Chen *et al.*, 2011). Alterações na permeabilidade epitélio ruminal e intestinal foram relacionadas com aumento das AP (Zhang *et al.*, 2017). Com relação às alterações provocadas por endotoxinas na glândula mamária, o que se tem no momento são desafios através da infusão de Lipopolissacários (LPS) na glândula mamária (Hinz *et al.*, 2012; Lehmann *et al.*, 2013), provocando alterações na permeabilidade do tecido epitelial mamário. Entranto, ainda não se conseguiu provocar resposta inflamatória na glândula mamária por meio da indução de acidose ruminal. Assim, objetivo-se com este estudo avaliar os efeitos da acidose ruminal sobre a ocorrência de processos inflamatórios e relacionar com as alterações na produção e composição do leite.

## **Material e Métodos**

### *Considerações Éticas*

Todos os procedimentos com os animais tiveram a aprovação da Comissão de ética no uso de animais em pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul/UFRGS, sob o protocolo número 21901.

### *Descrição do Local, Animais e Manejo*

O estudo foi conduzido no campo experimental da Universidade do Estado de Santa Catarina-CAV/UEDESC, que se localiza nas coordenadas 27°47'06.32"S 50°18'16.76'O, com 914 metros de altitude, em uma região que apresenta Clima Cfb (Alvares *et al.*, 2013), com temperatura média anual de 14,3°C. Durante o estudo a temperatura média foi de 10,2°C, sendo que a média mínima 5,8°C e media máxima de 15,8°C (Dados fornecidos pela estação experimental do centro de ciências agroveterinárias-CAV/UEDESC). O estudo foi realizado no período de maio a julho de 2016, em Lages, Santa Catarina, Brasil. Foram utilizadas doze vacas Holandês e Mestiças x Holandês Jersey, divididas em dois grupos quanto à produção de leite ( $22,5 \pm 3,0$  L/dia), dias em lactação ( $175 \pm 87$  dias), peso vivo ( $506 \pm 66,5$  kg) e estabilidade ao teste do álcool ( $78 \pm 3$ ). As vacas foram confinadas em dois piquetes a céu aberto, previamente roçados (para eliminar as possibilidades de as vacas pastejarem), com livre acesso água durante todo o experimento. As dietas foram fornecidas exclusivamente no cocho, as quais foram formuladas seguindo recomendações das exigências nutricionais do National Research Council - NRC (2001) – dieta basal.

O delineamento experimental foi reversível simples com dois tratamentos e dois períodos experimentais. Os animais foram divididos em dois grupos, onde o primeiro grupo recebeu a sequência de tratamentos controle/acidose, enquanto o segundo o grupo receberam acidose/controle. Cada período experimental foi composto por 3 fases: Adaptação, Indução e

recuperação. Durante a fase de adaptação (1 a 15 dias), os animais receberam uma dieta composta de 70% volumoso e 30% de concentrado (AV). Na fase de indução 1 (16 a 20 dias), os animais foram divididos em dois grupos, onde para o grupo 1 foi administrada uma dieta com 70% de concentrado e 30% de volumoso (AC), para induzir o quadro de acidose subclínica (SARA) e o grupo dois permaneceu na dieta de 70% de volumoso e 30% de concentrado (AV). Durante a fase de recuperação (21 a 28 dias), os animais dos dois grupos voltaram a receber uma dieta com 70% volumoso e 30% de concentrado (Tabela 1).

Os alimentos foram fornecidos aos animais após as ordenhas, duas vezes ao dia. As amostras dos alimentos fornecidos, TMR e eventuais sobras, foram coletadas e congeladas a -20°C para posterior análise. As análises realizadas nos alimentos foram: Fibra em Detergente Neutro (FDN) pelo método proposto por Van Soest *et al.* (1991), utilizando Fiber Analyzer Ankom®, Matéria Seca (MS) e a proteína bruta (PB), através da mensuração de Nitrogênio total pelo método de Kjeldahl (Aoac, 1995). Os níveis de energia foram calculados como nutrientes digestíveis totais (NDT), determinados pelo método descrito por Weiss *et al.* (1992).

As vacas foram ordenhadas mecanicamente duas vezes ao dia, 06:30 h e 17:30 h (GMT -03:00), em sala de ordenha disposta em formato espinha de peixe 2x4. Em todas as ordenhadas foram registrados os dados de produção de leite, com auxílio do medidor WAIKATO® Multi Meter aprovado pelo ICAR (*International Committee for Animal Recording*).

### *Coleta e Análise de Leite*

Nos dias 16, 17, 18, 19, 30, 32, 34, 36, e 38 foram coletadas amostras compostas (na ordenha manhã e a ordenha da tarde) de leite e enviadas para o Laboratório da Universidade do Contestado (CIDASC/UnC), Concórdia/SC, em frascos contendo Bronopol. Essas amostras foram submetidas à análise de Contagem de Células Somáticas (CCS) através de citometria de fluxo (*Delta Combiscope, Advanced Instruments®, Inc., U.S.A.*). Amostras compostas de leite da ordenha diária coletadas foram encaminhadas para o laboratório de Centro diagnóstico microbiológico animal da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) para determinação de gordura, proteína, lactose, caseína e nitrogênio ureico no leite (NUL) por infravermelho (*Bentley DairySpec, Bentley Instruments®, Inc., U.S.A.*). A cada ordenha foram coletadas amostras adicionais de leite para serem submetidas às análises físico-químicas, sendo armazenadas em refrigeração entre 3 e 8°C e analisadas 12 horas após a coleta com tampa aberta, para facilitar a evaporação do CO<sub>2</sub> presente na amostra. O teste do álcool (Tronco, 2010) consistiu da mistura de 2 mL de leite e 2 mL de solução alcoólica em concentrações variando de 55 a 90% v/v, e os resultados foram expressos como a concentração mínima de etanol necessária para induzir a coagulação de leite. Acidez titulável foi realizada por titulação com solução de 0,1 N de NaOH (Tronco, 2010) e o pH através de potenciometria. A concentração cálcio iônico no leite foi determinado por potenciometria (Potenciômetro Orion 4 Star, Thermo Scientific®), utilizando o eletrodo seletivo para cálcio e um eletrodo de referência para cálcio iônico (Eletrodos Orion, Thermo Scientific®).

### *Dados Fisiológicos e Parâmetros Sanguíneos*

Nos dias 16, 17, 18, 19, 30, 32, 34, 36, e 38 foram mensurados e registrados os parâmetros fisiológicos Temperatura Retal (TR), Frequência Respiratória (FR), Frequência Cardíaca (FC), Movimentos Ruminais (MR), pH fecal e pH Urinário em dois momentos: depois de cada ordenha (Manhã e Tarde). A temperatura retal (TR) foi medida com auxílio de termômetro clínico digital (Omron® Mc-245) inserido junto à parede do reto do animal, à profundidade de aproximadamente 3,5 cm. A frequência cardíaca (FC), expressa em número de batimentos por minuto foi medida com auxílio de estetoscópio e cronômetro durante um minuto. A frequência respiratória (FR), expressa em número de movimentos respiratórios por minuto foi medida com auxílio de estetoscópio e cronômetro, mediante a auscultação dos movimentos respiratórios durante um minuto. O número de movimentos ruminais (MR) expressos em números de movimentos a cada dois minutos, foi medido com auxílio de um estetoscópio, pela inspeção direta na região de vazio do flanco esquerdo do animal, mediante a auscultação dos movimentos ruminais por dois minutos. As fezes foram coletas diretamente da ampola retal do animal e a coleta de urina foi realizada através da micção estimulada por massagem na vulva, sendo desprezados os primeiros jatos. As amostras de urina e de fezes foram armazenadas em potes coletores de 50 mL, as análises do pH urinário e das fezes foram realizadas logo após a coleta, com auxílio de medidor de pH digital MB-10 Marte®.

Nos dias 19 e 38, antes do fornecimento dos alimentos depois da ordenha da tarde foi coletado sangue através de punção na veia jugular, em tubos vacutainer de 4 mL heparinizados. Os tubos de 4 mL foram centrifugados por 10 min a 3.000 rpm para separar o plasma. O plasma foi separado em alíquotas utilizando microtubos eppendorf de 2,0 mL e armazenado a - 20° C para posterior análise. A determinação da concentração de BHBA foi realizada através do método descrito por Ballou *et al.* (2009), utilizando um kit comercial (Ranbut, Randox, Oceanside, CA). A aferição da concentração de haptoglobina foi realizada utilizando o método colorimétrico descrito por Jones e Mould (1984), adaptado por Schneider *et al.* (2013). A albumina plasmática foi determinada seguindo as especificações de kit comercial (Labtest, MG, Brasil) utilizando o analisador bioquímico automático Labmax Plenno (Labtest, MG, Brasil). Para a mensuração dos parâmetros sanguíneos, foram coletadas com auxílio de seringas de 1 mL amostras de sangue da artéria auricular caudal para a determinação do pH sanguíneo, pressão de dióxido de carbono ( $pCO_2$ ), pressão de oxigênio ( $pO_2$ ), total de dióxido de carbono ( $tCO_2$ ), bicarbonato ( $HCO_3$ ), excesso de bases na totalidade dos fluídos extracelulares (BE<sub>cef</sub>), saturação de oxigênio ( $sO_2$ ), Lactato (Cartucho abbott CG4+). Esses parâmetros sanguíneos foram determinados com auxílio do analisador de gases portátil (IStat, abbott Point of Care, EUA). Nesses dias (19 e 38) também foram coletadas amostras do líquido ruminal através da técnica de ruminocentese de acordo com a metodologia descrita por Noro *et al.* (2013) e para aferição do pH ruminal logo após a coleta com auxílio de um medidor de pH digital MB-10 Marte®.

### *Avaliação da Condição Corporal e Peso Vivo*

A avaliação do escore condição corporal e pesagem dos animais foi realizada após a ordenha da manhã e antes do fornecimento da alimentação nos dias 19 e 38. Para avaliação do escore de condição corporal foi utilizada a metodologia proposta por Ferguson *et al.* (1994), a qual consiste da visualização de sete regiões no animal, utilizando escala de 1 a 5 e pesagem das vacas para a determinação do peso corporal. A pesagem dos animais foi realizada com auxílio de uma balança digital portátil para Bovinos (Técnica Industrial Oswaldo Filizola Ltda).

### *Análise estatística*

Os dados da fase de indução à acidose foram submetidos à análise de variância utilizando-se o procedimento MIXED do pacote estatístico SAS<sup>®</sup>, sendo que cada vaca foi considerada como unidade experimental. Foram analisadas produção de leite, escore de condição corporal, peso vivo, estabilidade ao teste do álcool, acidez do leite, pH do leite, teor gordura, teor proteína, teor de lactose, teor de sólidos totais, escore de células somáticas e concentração de cálcio iônico no leite. Os parâmetros fisiológicos analisados foram a frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura retal, movimentos ruminais, pH ruminal, pH Urinário, pH fecal. Os parâmetros sanguíneos analisados foram o pH, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>, Becef, tCO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, Lactato, Haptoglobina, Albumina, β-hidroxibutirato. O nível de significância considerado foi de P < 0,05. Para se obter o ECS (Escore de Células Somáticas) foi

realizada a transformação utilizando a seguinte fórmula descrita por Ali e Schoock (1980), a partir da contagem de células somáticas:  $ECS = ((\log_2 (CCS/100.000) + 3)$ .

Os dados foram analisados de acordo com o modelo estatístico:

$$Y_{ij} = \mu + P_i + T_j + e_{ij}$$

onde:

$Y_{ij}$  = produção de leite, escore de condição corporal, peso vivo, estabilidade ao teste do álcool, acidez do leite, pH do leite, teor gordura, teor proteína, teor de lactose, teor de sólidos totais, escore de células somáticas e concentração de cálcio iônico no leite, frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura retal, movimentos ruminais, pH ruminal, pH Urinário, pH fecal, pH sanguíneo,  $pCO_2$ ,  $pO_2$ , Becef,  $tCO_2$ ,  $SO_2$ , lactato, haptoglobina, albumina,  $\beta$ -hidroxibutirato de vacas pertencentes ao  $i$ -ésimo período, no seu  $j$ -ésimo tratamento.

$\mu$  = média geral

$P_i$  = efeito do  $i$ -ésimo período ( $i$ =Indução 1, Indução 2)

$T_j$  = efeito do  $j$ -ésimo tratamento ( $j$ = Alto Volumoso, Alto Concentrado)

$e_{ij}$  = erro experimental

## Resultados

O período (Tabela 4) influenciou o peso vivo corporal ( $P=0,01$ ), teor de proteína ( $P=0,01$ ), estabilidade ao teste do álcool ( $P=<,0001$ ) e pH do Leite ( $P=<,0001$ ). Na indução 2, os animais apresentaram maior peso vivo e o leite

apresentou teor de proteína, estabilidade ao teste do álcool e pH do leite maior em relação ao período de indução 1.

O tratamento influenciou a produção de leite ( $P=0,0008$ ), estabilidade do leite ao teste do álcool ( $P=0,003$ ) e teve uma tendência para modificar a concentração de cálcio iônico ( $P=0,09$ ). O tratamento AV apresentou maiores valores de produção de leite, estabilidade ao teste do álcool em relação ao tratamento AC (Tabela 4). O cálcio iônico tendeu a ser maior no tratamento AV.

Com relação aos parâmetros fisiológicos (Tabela 5) avaliados nesse estudo, o período afetou a frequência respiratória ( $P=0,0001$ ), temperatura retal ( $P=0,002$ ) e pH urinário ( $P=0,0001$ ). A frequência respiratória e o pH urinário foram maiores na indução 2. A Temperatura retal foi maior na indução 1.

O Tratamento teve efeito na frequência cardíaca ( $P=0,024$ ), frequência respiratória ( $P=0,0004$ ), pH Ruminal ( $P=0,0006$ ), pH urinário ( $P<,0001$ ) e pH fecal ( $P=0,0011$ ). A frequência cardíaca, frequência respiratória, pH Ruminal, pH urinário e pH fecal foram menores no tratamento acidose (AC) em relação ao controle (AV) (Tabela 5).

Os períodos e os tratamentos (Tabela 6) não tiveram efeito ( $P>0,05$ ) nos parâmetros sanguíneos avaliados no presente estudo.

## **Discussão**

### *Manejo dos Animais e Dietas*

Os animais utilizados nesse estudo tinham como base de alimentação a pastagem com suplementação de concentrado. Como o manejo

alimentar para desenvolver o presente estudo era completamente diferente do que vinha sendo utilizado no campo experimental, optamos por começar a primeira fase de indução com uma dieta controle com 65,5% de volumoso e 32,5% de concentrado, enquanto a dieta de indução apresentou 43,1% de volumoso e 56,9% de concentrado. Com a oferta de metade da quantidade diária da dieta prevista no primeiro dia de indução tivemos que retirar uma vaca do grupo indução por apresentar as seguintes características: redução abrupta do consumo, extremidades frias, 1 movimento ruminal em 2 minutos. Neste animal foram administrados 500 gramas de bicarbonato diluído em água morna com auxílio de uma sonda ruminal, sendo que este animal foi excluído do estudo. Após três dias de indução, os animais do grupo indução estavam fracionando as refeições, apresentando fezes moles (escore < 2), dorso arqueado, caminhando devagar (dados não apresentados, apenas observações realizadas a campo durante o experimento).

No último dia do período de indução 1, dois animais do grupo acidose, além dos sinais mencionados anteriormente, apresentaram ainda os seguintes sinais: ausência de movimentos ruminais, bexiga repleta, hemoglobinúria, dor ao palpar a uretra, presença de pus nos pêlos da região da vulva. Esses animais foram diagnosticados com cálculo renal, sendo realizada a sondagem uretral por retropropulsão com solução fisiológica morna. No final do período de indução 1, os animais do grupo controle também estavam apresentando fezes moles, sendo um dos sinais característico de acidose (Noro e Noro, 2015). Isso ocorreu possivelmente em função do longo período que esses animais permaneceram recebendo como volumoso apenas silagem

de milho. Segundo Shabani e Ceroni (2013), as vacas leiteiras têm um risco maior de desenvolver acidose em períodos de maior oferta de silagem de milho. Isso ocorre porque a silagem de milho é um alimento rico em energia e de fácil degradabilidade ruminal, em função do tamanho que partícula que a silagem do milho apresenta.

Diante do ocorrido com os animais, optamos em adicionar 1,5 kg de feno para os animais do grupo controle e para os demais períodos após o período de indução 1 foi acrescentado 0,150 kg de calcário calcítico, com o objetivo de corrigir a relação cálcio: fosforo, para evitar novas ocorrência de cálculos renais nos animais.

No período de indução 2, os animais do grupo controle (AV) receberam uma dieta com 64% de volumoso e 34% de concentrado, enquanto os animais do grupo indução (AC) receberam uma dieta com 57,3% de concentrado e 42,7% de volumoso. Entretanto como após nove dias, os animais do grupo indução não apresentavam sinais de acidose (pH ruminal em torno de 6,0), optamos por aumentar em 3,0 kg o concentrado para o grupo indução, passando de 10 para 13 kg, resultando em uma em uma dieta de com 60,7% de concentrado e 39,3% de volumoso, que foi fornecida por tres dias.

#### *Aspectos Zootecnicos e Características físico-químicas do leite*

Na indução 2, os animais apresentaram maior peso vivo e o leite apresentou teor de proteína, estabilidade ao teste do álcool e pH do leite maior em relação ao período de indução 1. O maior peso vivo dos animais na indução 2 pode ter sido devido de terem recebido por mais tempo a dieta controle. O

maior teor de proteína no leite na indução 2, pode ser devido a maior quantidade de concentrado ofertado, conforme comentado anteriormente, em relação à indução 1. Os resultados corroboram com os encontrados por Rutomo *et al.* (2006), os quais também relacionaram aumento no teor de proteína no leite com o aumento de concentrado na dieta.

Apesar das diferenças encontradas para a estabilidade do leite ao teste do álcool com relação ao período de Indução, em ambos os períodos a estabilidade do leite ficou dentro dos padrões exigidos pela IN62 (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2011). Por outro lado, o maior pH e a maior estabilidade do leite observada no período de indução 2, chama a atenção, pois dentro dessa faixa de pH ocorre separação das k-caseínas (camada externa da caseína) das micelas de caseína, reduzindo a estabilidade do leite (Sing, 2004; Horne, 2015).

O efeito negativo da dieta AC sobre a produção de leite, estabilidade ao teste do álcool (Tabela 1) pode ser relacionada com as modificações na microbiota e integridade do epitélio ruminal (embora não tenhamos mensurado esses atributos, e talvez acarretando na produção de LPS, com impacto sobre a integridade das células epiteliais mamárias, reduzindo o volume de leite produzido e a estabilidade do leite ao teste do álcool. Entretanto, eram esperadas alterações na composição do leite, principalmente a ocorrência de redução nos teores de gordura. A redução nos teores de gordura do leite se deve a modificação da microbiota ruminal (Chen *et al.*, 2011; Metzler-Zebeli *et al.*, 2013), pois a medida que aumenta os níveis de concentrado com alta degradabilidade na dieta, ocorre uma queda na população e na atividade das

bactérias celulóticas, que degradam a fibra, tendo como produto dessa atividade a produção dos precursores para a síntese de gordura no leite (Rustomo *et al.*, 2006; Zebeli e Ametaj, 2009). Um resultado inesperado foi a redução dos teores de cálcio iônico no leite provocado pela dieta de indução à acidose (AC), pois o esperado seria que ocorresse um aumento de cálcio iônico no leite dos animais submetidos a SARA.

### *Parâmetros fisiológicos*

Os menores valores de frequência cardíaca, frequência respiratória, pH ruminal, pH urinário e pH fecal no tratamento acidose (AC) em relação ao controle (AV) (Tabela 5) eram esperados, pois ao aumentar a quantidade de concentrado na dieta, provoca queda no pH ruminal, pH urinário e pH fecal. Outros estudos também relacionaram a elevada proporção de concentrado com baixos valores de pH ruminal, pH urinário e pH fecal (Emmanuel *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2012; Metzler-Zebeli *et al.*, 2013; Dancher *et al.*, 2015; Luan *et al.*, 2016; Valente *et al.*, 2017). Essas características são sinais evidentes que comprovam a indução do quadro de acidose subaguda (Plaizer *et al.*, 2017). De forma contrária os resultados encontrados nesse estudo, Coombe *et al.* (2015) não observaram a redução nos parâmetros de pH ruminal, pH urinário e pH fecal em vacas submetidas a condições de acidose ruminal subaguda.

Apesar das diferenças observadas nos períodos de indução 1 e 2 para os parâmetros de frequência respiratórias, temperatura retal e pH urinário, observa-se que os resultados encontrados estão dentro dos níveis normais para esses parâmetros avaliados. Os valores normais de temperatura retal

para bovinos é de 38 a 39,1<sup>0</sup>C e para a frequência respiratória é de 15 a 35 movimentos por minutos (West, 2003). Os valores normais para pH urinário é de 7,7 a 8,4 (González *et al.*, 2014).

### *Parâmetros sanguíneos*

Tanto o período quanto o tratamento (Tabela 6) não afetaram os parâmetros sanguíneo avaliados no presente estudo. O esperado seria que ocorresse alterações nos parâmetros sanguíneos dos animais submetido a SARA. Entretanto, se observa que os parâmetros sanguíneos permaneceram dentro dos intervalos normais para bovinos. Segundo Hernández e Ponce (2006), os valores de referência para pH sanguíneo são 7,35 a 7,50 e para bicarbonato (HCO<sub>3</sub>) são de 24 a 30 mmol/L. Os valores de referência normais para pressão do oxigênio (pO<sub>2</sub>) são de 80 a 102 mmHg, para pressão de dióxido de carbono (pCO<sub>2</sub>) são de 35 a 44 mmHg, para lactato são de 0,55 a 2,2 mmol/l e para albumina sérica são de 27 a 38 g/L (González *et al.*, 2014). Segundo Kaneko *et al.* (2008) os valores de referencia para a saturação de oxigênio (sO<sub>2</sub>) são de 97 a 100. Os valores fisiológicos a para o total de dióxido de carbono (tCO<sub>2</sub>) são de 25,3 a 33,4 mmol/L (Freitas *et al.*, 2010). Com relação a haptoglobina, de acordo com Chan *et al.* (2004) os valores de referência para essa proteína de fase aguda são de 0,03 a 0,08 g/L. Apesar de não ter diferenças significativas nas concentrações plasmáticas para haptoglobina, se observa que as concentrações encontradas forma maiores do que os valores de referência, o que pode indicar a ocorrência de resposta inflamatória durante o estudo. A concentração plasmática de haptoglobina tem

sido utilizada como um indicador de resposta inflamatória para bovinos, o aumento as concentrações plasmáticas de haptoglobina, pode refletir uma resposta inflamatória independente da sua origem, podendo ser infecciosa ou traumática (Wittwer et al., 2015). Uma explicação para este fato, é que as condições a qual o estudo foi desenvolvido não foram suficientes para alterar os parâmetros sanguíneos avaliados.

### **Conclusão**

A acidose subaguda altera a síntese dos componentes e as características físico-químicas do leite, não foi possível observar alterações nas proteínas de fase aguda, caracterizando uma resposta inflamatória. A acidose subaguda pode acometer os animais sem apresentar mudanças no perfil sanguíneo dos mesmos.

### **Referências Bibliográficas**

- Ali Aka and Shook GE 1980. Na optimum transformation for somatic cell concentration in milk. *Journal of Dairy Science* 63, 487-490.
- Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC, Gonçalves JLM and Sparovek G 2013. Köppen's climate classification map for Brazil, *Meteorologische Zeitschrift* 22, 711–728.
- Ametaj BN, Zebeli Q and Iqbal S 2010. Nutrition, microbiota and endotoxin – related diseases in dairy cows. *Revista Brasileira de Zootecnia* 39, 433-444.

Association of Official Analytical Chemists – AOAC 1995, Official methods of analysis. 16 ed, 474p, Washington, DC, USA.

Ballou MA, Gomes RC, Juchem SO and Depeters EJ 2009. Effects of dietary supplemental fish oil during the peripartum period on blood metabolites and hepatic fatty acid compositions and total triacylglycerol concentrations of multiparous Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 92, 657-669.

Chan JP, Chu CC, Fung HP, Chuang ST, Lin YC, Chu R M and Lee SL 2004. Serum haptoglobin concentration in cattle. *Journal Veterinarian Medicine Science* 66, 43-46.

Chen Y, Penner GB Li M, Oba M and Guan L 2011. Changes in bacterial diversity associated with epithelial tissue in the beef cow rumen during the transition to a highgrain diet. *Applied and Enviroment Microbiology* 77, 5770-5781.

Cannizzo C, Giancesella M, Giudice E, Messina V, Piccione G and Morgante M 2012. Serum acute phase proteins in cows with SARA (Subacute Ruminal Acidosis). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 64, 15-22.

Coombe JE, Pyman MF, Mansell PD, Auldish MJ, Anderson GA, Wales WJ, Conley MJ, Manos S, Hannah M and Fischer AD 2015. The effects on ruminal pH and serum haptoglobin after feeding a grain-based supplement to grazing dairy cows as a partial mixed ration or during milking. *The Veterinary Journal* 204, 105-109.

- Danscher, AM, Li S, Andersen PH, Khafipour E, Kristensen NB and Plaizier JC 2015. Indicators of induced subacute ruminal acidosis (SARA) in Danish Holstein cows. *Acta Veterinaria Scandinavica* 57, 1-14.
- Emmanuel DG, Dunn SM and Ametaj BN 2008. Feeding high proportion of Barley grain stimulates an inflammatory response in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 91, 606-614.
- Ferguson JD, Galligan DT and Thomsen N 1994. Principal Descriptors of Body Condition Score in Holstein Cows. *Journal of Dairy Science* 77, 2695-2703.
- Freitas MD, Ferreira MG, Ferreira PM, Carvalho AU, Lage AP, Heinemann MB and Facury Filho EJ 2010. Equilíbrio eletrolítico e ácido-base em bovinos. *Ciência Rural* 40, 2608-2615.
- Henandez R and Ponce P 2006. Relación entre desbalance nutricionales, el metabolism y la composición de la leche em vacas holstein friesland. *Revista Salud Animal* 28, 13-20.
- González FHD, Córrea MN and Silva, SC 2014. Transtornos metabólicos nos animais domésticos. 2nd ed. Porto Alegre: editora da UFRGS, 344p.
- Hinz K, Larsen LB, Wellnitz Q, Bruckmaier RM and Kelly AL 2012 Proteolytic and proteomic changes in milk at quarter level following infusion with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Journal of Dairy Science* 95, 1655-1666.
- Horne, D. S. 2015. Ethanol stability and milk composition. In: *Advanced Dairy Chemistry. Volume 1B: Proteins: Applied Aspects*. 4<sup>th</sup> ed. McSweeney, P.L.H. and O'Mahony, J.A., ed. Springer, Cork.

- Jones, G. and D. Mould. 1984. Adaptation of the guaiacol (peroxidase) test for haptoglobins to a microtitration plate system. *Research in veterinary Science* 37, 87-92.
- Kaneko JJ, Harvey JW and Bruss ML 2008. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6 ed. Sandiego: Academic Press, 928p.
- Lehmann M, Wellnitz O and Bruckmaier RM 2013. Concomitant lipopolysaccharide-induced transfer of blood-derived components including immunoglobulins into milk. *Journal of Dairy Science* 96, 889-896.
- Li S, Khafipour E, Krause DO, Kroeker A, Rodriguez-Lecomph JC and Gozho GN 2012. Effect of subacute ruminal acidosis challenges on fermentation and endotoxins in the rumen and hindgut of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 95, 294-303.
- Luan S, Cowles K, Murphy MR and Cardoso FC 2016. Effect of a grain challenge on ruminal, urine, and fecal pH, apparent total-tract starch digestibility, and milk composition of Holstein and Jersey cows. *Journal of Dairy Science* 99, 2190–2200.
- Metzler-Zebeli BU, Schmitz ES, Klevenhusen F, Lichtenstein LP, Wagner M and Zebeli Q 2013. Grain-rich diets differently alter ruminal and colonic abundance of microbial populations and lipopolysaccharide in goats. *Anaerobe* 20, 65-73.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento 2011. Alteração do caput da Instrução Normativa MAPA n.51, de 18 de Setembro de 2002

(Instrução Normativa n.62). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, Brazil.

Noro M Sepúlveda P, Cárdenas F, Chihuailaf RH and Wittwer F 2013. Rumenocentesis dorsomedial: un procedimiento seguro para la obtención de líquido ruminal en vacas lecheras a pastoreo. Archivos de medicina veterinaria 45, 25-31.

NORO, M.; NORO, G. 2015 Acidose ruminal sudaguda: monitoramento e prevenção nos rebanhos leiteiros. In: 2 Simposio Nacional da Vaca Leiteira, 2015, Porto Alegre, pp. 94-120.

National Research Council 2001. Subcommittee on Dairy Cattle Nutrition. Nutrient requirements of dairy cattle. National Academy Press, Washington, DC, United States of America, 381pp.

Plaizier JC, Li S, Danscher, AM, Derakshani H, Andersen PH and Khafipour E 2017. Changes in Microbiota in Rumen Digesta and Feces Due to a Grain-Based Subacute Ruminal Acidosis (SARA) Challenge. Microbial Ecology. 1-11.

Rustomo B, Alzahal O, Cant JP, Fan MZ Duffield TF, Odongo NE and McBride BW 2006. Acidogenic value of feeds. II. Effects of rumen acid load from feeds on dry matter intake, ruminal pH, fibre degradability and milk production in the lactating dairy cow. Canadian Journal Animal Science 86, 119–126.

Schneider A, Corrêa M And W Butler 2013. Short communication: acute phase proteins in Holstein cows diagnosed with uterine infection. Research in Veterinary Science 95, 269-271.

- SHABANI E and CERONI V 2013. Subacute rumen acidosis (SARA) in cows with intensive breeding in different periods of the year. *Anglisticum Journal (IJLLIS)* 2, 209-213.
- Singh H 2004. Heat Stability of Milk. *International Journal Dairy Technology*. 57, 111-119.
- Tronco V M 2010. Manual para inspeção da qualidade do leite. 4ª ed., Santa Maria. Editora da UFSM. 195p.
- Zebeli Q and Ametaj N 2009. Relationships between rumen lipopolysaccharide and mediators of inflammatory response with milk fat production and efficiency in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 92, 3800-3809.
- Zebeli Q And Metzler-Zebeli BU 2012. Interplay between rumen digestive disorders and diet-induced inflammation in dairy cattle. *Research in Veterinary Science* 93, 1099-1108.
- Valente TNP, Sampaio CB, Lima ES, Deminicis BB, Cezario AS and Santos WBR 2017. Aspects of Acidosis in Ruminants with a Focus on Nutrition: A Review. *Journal of Agricultural Science* 9, 90-97.
- Van Soest PJ, Robertson JB and Lewis BA 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74, 3583-3597.
- Zhang R, Liu J and Shengyong M 2017. Impact of subacute ruminal acidosis (SARA) on ruminal microbiome, lipopolysaccharide and bioamine and rumen epithelial health of dairy cows. *Journal of Dairy and Veterinary Sciences* 1, 001-003.

- Weiss WP, Conrad HR and Pierre NRSt 1992. A theoretically-based model for predicting total digestible nutrient values of forages and concentrates. *Animal Feed Science and Technology* 39, 95-110.
- West JW 2003. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 86, 2131–2144.
- Wittwer F 2015. Marcadores bioquímicos sanguíneos en el diagnostic y control de trastornos metabólicos em vacas lecheras. In: 2 SIMPOSIO NACIONAL DA VACA LEITEIRA, 2015, Porto Alegre, pp.34-62.

**Tabela 1-** Quantidade alimentos fornecidos nas dietas experimentais de controle e indução.

Alimentos	Dietas Experimentais	
	(Kg <i>in natura</i> /vaca/dia)	
	Controle	Acidose
	AV	AC
Silagem de Milho	38	21
Milho Grão Moído	2,3	3,7
Farelo de Soja	3,8	3,4
Farelo de Trigo	-	3,0
Núcleo Mineral <sup>1</sup>	0,225	0,315
Sal Mineral	0,065	0,070

<sup>1</sup>Núcleo Mineral: em g/kg min Ca 190, P 60, S 20, Mg 20, K 35, Na 70, em mg/kg Co 15, Cu 700, Cr 10, Fe 700, I 40, Mn 1600, Se 19, Zn 2500, UI/kg vit A 200000, Vit D3 50000, Vit E 1500, F(max) 600 mg/kg.

**Tabela 2.** Composição dos alimentos fornecidos no período de indução 1 de acordo com as dietas (Controle: Alto Volumoso/AV e Acidose: Alto Concentrado/AC) utilizadas.

Alimentos	Dietas							
	Controle				Indução			
	AV				AC			
	kg MS	PB	NDT	FDN	kg MS	PB	NDT	FDN
Silagem	14,3	1,05	9,42	7,73	6,86	0,5	4,53	3,72
Concentrado	6,89	2	5,24	0,9	9,06	2,04	6,89	1,16
Total (kg)	21,19	3,05	14,66	8,63	15,92	2,51	11,42	4,88
% MS		14,4	69,2	40,7		15,77	71,7	30,9

<sup>1</sup>MS = Matéria Seca; <sup>2</sup>PB = Proteína Bruta; <sup>3</sup> NDT = Nutrientes Digestíveis Totais; <sup>4</sup> FDN = Fibra em Detergente Neutro

**Tabela 3.** Composição dos alimentos fornecidos no período de indução 2 de acordo com as dietas (Controle: Alto Volumoso/AV e Acidose: Alto Concentrado/AC) utilizadas.

Alimentos	Dietas							
	Controle				Acidose			
	AV				AC			
	kg MS	PB	NDT	FDN	kg MS	PB	NDT	FDN
Silagem	13,86	1,02	9,15	7,51	6,86	0,5	4,53	3,7
Concentrado	6,6	1,46	5,02	0,84	9,06	2	6,89	1,16
Feno	1,2	0,09	0,79	0,68	-	-	-	-
Calcário	-	-	-	-	0,15	-	-	4,86
Total (kg)	21,66	2,57	14,96	9,03	16,07	2,5	11,42	30,2
% MS		11,76	68,4	41,3	-	15,6	71,1	-

<sup>1</sup>MS = Matéria Seca; <sup>2</sup>PB = Proteína Bruta; <sup>3</sup> NDT = Nutrientes Digestíveis Totais; <sup>4</sup> FDN = Fibra em Detergente Neutro.

**Tabela 4.** Médias e erro-padrão das médias dos parâmetros zootécnicos e físico- químicos do leite, de acordo com o período (Indução 1 e Indução 2) e Tratamentos (Controle: Alto Volumoso/AV e Acidose: Alto Concentrado/AC) utilizados.

Atributos	Período		Tratamento					
	Indução		EPM <sup>1</sup>	P <sub>per</sub>	Controle		Acidose	
	1	2			AV	AC	EPM <sup>1</sup>	P <sub>trat</sub>
Produção de Leite <sup>2</sup>	22,16	21,54	1,07	0,20	22,73 <sup>a</sup>	20,97 <sup>b</sup>	1,08	0,0008
Peso Vivo <sup>3</sup>	504,58 <sup>b</sup>	529,19 <sup>a</sup>	22,11	0,01	517,48	516,28	22,14	0,87
ECC <sup>4</sup>	2,77	2,70	0,08	0,21	2,74	2,73	0,08	0,95
Gordura <sup>5</sup>	4,62	4,45	0,13	0,12	4,61	4,46	0,13	0,16
Proteína <sup>5</sup>	3,42 <sup>b</sup>	3,52 <sup>a</sup>	0,11	0,01	3,48	3,47	0,11	0,76
Lactose <sup>5</sup>	4,83	4,80	0,06	0,27	4,80	4,83	0,06	0,21
Caseína <sup>5</sup>	2,88	2,39	0,11	0,11	2,88	2,93	0,11	0,24
Sólidos Totais <sup>5</sup>	13,77	13,74	0,19	0,78	13,82	13,69	0,19	0,27
Teste do álcool <sup>6</sup>	78,13 <sup>b</sup>	80,17 <sup>a</sup>	0,78	<,0001	79,91 <sup>a</sup>	78,39 <sup>b</sup>	0,78	0,003
Acidez <sup>7</sup>	15,09	14,79	0,22	0,13	14,95	14,93	0,22	0,90
pH	6,94 <sup>b</sup>	7,00 <sup>a</sup>	0,01	<,0001	6,98	6,97	0,01	0,33
Cálcio Iônico <sup>8</sup>	70,51	74,39	1,73	0,11	74,49 <sup>c</sup>	70,40 <sup>d</sup>	1,71	0,09
ECS <sup>9</sup>	2,08	2,02	0,12	0,29	2,08	2,03	0,12	0,37

<sup>1</sup>Erro padrão da média; <sup>2</sup> Expresso em Litros/dia; <sup>3</sup> Expresso em Kg; <sup>4</sup>Escore de Condição Corporal; <sup>5</sup>Expresso em porcentagem (%); <sup>6</sup>Expresso em porcentagem %v/v; <sup>7</sup> Expresso em graus Dornic (°D); <sup>8</sup>Expresso em mg/L; <sup>9</sup> Escore de células Somáticas.

a, b médias na mesma linha seguidas de letras distintas são diferentes (P<0,05)

c, d médias na mesma linha seguidas de letras distintas tendem a ser diferentes (P<0,10).

**Tabela 5.** Médias e erro-padrão das médias dos parâmetros Fisiológicos, de acordo com o período (Indução 1 e Indução 2) e Tratamentos (Controle: Alto Volumoso/AV e Acidose: Alto Concentrado/AC) utilizados.

Atributos	Período				Tratamento			
	Indução		EPM <sup>1</sup>	<i>P</i> <sub>per</sub>	Controle		EPM <sup>1</sup>	<i>P</i> <sub>trat</sub>
	1	2			AV	AC		
Frequência cardíaca <sup>2</sup>	76,7	77,5	1,7	0,53	78,7 <sup>a</sup>	75,5 <sup>b</sup>	1,7	0,024
Frequência respiratória <sup>3</sup>	29,0 <sup>b</sup>	32,2 <sup>a</sup>	1,0	0,001	32,5 <sup>a</sup>	28,8 <sup>b</sup>	1,0	0,0004
Temperatura Retal <sup>4</sup>	38,2 <sup>a</sup>	38,0 <sup>b</sup>	0,1	0,002	38,1	38,1	0,1	0,62
Movimentos Ruminais <sup>5</sup>	3,4	3,5	0,1	0,44	3,6	3,4	0,1	0,17
pH Ruminal	5,9	5,8	0,1	0,46	6,2 <sup>a</sup>	5,5 <sup>b</sup>	0,1	0,0006
pH urinário	7,6 <sup>b</sup>	7,8 <sup>a</sup>	0,1	0,0001	7,9 <sup>a</sup>	7,6 <sup>b</sup>	0,1	<,0001
pH fecal	6,1	6,1	0,04	0,82	6,2 <sup>a</sup>	6,1 <sup>b</sup>	0,04	0,0011

<sup>1</sup>Erro padrão da média; <sup>2</sup> Expresso em Batimentos por minutos (Batimentos/min); <sup>3</sup> Expresso em movimentos por minuto (movimentos/min); <sup>4</sup> Expresso em graus celsius (°C); <sup>5</sup>Expresso em movimentos a cada dois minutos (movimentos/2 min);

**Tabela 6.** Médias e erro-padrão das médias dos parâmetros sanguíneos, de acordo com o período (Indução 1 e Indução 2) e Tratamentos (Controle: Alto Volumoso/AV e Acidose: Alto Concentrado/AC) utilizados.

Atributos	Período			Tratamento				
	Indução		EPM <sup>1</sup>	Pper	Controle		EPM <sup>1</sup>	Ptrat
	1	2			AV	AC		
pH	7,46	7,48	0,01	0,13	7,48	7,47	0,01	0,92
PCO <sub>2</sub> <sup>2</sup>	39,41	38,31	1,44	0,50	39,29	38,43	1,45	0,61
PO <sub>2</sub> <sup>2</sup>	75,20	71,90	2,10	0,30	75,30	71,80	2,10	0,27
Becef <sup>3</sup>	4,78	5,40	0,61	0,48	5,48	4,70	0,61	0,38
HCO <sub>3</sub> <sup>3</sup>	28,55	28,66	0,62	0,91	28,82	28,39	0,62	0,64
TCO <sub>2</sub> <sup>3</sup>	29,70	29,80	0,71	0,93	30,00	29,50	0,71	0,63
SO <sub>2</sub> <sup>4</sup>	95,77	94,80	0,71	0,35	95,77	94,80	0,71	0,35
Lactato <sup>3</sup>	0,58	0,88	0,11	0,12	0,75	0,71	0,11	0,81
Haptoglobina <sup>5</sup>	2,32	0,43	1,32	0,34	1,95	0,81	1,32	0,56
Albumina <sup>5</sup>	35,43	33,85	1,13	0,30	34,22	35,06	1,13	0,57
β-hidroxibutirato (BHBA) <sup>3</sup>	0,53	0,46	0,06	0,47	0,55	0,45	0,06	0,32

<sup>1</sup>Erro padrão da média; <sup>2</sup> Expresso em milímetro de mercúrio (mmHg); <sup>3</sup> Expresso em milimol por litro (mmol/L); <sup>4</sup>Expresso em porcentagem (%); <sup>5</sup>Expresso em gramas por litro (g/L).

## **CAPÍTULO IV**

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os sistemas de produção de leite sofrem influência de vários fatores, como por exemplo, relevo, índice pluviométrico, condições climáticas e grau de instrução dos produtores. Esses fatores tem efeitos direto e indireto na disponibilidade e qualidade dos alimentos fornecidos, além de interferirem na forma do manejo alimentar com os animais. Todos esses fatores influenciam no desempenho produtivo, na fisiologia e no metabolismo do animal. Essa problemática pode propiciar situações de restrição no aporte nutricional e de ocorrência de Acidose Ruminal Subaguda (SARA).

A restrição nutricional em energia e ou proteína provoca alterações no metabolismo do animal, alterando a síntese dos componentes lácteos, tendo reflexos negativos na qualidade do leite produzido. Podendo levar o produtor a ser penalizado pela qualidade da matéria prima entregue de qualidade inferior ao estabelecido pela legislação vigente. A magnitude dos efeitos da nutricional em energia e proteína no organismo do animal pode não ser tão severa quanto à magnitude da redução na quantidade de alimento fornecido, mas os seus efeitos dependem da intensidade e duração da restrição alimentar ou nutricional em energia e proteína. Por outro lado, o excesso de proteína na dieta reduz a eficiência de utilização da proteína bruta, aumentando os custos de produção com consequências negativa na reprodução dos animais.

A Acidose ruminal subaguda ocorre com elevada oferta de concentrado na dieta dos animais, ocasionando a queda no pH ruminal, provocando alteração na microbiota ruminal e alterando a disponibilidade dos ácidos graxos voláteis, tendo efeitos negativos na produção e qualidade do leite produzido. Porém, a forma de manejo alimentar dos animais influencia a resposta dos mesmos à acidose. Animais mantidos basicamente a pasto com pouca suplementação de concentrado, podem ter maior ou menor susceptibilidade a desenvolver quadros de acidose, ou seja, existe um variação individual à resposta. Por outro lado, dependendo da intensidade e duração da permanência do baixo pH ruminal, pode não ocorrer alterações no perfil sanguíneo dos animais acometidos com acidose ruminal subaguda. Isso é um problema, pois os produtores podem ter prejuízos, sem saber ou pela demora na identificação da SARA nos animais do rebanho.

Mais estudos são necessários para verificar os mecanismos envolvidos por trás das alterações nas propriedades físico-químicas do leite, no metabolismo animal e suas relações com a atividade da plasmina, bem como os seus reflexos negativos no processamento industrial.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, A. S. **Fatores nutricionais e não nutricionais que afetam a produção e composição do leite Bovino**. 2015. 245f. Tese (Doutorado em Zootecnia – Produção Animal) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.
- ABREU, A.S. et al. Estresse calórico por privação de acesso à sombra em vacas holandesas reduz a produção leiteira e a estabilidade térmica de leite. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL SOBRE LECHE INSTABLE, 2., 2011, Colônia del Sacramento. **Anais...** Colônia del Sacramento: Universidad de la República Uruguay, 2011. 1 CD-ROM.
- AMETAJ, B. N.; ZEBELI, Q.; IQBAL, S. Nutrient, microbiota and endotoxin – related diseases in dairy cows. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.39, supl. esp., p. 433-444, 2010.
- BARBOSA, H. P. et al. Caracterização físico-química de amostras de leite in natura comercializados no estado da Paraíba. **Revista de Ciência da Saúde Nova Esperança**, João Pessoa, v.12, n.2, 2014. (no prelo)
- BAUMGARD, L.H.; RHOADS, R.P. The effects of hyperthermia on nutrient partitioning. In: CORNELL NUTR. CONF., 2007, Ithaca, NY. **Proceedings...** Ithaca, NY, 2007. p. 93-104.
- BOUTINAUD, M. et al. Milking and feed restriction regulate transcripts of mammary epithelial cells purified from milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, n.3, p. 988-998, 2008.
- BONDAN, C. Variações na qualidade composicional do leite no rio grande do sul. In: SIMPOSIO NACIONAL DA VACA LEITEIRA, 2., 2015, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015. p. 63-93.
- BRASIL. Instrução Normativa N 62 de 29 de dezembro de 2011. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**, Brasília, seção 1, p. 6, 2011.
- BURKE, C. R. et al. Effects of an acute feed restriction at the on set of the seasonal breeding period on reproductive performance and milk production in pasture – grazed dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, n.3, p. 1116-1125, 2010.

CHEN, Y. et al. Changes in bacterial diversity associated with epithelial tissue in the beef cow rumen during the transition to a highgrain diet. **Applied and Environment Microbiology**, Whashington, v.77, n.16, p. 5770-5781, 2011.

DESSAUGE, F. et al. Effects of nutrient restriction on mammary cell turnover and mammary gland remodeling in lactation dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.94, n.9, p. 4623-4635, 2011.

DIONISSOPOULOS, L. et al. A characterization of inflammatory and structural markers within the rumen epithelium during grain-induced ruminal acidosis in lactating dairy cattle. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, Al Ain, n.3, v. 7, p. 141-148, 2012.

DRACKLEY, J. K. et al. Metabolic changes in blood and liver of dairy cows during either feed restriction or administration of 1,3-butanedio. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.74, n.2, p. 4254-4264, 1991.

EMMANUEL, D. G. et al. Acidosis and lipopolysaccharide from escherichia coli b:55 cause hyperpermeability of rumen and colon tissues. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.90, n.12, p. 5552- 5557, 2007.

EMMANUEL, D. G.; DUNN, S. M.; AMETAJ, B. N. Feeding high proportion of Barley grain stimulates an inflammatory response in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.91, n.2, p. 606-614, 2008.

FAGNANI, R. et al. Estabilidade do leite ao álcool ainda pode ser um indicador confiável?. **Ciência Animal Brasileira**, Goiás, v.17, n.3, p. 386-394. 2016.

FERRARETTO, L.F. et al. Effect of feed restriction on reproductive and metabolic hormones in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, n. 2, p. 754-763, 2014.

FRUSCALSO, V. et al. Feeding restriction impairs milk yield and physicochemical properties rendering it suitable for sale. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 70, n.4, p. 237-241, 2013.

GABBI, A. M. et al. Milk traits of lactating cows submitted to feed restriction. **Tropical Animal Health Production**, Edimburgo, v.48, p. 37-43, 2016.

GUINARD-FLAMENT, J. et al. Adaptations of Mammary Uptake and Nutrient Use to Once-Daily Milking and Feed Restriction in Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, p. 5062-5072, 2007.

GUINARD-FLAMENT, J. et al. Changes in mammary uptake and metabolic fate of glucose with once-daily milking and feed restriction in dairy cows. **Reproduction Nutrition Development**, London, v. 46, p. 589-98, 2006.

GROSS, J. et al. Performance and metabolic profile of dairy cows during a lactational and deliberately induced negative energy balance with subsequent realimentation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.94, n.4, p. 1820-1830, 2011.

HERNANDEZ, R.; PONCE, P. Relación entre desbalance nutricionales, el metabolismo y la composición de la leche em vacas holstein friesland. **Revista Salud Animal**, San José de Las Lajas, v.28, n.1, p. 13-20, 2006.

HINZ, K. et al. Proteolytic and proteomic changes in milk at quarter level following infusion with escherichia coli lipopolysaccharide. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.95, p. 1655-1666, 2012.

KOBAYASHI, K. et al. Lipopolysaccharide disrupts the milk-blood barrier by modulating claudins in mammary alveolar tight junctions. **Plos One**, California, v. 8, n.4, e 62187, 2013.

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica de ruminantes**. Santa Maria: UFSM, 2002. 140 p.

LEHMANN, M.; WELLNITZ, O.; BRUCKMAIER, R. M. Concomitant lipopolysaccharide-induced transfer of blood-derived components including immunoglobulins into milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.96, p. 889-896, 2013.

METZLER-ZEBELI, B. et al. Grain-rich diets differently alter ruminal and colonic abundance of microbial populations and lipopolysaccharide in goats. **Anaerobe**, Los Angeles, v.20, p. 65-73, 2013.

MOYES, K. M. et al. Dietary-induced negative energy balance has minimal effect on innate immunity during a streptococcus uberis mastitis challenge in dairy during mid lactation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.92, n.9, p. 4301-4316, 2009.

NORO, M.; NORO, G. Acidose ruminal sudaguda: monitoramento e prevenção nos rebanhos leiteiros. In: SIMPÓSIO NACIONAL DA VACA LEITEIRA, 2., 2015, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015. p. 94-120.

PETERSEN, H. H.; NIELSEN, J. P.; HEEGAARD, P. M. H. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary Research**, London, v. 35, p. 163-187, 2004.

PONCHEKI, J. K.; CARNEIRO, J. H.; ALMEIDA, R. Manejo Nutricional da vaca leiteira para otimizar a composição do leite. In: SIMPÓSIO NACIONAL DA VACA LEITEIRA, 2., 2015, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015. p. 121-159.

- RADCLIFF, R. P. et al. Partial feed restriction decrease growth hormone receptor 1AmRNA expression in postpartum dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.89, n.2, p. 611-619, 2006.
- REMPPIIS, S. et al. Effects of energy intake on performance, mobilization and retention of body tissue, and metabolic parameters in dairy cows with special regard to effects of pre-partum nutrition on lactation- A review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Gwanak-Gu, v.24 n.4, p. 540-572, 2011.
- RIBEIRO, M.E.R. et al. Composição do leite normal e do LINA em rebanho Jersey. Resultados preliminares 2011. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL SOBRE LECHE INSTABLE, 2., 2011. Colônia del Sacramento: **Anais...** Colônia del Sacramento: Universidad de la República Uruguay, 2011. 1 CD-ROM.
- RUSTOMO, B. et al. Acidogenic value of feeds. II. Effects of rumen acid load from feeds on dry matter intake, ruminal pH, fibre degradability and milk production in the lactating dairy cow. **Canadian Journal Animal Science**, Ottawa, v.86, p. 119–126, 2006.
- SHABANI, E.; CERONI, V. Subacute rumen acidosis (SARA) in cows with intensive breeding in different periods of the year. **Anglisticum Journal (IJLLIS)**, Wraszawa, v.2, n.3, p. 209-213, 2013.
- SILANIKOVE, N.; SHAPIRO, F. SHINDER, D. Acute heat stress brings down milk secretion in dairy cows by up-regulating the activity of the milk-borne negative feed back regulatory system. **BMC Physiology**, London v.9, n.13, 2009.
- STELWAGEN, K. et al. Short communication: effects of isolation stress on mammary tight junctions in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.83, p.48-51, 2000.
- STOCKHAN, L. S.; SCOTT, M. A. **Fundamentos de patologia clínica Veterinária**, 2.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Kogan, 2011. 729 p.
- STUMPF, M. T. et al. Severe feed restriction increases permeability of mammary gland cell “tight junctions” and reduces ethanol stability of milk. **Animal**, New York, v.7 n. 7, p. 1137-1142, 2013.
- TOERIEN, C. A.; CANT, J. P. Durations of a severe feed restriction required to reversibly decrease milk production in the high-producing dairy cow. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v.3, n.87, p. 455-458, 2007.
- TRONCO, V.M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 4. ed.. Santa Maria: UFSM, 2010. 195 p.
- VALENTE, T. N. P. et al. Aspects of Acidosis in Ruminants with a Focus on Nutrition: A Review. **Journal of Agricultural Science**, Toronto, v. 9, n. 3, p. 90-97, 2017.

ZEBELI, Q.; AMETAJ, N. Relationships between rumen lipopolysaccharide and mediators of inflammatory response with milk fat production and efficiency in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.92, p. 3800-3809, 2009.

ZEBELI, Q.; METZLER-ZEBELI, B. U; AMETAJ, B.N. Meta-analysis reveals threshold level of rapidly fermentable dietary concentrate that triggers systemic inflammation in cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.95, p. 2662-2672, 2012.

ZEBELI, Q.; METZLER-ZEBELI, B. U. Interplay between rumen digestive disorders and diet-induced inflammation in dairy cattle. **Research in Veterinary Science**, Roma, v.93, p. 1099-1108, 2012.

WHEELLOCK, J. B. et al. Effects of heat stress on energetic metabolism in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, p. 644-655, 2010.

## VITA

Daíse Werncke, filha de Ivo Werncke e Marilda da Silva Werncke, nasceu em Concórdia/SC, no dia 27 de Junho de 1984.

Em 2002 ingressou no curso de graduação em Agronomia pela Universidade do Sul de Santa Catarina/ Unisul. No ano de 2005 foi transferida para o curso de Agronomia de Universidade de Estado de Santa Catarina/ UDESC. Durante o curso, desenvolveu estágio extracurricular nos setores de Fitopatologia, Horticultura, Melhoramento Genético de Plantas de Lavouras, Avicultura, Forragicultura e Bovinocultura de Leite. Concluiu o curso de agronomia em julho de 2009.

Em 2010 ingressou no curso de Mestrado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal pela Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), sendo bolsista FUNDES/SC. Em agosto de 2012 obteve o título de Mestre em Ciência Animal na área de concentração Produção Animal.

Em abril de 2013 ingressou no curso de Doutorado junto ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), na área de concentração Produção Animal, com bolsa pelo CNPQ. Foi submetida à banca examinadora de defesa de tese em março de 2017.

## APÊNDICE

# animal

An International Journal of Animal Bioscience

## Instructions for authors

Last updated September 2016

### Introduction

n

*animal* – an International Journal of Animal Bioscience is a peer-reviewed journal in English, published monthly in both print and online formats (12 issues making a volume). Special issues or supplements may also be produced from time to time upon agreement with the Editorial Board. There are no page charges, except for reproduction of illustrations printed in colour and for the Open Access option that requires payment of an Article Processing charge.

*animal* attracts the best research in animal biology and animal systems from across the spectrum of the agricultural, biomedical, and environmental sciences; it is the central element in a collaboration between the British Society of Animal Science (BSAS), the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and the European Federation for Animal Science (EAAP) and represents the merger in 2006 of three scientific journals: *Animal Science*; *Animal Research*; *Reproduction, Nutrition, Development*.

### Scope

e

*animal* publishes original cutting-edge research, horizon-scanning reviews, and opinion papers on animal-related aspects of the life sciences at the molecular, cellular, organ, whole animal and production system levels. It is essential reading for all animal scientists interested in biochemistry, microbiology, nutrition, physiology, modelling, genetics, behaviour, immunology, epidemiology, economics, sociology, food science and technology, human health, farming systems, and land-use management, environmental impact and climate change.

Papers will be considered in aspects of both strategic and applied science in the areas of Animal Breeding and Genetics, Nutrition, Physiology and Functional Biology of Systems, Behaviour, Health and Welfare, Livestock Farming Systems and Environment, and Product Quality, Human Health and Well-being. Emphasis is placed on **managed and farm animals** and on the integrative nature of biological systems. The use of laboratory animal models for the benefit of farmed livestock is within the scope. Studies using farm animals with the aim of improving human health are also acceptable if they indicate obvious benefits to farmed livestock. Wild animals which are marginally bred in a few countries or which could be bred in the future, and wild animals raised in captivity are not in scope. Papers dealing with the translation of basic and strategic science into whole animal, and livestock system, impacts on productivity, product quality, the environment and humans (health, nutrition and well-being) will be welcome, as are methodology papers. Papers should be of **international relevance**, appeal to an international readership and not limited to national or regional conditions. The full scope of the journal should be consulted on <http://www.animal-journal.eu/scope.htm> before submitting a paper.

## General specifications for different types of article

Submitted manuscripts should not have been published previously, except in a limited form (e.g. short communication to a symposium or as part of MSc or PhD theses) and should not be under consideration for publication by other journals. Book reviews are not accepted.

All co-authors should agree with the content of the manuscript. Authors must have obtained permission to use any copyrighted material in the manuscript prior to submission. The work described in the manuscript must comply with ethical guidelines available on the website [http://www.animal-journal.eu/ethical\\_policy.htm](http://www.animal-journal.eu/ethical_policy.htm) and be reported according to "The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research" detailed in Kilkenny *et al.* (2010)<sup>1</sup> and summarised at [www.nc3rs.org.uk](http://www.nc3rs.org.uk).

*animal* publishes different types of articles:

### **Research articles**

They correspond to a full account of a complete project. The approach can be experimental or theoretical, provided the work has been carried out in a systematic way. Routine studies, descriptive experiments without an experimental design controlled by the author, papers based on repetition of published experiments with other breeds, or in other geographical conditions are discouraged. Articles presenting a detailed description of a new technique are within the scope. Comparison of existing methods is considered, provided similar comparisons have never been published. Research articles, including meta-analyses, should be comprehensive and should include an in-depth discussion. Papers in a numbered series are not accepted unless all are submitted at the same time.

### **Short communications**

Short communications present exceptionally exciting, novel or timely contents. *animal* publishes a limited number of short communications. Their submission will only be accepted based on Editor's judgement, and they will be peer-reviewed in the same way as research papers. Partial data or complete studies with a limited amount of results will not be considered as short communications, and will be handled as research papers.

### **Review articles**

They are invited by the Editorial Board or unsolicited. Review articles have to be contemporary and comprehensive, and add information to published reviews on the same topic; if not the case, they will be rejected immediately by the Editor-in-Chief. Sharp critical analyses of novel data or concepts are encouraged. When relevant, a statistical analysis of data and a meta-analysis approach are recommended (but meta-analyses only are not considered as review articles). Authors of unsolicited review articles are encouraged to question the Editorial Office prior to submission through [questions@animal-journal.eu](mailto:questions@animal-journal.eu) to ask if their paper is within the scope and of interest to the journal.

### **Invited Opinion papers**

They are submitted by invitation of the Management Board of *animal* journal only and are published as open access papers. They are short papers, which aim to inform scientists, industry, the public and policy makers about cutting-edge issues in research or the impact of research. They reflect the opinion of their authors who bear full responsibility of the published paper.

### **Conference/Symposium papers**

The journal will consider for publication the results of original work and critical reviews that are presented at conferences/symposia. Symposium organisers who wish to publish bundles of papers from a symposium/conference in *animal* should first contact the Editor-in-Chief of *animal* journal ([questions@animal-journal.eu](mailto:questions@animal-journal.eu)) for agreement and information on the management of these papers. If the papers do not fit the requested conditions for publication in *animal*, the papers may be referred to

Article type	Maximum length (all text except figures)	Maximum number of tables plus figures	Maximum number of references	Additional information published by Cambridge University Press. Acceptance of such papers will be subject to: * the content being within the scope of the journal * the journal standard peer review process
Original research	7 000 words (equivalent to 9 pages in journal)	8	35	
Short communications	3 000 words	3	10	
Reviews	9 500 words (equivalent to 12 journal pages)	10	50	
Opinion papers	1700 words (equivalent to 2 journal pages) or 1 200 if a figure is submitted	1	5	
All article types			5 references per 1000 words	Supplementary material can be proposed and will be made available online

<sup>1</sup> Kilkenney C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M and Altman DG 2010. Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. PLoS Biology 8, e1000412. doi: 10.1371/journal.pbio.1000412

**Table 1** Specifications for the different types of article

## Recommendations for preparation of papers

**The responsibility for the preparation of a paper in a form suitable for publication lies with the author.** Authors should consult a free issue or a free article of *animal*, available at <https://www.cambridge.org/core/journals/animal>, in order to make themselves broadly familiar with the layout and style of *animal*. A **style sheet** summarising these indications is available on our website at [http://www.animal-journal.eu/documents/Animal\\_style\\_template.doc](http://www.animal-journal.eu/documents/Animal_style_template.doc).

**Before submitting your manuscript, we strongly recommend that you consult the [pre-submission checklist](#).** Manuscripts that do not comply with the directions or that are too long will not be accepted for peer-review. This will ensure that they are judged at peer review exclusively on academic merit. Any deviations from these recommendations will be at the discretion of the Editor-in- Chief.

### English

A good quality of written English is required. Spelling may be in British or American English but must be consistent throughout the paper. Care should be exercised in the use of agricultural terminology that is ill-defined or of local familiarity only. If the English is not good enough, the manuscript will be sent back to the authors. Cambridge University Press recommends that authors have their

manuscripts checked by an English language native speaker before submission. We list a number of third-party services specialising in language editing and / or translation at: <https://www.cambridge.org/core/services/authors/language-services> and suggest that authors contact them as appropriate. Use of any of these services is at the author's own expense. The copy-editor will not perform language editing.

### ***Manuscript layout***

Manuscripts should be prepared using a standard word processing programme, and presented in a clear readable format with easily identified sections and headings. A style sheet is available on our website at [http://www.animal-journal.eu/documents/Animal\\_style\\_template.doc](http://www.animal-journal.eu/documents/Animal_style_template.doc).

### ***Manuscript layout directions***

- Typed with double-line spacing with wide margins (2.5 cm)
- The lines must be continuously numbered; the pages must also be numbered
- Font Arial 12 should be used for the text, and Arial 11 for tables and references
- The sections should typically be assembled in the following order: Title, Authors, Authors' full affiliations including department and post/zip codes, Corresponding author, Short title, Abstract, Keywords, Implications, Introduction, Material and methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, Tables, List of figure captions
- The use of small paragraphs with less than 6 to 8 lines must be avoided
- Footnotes in the main text are to be avoided
- The manuscript complies with the section specific requirements set out below

### ***Full title***

The title needs to be concise and informative. It should:

- (a) arrest the attention of a potential reader scanning a journal or a list of titles;
- (b) provide sufficient information to allow the reader to judge the relevance of a paper to his/her interests;
- (c) incorporate keywords or phrases that can be used in indexing and information retrieval, especially **the animal species** on which the experiment has been carried out;
- (d) avoid inessentials such as 'A detailed study of ...', or 'Contribution to ...';
- (e) not include the name of the country or of the region where the experiment took place;
- (f) not include Latin names if there is a common name, or abbreviations.

### ***Full title directions***

- No more than 170 characters including spaces
- Include "Review:", "Invited review:" or "Animal board invited review:" before the full title if required (see above)
- The title of an invited opinion paper should start with "Opinion paper:"
- The title of a short communication should start with "Short communication:"

### ***Authors and affiliations***

The names and affiliations of the authors should be presented as follows:

Example

J. Smith<sup>1,a</sup>, P.E. Jones<sup>2</sup>, J.M. Garcia<sup>1,3</sup> and P.K. Martin Jr<sup>2</sup> [initials only for first names]

<sup>1</sup>Department of Animal Nutrition, Scottish Agricultural College, West Main Road, Edinburgh EH9 3JG, UK

<sup>2</sup>Animal Science Department, North Carolina State University, Raleigh, NC 27695-7621, USA

<sup>3</sup>Laboratorio de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, C. Miguel Servet, 177, 50013, Zaragoza, Spain

<sup>a</sup>Present address: Dairy Science Laboratory, AgResearch, Private Bag 11008, Palmerston North, New Zealand (for any author of the list whose present address differs from that at which the work was done)

Corresponding author: John Smith. E-mail: [John.Smith@univ.co.uk](mailto:John.Smith@univ.co.uk).

The corresponding author who submits and manages the manuscript during the submission/review process will need to be registered on Editorial Manager. He or she can be different from the

corresponding author indicated in the manuscript who will be the correspondent for the published paper.

***Short title (max 50 characters including spacing)***

Authors should provide a short title (after the corresponding author line) with the same specifications as the full title for use as a running head. If the short title is not appropriate, it could be modified by the Editorial Office, with the author's agreement.

***Abstract (max 400 words, single paragraph)***

The abstract should be complete and understandable without reference to the paper. It is important to attract the attention of potential readers. The context and the rationale of the study are presented succinctly to support the objectives. The experimental methods and main results are summarised but should not be overburdened by numerical values or probability values. The abstract ends with a short and clear conclusion. Citations, references to tables and figures are not acceptable. Abbreviations used in the abstract have to be defined in the abstract

***Keywords***

Keywords are essential in information retrieval and should complement the title with respect to indicating the subject of the paper.

***Keyword directions***

- Five keywords
- Keywords should be short and specific
- If not in the title, the animal species or type is among the keywords
- The use of non-standard abbreviations in the list of keywords is discouraged

***Implications (max 100 words)***

Implications must explain the expected impact that the results may have on practice when they will be applied. Impact may be economic, environmental and/or social. Implications should not be limited to presenting the context and objectives, and should not be an "abstract of the abstract". This is written in simple English suitable for non-specialists or even non science readers. The use of non-standard abbreviations is discouraged.

***Introduction***

The introduction briefly outlines the context of the work, presents the current issues that the authors are addressing and the rationale to support the objectives, and clearly defines the objectives. For hypothesis driven research, the hypothesis under test should be clearly stated. Increasing the knowledge on a subject is not an objective *per se*.

***Material and methods***

Material and methods should be described in sufficient detail so that it is possible for others to repeat the experiment. Reference to previously published work may be used to give methodological details, provided that said publications are readily accessible and in English.

If a proprietary product is used as a source of material in experimental comparisons, this should be described using the appropriate chemical name. If the trade name is helpful to the readers, provide it in parentheses after the first mention. Authors who have worked with proprietary products, including equipment, should ensure that the manufacturers or suppliers of these products have no objections to publication if the products, for the purpose of experimentation, were not used according to the manufacturer's instructions.

***Statistical analysis of results***

The statistical analysis of results should be presented in a separate sub-section of the "Material and methods" section. The statistical design and the models of statistical analysis must be described, as well as each of the statistical methods used. Sufficient statistical details must be given to allow replication of the statistical analysis. The experimental unit should be defined (e.g. individual animal, group of animals). Generally, an analysis of variance is preferred to a simple *t*-test. A statistical guide for authors is available on the website at [http://www.animal-journal.eu/statistical\\_instructions.htm](http://www.animal-journal.eu/statistical_instructions.htm). The publication of Lang and Altman (2013)<sup>2</sup> can also be used as a reference.

### *Statistics directions*

- In the text, the level of significance attained is indicated by the following conventional standard abbreviations (which need not be defined):  $P > 0.05$  for non-significance and  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  and  $P < 0.001$  for significance at these levels. Exact level of statistical significance (e.g.  $P = 0.07$ ) can also be used
- When data are analysed by analysis of variance, a residual error term, such as the pooled standard error, the residual standard deviation (RSD) or the root mean square error (RMSE) is given for each criteria/item/variable/trait in a separate column (or line)
- Treatment means are reported with meaningful decimals. For guidance, the last digit corresponds to 1/10 of standard error

---

<sup>2</sup> Lang T and Altman D 2013. Basic statistical reporting for articles published in clinical medical journals: the SAMPL guidelines. In Science editors' handbook (ed. Smart P, Maisonneuve H and Polderman A), pp. 175-182. European Association of Science Editors, Exeter, UK. This document may be reprinted without charge but must include the original citation

- In tables, statistical significance is indicated in a separate column. The *P* values (e.g.  $P = 0.07$ ) are reported or levels of significance are indicated by \*, \*\* and \*\*\* for  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ , respectively
- In tables, differences between treatments (or comparison of mean values) are indicated using superscript letters with the following conventional standard: a, b for  $P < 0.05$ ; A, B for  $P < 0.01$ ; in most cases, the 0.05 level is sufficient

### **Results**

#### **Discussion**

Separation between Results and Discussion is preferred to highlight the interpretation of results. Presentation of Results and Discussion in a single section is possible but discouraged.

#### **Acknowledgement**

s

In this section, the authors may acknowledge (briefly) their support staff, their funding sources (with research funder and/or grant number), their credits to companies or copyrighted material, etc. All papers with a potential conflict of interest must include a description/explanation under the Acknowledgements heading.

#### **Reference**

s

Citations from international refereed journals or from national refereed journals with at least an English abstract are highly preferred. Citations should be as "international" as possible. Citations from abstracts/conference proceedings, MSc or PhD thesis, technical documents, not English documents which cannot easily be obtained by the reader or which are not peer-reviewed should be minimized. In general, no more than 3 references can be given for the same statement (except for reviews and meta-analyses).

**Citation of references.** In the text, references should be cited by the author(s) surname(s) and the year of publication (e.g. Smith, 2012). References with two authors should be cited with both surnames (e.g. Smith and Wright, 2013). References with three or more authors should be cited with the first author followed by *et al.* (in italics; e.g. Smith *et al.*). Multiple references from the same author(s) should be as follows: Wright *et al.* (1993 and 1994), Wright *et al.* (1993a and 1993b). Names of organisations used as authors (e.g. Agricultural and Food Research Council) should be written out in full in the list of

references and on first mention in the text. Subsequent mentions may be abbreviated (e.g. AFRC). "Personal communication" or "unpublished results" should follow the name of the author in the text where appropriate. The author's initials but not his title should be included, and such citations are not needed in the reference list.

*In-text citation directions*

- References are cited by the name(s) of author(s) and the year of publication
- Use Doe (2014) or (Doe, 2014) for single authors
- Use Doe and Smith (2014) or (Doe and Smith, 2014) for two authors
- Use Doe *et al.* (2014) or (Doe *et al.*, 2014) for three or more authors
- "*et al.*" is in italics
- When multiple references are cited, rank them preferably by chronological order using commas and semicolons: (Doe, 1999; Smith and Doe, 2001; Doe *et al.*, 2014 and 2015)

**List of references.** Literature cited should be listed in alphabetical order by authors' names and references should not be numbered. **It is the author's responsibility to ensure that all references are correct.**

*Journal article directions*

- References from journal articles are formatted as follows:  
Author A, Author B, Author CD and Author E Year. Article title. Full Name of the Journal Volume, first-last page numbers.  
Examples
  - Berry DP, Wall E and Pryce JE 2014. Genetics and genomics of reproductive performance in dairy and beef cattle. *Animal* 8 (suppl. 1), 115–121.
  - Knowles TG, Kestin SC, Haslam SM, Brown SN, Green LE, Butterworth A, Pope SJ, Dirk Pfeiffer D and Nicol CJ 2008. Leg disorders in broiler chickens: prevalence, risk factors and prevention. *PLoS ONE* 3, e1545.
  - Martin C, Morgavi DP and Doreau M 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal* 4, 351-365.
  - Pérez-Enciso M, Rincón JC and Legarra A 2015. Sequence- vs. chip-assisted genomic selection: accurate biological information is advised. *Genetics Selection Evolution* 47, 43. doi:10.1186/s12711-015-0117-5.
  - When the article is online but not yet printed, the right format is:  
Zamaratskaia G and Squires EJ 2008. Biochemical, nutritional and genetic effects on boar taint in entire male pigs. *Animal*, doi:10.1017/S1751731108003674, Published online by Cambridge University Press 17 December 2008.
- No punctuation (i.e. no comma or full stop or semicolon) between the surname and initials of an author, after initials, before publication years, after journal names and before volume numbers
- Include "and" (without comma) before the last author for multiple author references
- All authors' names are provided, do not use "*et al.*" in the reference list
- Publication years are included after the author list without parentheses
- No capitals for article titles except initial capital of the first word and words that ordinarily take capitals
- All journal names are given in full (not in abbreviated form) and the initial letter of all main words is capitalised (except little words such as "and", "of", "in", "the", etc.), e.g. *Journal of Animal Science*
- Issue numbers are not mentioned
- Use "," (not ";") before page numbers
- Page numbers are given in full (e.g. "1488-1496" not "1488-96")

*Book directions*

- References from books or official reports are formatted as follows:  
Author(s)/Editor(s)/Institution Year. Book title, volume number if more than 1, edition if applicable. Publisher's name, City, State (2-letter abbreviation) for US places, Country.

## Example

s

- Association of Official Analytical Chemists (AOAC) 2004. Official methods of analysis, volume 2, 18th edition. AOAC, Arlington, VA, USA.
- Littell RC, Milliken GA, Stroup WW and Wolfinger RD 1996. SAS system for mixed models. Statistical Analysis Systems Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Martin P and Bateson P 2007. Measuring behaviour. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- National Research Council (NRC) 2012. Nutrient requirements of swine, 11th revised edition. National Academy Press, Washington, DC, USA.
- The list of author or editor name(s) and publication years are written as for journal articles (all authors are provided; commas between authors; "and" before the last author where there are two or more authors; full stops after publication years)

## Example

e

- Author A, Author B, Author CD and Author E Year.
- No capitals for book titles except initial capital of the first word and words that ordinarily take capitals
- Detailed publisher information is given and listed as:  
Publisher's name, City, State (2-letter abbreviation) for US places, Country.  
*Please note – if a publisher is based in more than one place, use only the first one. If multiple publishers are listed, it is acceptable to use only the first one.*

## Example

s

- AOCS Press, Champaign, IL, USA.
- Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- FAO, Rome, Italy.

*Book chapter directions*

- References from chapters or parts of books are formatted as follows:  
Author A, Author B, Author CD and Author E Year. Chapter title. In Title of book (ed. A Editor and B Editor), pp. first-last page numbers. Publisher's name, City, State (2-letter abbreviation) for US places, Country.

## Example

e

- Nozière P and Hoch T 2006. Modelling fluxes of volatile fatty acids from rumen to portal blood. In Nutrient digestion and utilization in farm animals (ed. E Kebreab, JDijkstra, A Bannink, WJJ Gerrits and J France), pp. 40–47. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- The list of authors and publication years are written as for journal articles (all authors are provided; commas between authors; "and" before the last author where there are two or more authors; full stops after publication years)

## Example

e

- Author A, Author B, Author CD and Author E Year.
- No capitals for chapter and book titles except initial capital of the first word and words that ordinarily take capitals
- Detailed publisher information are given and listed as:  
Publisher's name, City, State (2-letter abbreviation) for US places, Country.  
*Please note – if a publisher is based in more than one place, use only the first one. If multiple publishers are listed, it is acceptable to use only the first one.*

## Examples

- AOCS Press, Champaign, IL, USA.
- Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Editions Quae, Versailles, France.

*Proceedings/Conference papers directions*

- References from proceedings or conference papers are formatted as follows:

Author A, Author B, Author CD and Author E Year. Paper title. Proceedings of the (or Paper presented at the) XXth Conference title, date of the conference, location of the conference, pp. first-last page numbers or poster/article number.

*Please note – If proceedings are published in a journal, the article should be formatted as for a journal article and if they have been published as chapters in a book, the article should be formatted as for a chapter in a book.*

Examples

- Bispo E, Franco D, Monserrat L, González L, Pérez N and Moreno T 2007. Economic considerations of cull dairy cows fattened for a special market. In Proceedings of the 53rd International Congress of Meat Science and Technology, 5-10 August 2007, Beijing, China, pp. 581–582.
- Martuzzi F, Summer A, Malacarne M and Mariani P 2001. Main protein fractions and fatty acids composition of mare milk: some nutritional remarks with reference to woman and cow milk. Paper presented at the 52nd Annual Meeting of the European Association for Animal Production, 26-29 August 2001, Budapest, Hungary.
- The list of authors and publication years are written as for journal articles (all authors are provided; commas between authors; "and" before the last author where there are two or more authors; full stops after publication years)

Example

- Author A, Author B, Author CD and Author E Year.
- No capitals for paper titles except initial capital of the first word and words that ordinarily take capitals
- Conference dates are provided in the format: DD Month YYYY, e.g. 10 August 2014
- Conference locations are given and listed as:  
City, State (2-letter abbreviation) for US places, Country.

Examples

- Champaign, IL, USA.
- Cambridge, UK.
- Versailles, France.
- Geneva, Switzerland.

#### *Website directions*

- References from websites are formatted as follows:  
Author(s)/Institution Year. Document/Page title. Retrieved on DD Month YYYY (i.e. accessed date) from [http://www.web-page address \(URL\)](http://www.web-page address (URL)).

Examples

- Bryant P 1999. Biodiversity and Conservation. Retrieved on 4 October 1999, from <http://darwin.bio.uci.edu/~sustain/bio65/Titlepage.htm>
- The list of author name(s) and publication years are written as for journal articles (all authors are provided; commas between authors; "and" before the last author where there are two or more authors; full stops after publication years)

Example

- Author A, Author B, Author CD and Author E Year.
- No capitals for document/page titles except initial capital of the first word and words that ordinarily take capitals
- Dates when documents were retrieved are included in the format: DD Month YYYY, e.g. 10 August 2014
- Web-page addresses are provided

#### *Thesis directions*

- References from theses are formatted as follows:  
Author AB Year. Thesis title. Type of thesis, University with English name, location of the University (i.e. City, State (2-letter abbreviation) for US places, Country).

Example

- Vlaeminck B 2006. Milk odd- and branched-chain fatty acids: indicators of rumen digestion for optimisation of dairy cattle feeding. PhD thesis, Ghent University, Ghent, Belgium.
- The author's name and publication year are written as for journal articles (no punctuation between surname and initials; full stops after publication years)

Example

- Author AB Year.
  - No capitals for thesis titles except initial capital of the first word and words that ordinarily take capitals
  - Degree levels are provided, e.g. PhD, MSc, etc.
  - University names and locations are given and listed as:
  - University name, City, State (2-letter abbreviation) for US places, Country.
- Examples:
- Louisiana State University, Baton Rouge, LA, USA.
  - Cambridge University, Cambridge, UK.

### ***Tables***

Tables should be as simple as possible. The same material should not be presented in tabular and graphical form. An indication is given in the text where the table should be inserted. Please refer to the style sheet available at [http://www.animal-journal.eu/documents/Animal\\_style\\_template.doc](http://www.animal-journal.eu/documents/Animal_style_template.doc).

### ***Table directions***

- Each table is on a separate page at the end of the main text (one table per page)
- Tables are typed, preferably in double spacing. Single spacing is possible for long tables
- Tables are numbered consecutively using Arabic numbering. They are referred to as Table 1, Table 2, etc., with capital 'T', no italics
- Each table has its own explanatory caption. The caption is sufficient to permit the table to be understood without reference to the text. The animal species and the experimental treatments or the issue under study are indicated in each caption. The caption does not contain too many details about the protocol or the results
- Tables are created in Word using the table function within the programme (without using tabs). Layout can be portrait or landscape
- Large tables are discouraged in the manuscript but they may be submitted as Supplementary Material
- No vertical lines between columns and no horizontal lines between rows of data
- Generally, variables are in rows and treatments in columns
- Column headings are concise
- Separate columns are included to present the basic statistical results: error terms (preferably residual error terms) and levels of significance
- Row items are organized with main items followed by indented sub-items in order, for instance, to group the criteria which share the same type of measurements or the same unit
- For any (sub-)item, only the first letter of the first word is in capitals
- Units are clearly stated either in the caption (only if a limited number of units are used), or for each (sub-)item. Standard abbreviations for units are used
- Footnotes are referenced using superscript numbers
- All abbreviations used in a table are defined as footnotes (preferred option) or in the caption
- Treatment means are reported with meaningful decimals. For guidance, the last digit corresponds to 1/10 of standard error
- The number of decimals for the indicators of residual variability (RSD, SEM, RMSE etc.) are either identical to that chosen for mean values or have one more decimal. The choice is consistent in all the tables
- See above (Statistics) for the presentation of statistical results in tables

### ***Figures***

Figures should be as simple as possible. The same material should not be presented in tabular and graphical form. An indication is given in the text where the figure should be inserted. Specific guidelines are provided for images (see Image Integrity and Standards).

*Figure directions*

- Figure captions are all listed on the same page at the end of the main text
- All figures are numbered consecutively in the text. They are referred to as Figure 1, Figure 2, etc., the word 'Figure' being spelled out with capital 'F', no italics
- Captions begin as Figure 1, Figure 2, etc. They are sufficiently detailed to allow the figure to be understood without reference to the text ("Figure 1 Effect of fat source and animal breed on carcass composition in pigs" is preferred to "Figure 1 Carcass composition"). The animal species and the experimental treatments or the issue under study are indicated in each caption. Abbreviations used in each figure have to be defined in the caption and kept to a minimum
- Figures are not inserted in the text. Each figure (without caption) is uploaded separately with **one separate file per figure and no embedded captions in these files**
- Figure size should be readable in a width of approximately 175 mm (i.e. the maximum size of printing over two columns). Easy reading of the figure is required
- Ensure that the font size is large enough to be clearly readable at the final print size (should not be less than 8 point, or 2.8 mm, after reduction). We recommend you use the following fonts: Arial, Courier, Symbol, Times, Times New Roman and ensure that they are consistent throughout the figures. In addition, ensure that any fonts used to create or label figures are embedded if the application provides that option
- Symbols and line types should allow different elements to be easily distinguished (generally, solid symbols are used before open symbols, and continuous lines before dotted or dashed lines)
- Figures are usually supplied as black and white
- Colours can be used in figures if they are essential to understanding the figure. Publication charges are made for colour figures. The cost for reproducing figures in colour within the printed issue is £200.00 / \$320.00 per figure
- If figures are to be printed in colour, use CMYK (instead of RGB) colour mode preferably
- The figures should preferably be provided as TIFF or EPS files. Other formats such as MS Word, MS Excel, MS PowerPoint, AI and layered PSD (up to CS3) are permitted, provided that figures have been originally created in these formats and that all the embedded artwork is at a suitable resolution.
- The resolutions for TIFF figures at the estimated publication size must be:
  - for line figures (e.g. graphs) – 1200 dpi (6000 px for 1 column, 8400 px for 2 columns)
  - for figures with different shadings (e.g. bar charts) – 600 dpi (3000 px for 1 column, 4200 px for 2 columns)
  - for half tones (e.g. photographs) – 300 dpi (1500 px for 1 column, 2100 px for 2 columns)
- Images from the internet are unacceptable, as most of them have a resolution of only 72 dpi
- When your drawing/graphics application does not provide suitable 'export' options, please copy/paste or import the graphic into a Word document
- For further information, please refer to the Cambridge Journals Artwork Guide, which can be found online at: <http://journals.cambridge.org/artworkguide>

***Image Integrity and Standards***

Any image produced by an instrument (e.g. scanner, microscopy...) with the objective of being used to derive quantitative results is considered as original data, and manuscripts that report images without any quantitative findings are not acceptable. Digitalisation of an image converts the image into numerical values which can be analysed like any other numerical value. The full information may prove important beyond what the author would like to show. Hence images submitted with a manuscript should be minimally processed; some image processing is acceptable (and may be unavoidable), but the final image must accurately represent the original data and exclude any misinterpretation of the information present in the original image. In case original data are being used just to illustrate a point, this should be accompanied by a very clear statement in the manuscript telling

the reader this and explaining what is being demonstrated. Please refer to the [Office of Research Integrity guidelines](#) on image processing in scientific publication.

#### *Image Integrity and Standards directions*

- Image acquisition: Equipment and conditions of image acquisition and processing must be detailed in the Material and Methods section. This includes the make and model of equipment, the acquisition and the image processing software, and the image treatment if any. If you export files from an acquisition device, make sure to use a format with no loss of information and do not file them into a higher resolution than that of acquisition. Authors have the responsibility to archive original images, with their metadata, in their original format without any compression or compressed without loss of information.
- Preparation of images for a manuscript: For guidance, we refer to the Journal of Cell Biology's instructions to authors ([http://jcb.rupress.org/site/misc/fora.xhtml#image\\_aquisition](http://jcb.rupress.org/site/misc/fora.xhtml#image_aquisition)) which states:
  - 1) No specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced.
  - 2) The grouping of images from different parts of the same gel, or from different gels, fields, or exposures must be made explicit by the arrangement of the figure (i.e., using dividing lines) and in the text of the figure legend.
  - 3) Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if they are applied to every pixel in the image and as long as they do not obscure, eliminate, or misrepresent any information present in the original, including backgrounds. Non-linear adjustments (e.g., changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

For further information, image examples, and more detailed guidance we advise reading [What's in a picture? The temptation of image manipulation](#) (reprinted in the *Journal of Cell Biology* (2004) 166, 11-15).

- If a cropped image is included in the main text of a paper (e.g. a few lanes of a gel), display the full original image, including the appropriate controls, the molecular size ladder and/or the scale as relevant, as a single figure in a Supplementary Material file to facilitate peer-review and for subsequent on line publication.
- The statistical analysis applied to the quantitative data associated with images must clearly define the statistical unit considered (e.g. the animal, the sample...).
- Image screening prior to acceptance: All digital images from manuscripts nearing acceptance for publication will be screened for any evidence of improper manipulation or quality. If the original images cannot be supplied by authors on request, the journal reserves the right to reject the submission or to withdraw the published paper.

#### ***Supplementary material***

Authors can include supplementary material in any type of text (research article, review article, short communication, etc.). Supplementary material will appear only in the electronic version. A link to this on-line supplementary material will be included by the Copy Editor at the proof preparation stage. Supplementary material will be peer-reviewed along with the rest of the manuscript. The main text of the article must stand alone without the supplementary material. Supplementary material should be presented according to the instructions for the main text. **It will not be copy-edited and authors are entirely responsible for the presentation of the supplementary material.** *Supplementary material directions*

- In the main text, supplementary material are referred to as: "Supplementary Table S1", "Supplementary Table S2", etc. for tables; "Supplementary Figure S1", "Supplementary Figure S2", etc. for figures; "Supplementary Material S1", "Supplementary Material S2", etc. for other material.  
For example: "The list of references used for the meta-analysis is given in Supplementary Material S1 and Supplementary Table S1 reports etc."
- Supplementary material is submitted along with the main manuscript in a separate file and identified at uploading as "Supplementary File – for Online Publication Only"

- The title of the article and the list of authors are included at the top of the supplementary material
- No line numbering
- Single spacing
- Unlike the figures included in the main text, each supplementary figure has its own title embedded below the figure

## Typographical conventions

### *Title and headings*

As illustrated and detailed above and in the style sheet (see [http://www.animal-journal.eu/documents/Animal\\_style\\_template.doc](http://www.animal-journal.eu/documents/Animal_style_template.doc)), the *animal* conventions apply to (a) *Title* of the paper, Authors' names and addresses; (b) *Main section headings* such as Abstract, Implications, Introduction, Material and methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References; and (c) *Subheadings* which can be used at two levels only.

### *Title and heading directions*

- Title – use bold, with an initial capital for the first word only and for words that ordinarily take capitals
- Authors' names – use lower case with initials in capitals (e.g. J. Doe)
- Authors' addresses – use italics
- Headings are left aligned with an initial capital for the first word only, and not numbered
- Main section headings – use bold with no full stop at the end; text follows on the next line (e.g. **Abstract**)
- Subheading (level 1) – use italics with no full stop at the end; text follows on the next line (e.g. *Experimental design*)
- Sub-subheading (level 2) – use italics and end with a full stop; text follows on the same line (e.g. *Milk fatty acid composition. The fatty acid...*)

### *Abbreviations*

All non-standard abbreviations are defined at first use separately in the abstract and in the main text, they should be written in **bold capitals at first occurrence**. To facilitate the understanding of the manuscript, the number of abbreviations should be kept to a minimum (not more than 10 non-standard abbreviations is advised). Abbreviations in the short title or in (sub)headings are discouraged.

### *Abbreviation directions*

- Define abbreviations at first appearance in the abstract, and in the main text
- Authors should avoid excessive use of non-standard abbreviations (a maximum around 10 is advised)
- No author-defined abbreviation in the (short) titles, nor in (sub) headings
- Abbreviations used in tables/figures have to be defined either as footnotes or in the caption
- Do not start a sentence with an abbreviation

#### Table 2 Abbreviations that do not require spelling out

Item	Definition
Standard abbreviation	
ACTH	Adrenocorticotropic hormone

ADF	Acid detergent fibre
ADL	Acid detergent lignin
ADP	Adenosine
diphosphate ANOVA	Analysis
of variance ATP	
Adenosine triphosphate	
BLUP	Best linear unbiased prediction
BW	Body weight
CoA	Coenzyme A
CP	Crude protein
DM	Dry matter
DNA	Deoxyribonucleic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FSH	Follicle-stimulating
hormone GLC	Gas-liquid
chromatography GLM	General
Linear Model	
HPLC	High performance (pressure) liquid chromatography
IGF	Insulin-like growth factor
IR	Infrared
LH	Luteinising hormone
MS	Mass
spectrometry n	
Number of samples	
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH <sub>2</sub>	Reduced nicotinamide adenine dinucleotide
phosphate NDF	Neutral detergent fibre
NIRS	Near infrared stectrophotometry
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresisPCR PMSG
Polymerase chain reaction	
Pregnant mare serum gonadotropin	
RNA	Ribonucleic acid
SDS	Sodium dodecyl sulfate
UV	Ultraviolet
Statistical standard abbreviation	
CV	coefficient of
variation df	degrees of
freedom	
EMS	expectation of mean square
F	variance ratio
LSD	least significant difference
MS	mean square
<i>P</i>	probability
use ns	<i>P</i> >0.05, in
tables use *	<i>P</i> <0.05,
in tables	**
<i>P</i> <0.01, in tables	use ***
<i>P</i> <0.001, in tables	
<i>r</i>	simple correlation coefficient
<i>R</i>	multiple correlation
coefficient <i>R</i> <sup>2</sup>	coefficient of
determination rSD	residual
standard deviation RMSE	root mean
square error	
SD	standard deviation
SED	standard error of difference

SEM	standard error of mean
Sy.x	standard error of
estimate $\chi^2$	chi square

---

The names of the chemicals do not need to be written out in full; chemical symbols are sufficient. Fatty acids are abbreviated using the following rules: cis-18:1 for the sum of cis octadecenoic acids. When isomers are described, the double bond positions are identified by numbering from the carboxylic acid end: c9,t11-18:2; iso-15:0. The terms "omega 3" and "omega 6" are discouraged and replaced by "n-3" and "n-6", e.g. 18:3n-3. Trivial names can be used for the most known fatty acids (myristic, palmitic, oleic, linoleic, linolenic) and abbreviations in some cases: CLA for conjugated linoleic acids, EPA for eicosapentaenoic acid, DHA for docosahexaenoic acid. Chemical names and trivial names cannot be mixed in a same table.

### **Capital**

s

#### *Capitals directions*

- Initial capitals are used for proper nouns, for adjectives formed from proper names, for generic names and for names of classes, orders and families
- Names of diseases are not normally capitalised

### **Italic**

s

Use italics for:

#### *Italics*

#### *directions*

- Authors' addresses (see above)
- Subheadings (see above)
- Titles for tables (but not captions for figures)
- Most foreign words, especially Latin words, e.g. *ad hoc*, *ad libitum*, *et al.*, *in situ*, *inter alia*, *inter se*, *in vitro*, *per se*, *post mortem*, *post partum*, *m. biceps femoris* but no italics for c.f., corpus luteum, e.g., etc., i.e., NB, via
- Mathematical unknowns and constants
- Letters used as symbols for genes or alleles e.g. *HbA*, *TfD* (but not chromosomes or phenotypes of blood groups, transferrins or haemoglobins, e.g. HbAA, TfDD)

### **Numeral**

s

#### *Numerals directions*

- In text, use words for numbers zero to nine and figures for higher numbers. In a series of two or more numbers, use figures throughout irrespective of their magnitude
- Sentences do not, however, begin with figures
- For values less than unity, 0 is inserted before the decimal point
- For large numbers in the text substitute  $10^n$  for part of a number (e.g.  $1.6 \cdot 10^6$  for 1 600 000)
- Do not use comma separator for numbers greater than 999 (e.g. 100 864)
- The multiplication sign between numbers should be a cross (x)
- Division of one number by another should be indicated as follows: 136/273.
- Use figures whenever a number is followed by a standard unit of measurement (e.g. 100 g, 6 days, 4th week).

- Use figures for dates, page numbers, class designations, fractions, expressions of time, e.g. 1 January 2007; type 2
- Dates are given with the month written out in full in the text and with the day in figures (i.e. 12 January *not* 12th January).
- For time use 24-h clock, e.g. 0905 h, 1320 h

### **Units of measurement**

The International System of Units (SI) should be used. A list of units is found at <http://physics.nist.gov/cuu/Units/units.html>. Recommendations for conversions and nomenclature appeared in *Proceedings of the Nutrition Society* (1972) 31, 239-247. Some frequently used units which are not in the SI system are accepted: l for litre, ha for hectare, eV for electron-volt, Ci for curie. Day, week, month and year are not abbreviated. The international unit for energy (energy value of feeds, etc.) is Joule (or kJ or MJ).

A product of two units should be represented as N·m and a quotient as N/m (e.g. g/kg and not g.kg<sup>-1</sup>). When there are two quotients, present as follows: g/kg per day (not g/kg/day).

### **Concentration or composition**

Composition is expressed as mass per unit mass or mass per unit volume. The term *content* should not be used for concentration or proportion.

### **Submission of the manuscript**

Manuscript submission is made electronically through *Editorial Manager* directly via <http://www.editorialmanager.com/animal> or at [www.animal-journal.eu](http://www.animal-journal.eu). Any query to the Editorial Office should be addressed through this site. Authors can check the status of their manuscript using *Editorial Manager*. Authors should ensure that the email address of the corresponding author is correct.

#### **You must submit separate files for the following:**

- Manuscript (including full text, tables, figure captions, but excluding figures) in DOC/DOCX or RTF format (PDF is not accepted)
- Each figure (without captions). At submission in *Editorial Manager*, enter a description of each figure (Figure 1, Figure 2a, etc.) in the appropriate box
- Supplementary online-only materials, if relevant

Authors who submit a manuscript have to also provide in the online submission system:

- the type of article (research article, short communication, review article, special issue paper, opinion paper, etc.).
- the section of the scope which is the most appropriate for their manuscript. (<http://www.animal-journal.eu/scope.htm>).
- any comment and information that might be helpful to the editors ("letter to the editor", etc.; in "Author's comments").
- The names of at least 3 potential reviewers, and give contact details. Reviewers should have no conflict of interest with the authors or the submission. Authors should not nominate reviewers who are their regular collaborators or who work in the same institution or university, and they should nominate *an international spread of reviewers*. The editorial board will use its discretion when selecting reviewers and the suggested reviewers may not be used.
- The names of maximum 3 opposed reviewers in case of established conflict of interest.

Any query to the Editorial Office prior to submission of papers (e.g. clarification of instructions to authors, to ask if paper is within the scope, etc.) should be addressed through [questions@animal-journal.eu](mailto:questions@animal-journal.eu).

### **Evaluation of the manuscript**

The Editor-in-Chief or the Section Editor may reject manuscripts which do not comply with the scope or which do not have the required standard, or which present obvious errors or misinterpretation of results, or which do not comply with the recommendations for preparation of articles. The Editor-in-Chief or a member of the Editorial Office may also send back to the authors their manuscript for reformatting in the style of *animal*. During the peer-review process, manuscript revisions should be sent back to the Editorial Office within 60 days; otherwise, the manuscript is withdrawn and the revised version will have to be submitted as a new manuscript. In order to provide the shortest possible delay from submission to acceptance only one revision iteration is expected. Manuscript revisions that do not meet the requirements of the handling Editor will be rejected.

## **Proof**

Authors should not insert new matter into proofs, correct faults in the style, or alter the arrangement of their papers at this stage. However, any errors of fact or of logic that have escaped earlier notice must be corrected at this stage. Substantial changes will be made at the author's expense. Authors are advised to pay particular attention to checking scientific and proper names, numerical data, formulae, tables and illustrations, and list of references. Whilst proof readers are competent in correcting proofs, the ultimate responsibility for the correction remains with the author. Indications on how to correct and return the proofs are supplied with the proof. ***Proofs must be sent back to the Publisher within four working days of receipt.*** If this period is exceeded, the pdf proof will be proofed by the Editorial Office without the author's corrections.

## **Copyright agreement**

Authors are required formally to transfer copyright to the *animal* consortium. Two versions of the transfer of copyright form (Standard and Open Access) for this purpose may be downloaded at: <https://www.cambridge.org/core/journals/animal/information/transfer-copyright>. The Open Access option allows authors in *animal* the option to make their articles freely available to everyone, immediately on publication and after the payment of the Open Access Article Publication Charge (\$2835).

Articles are not further processed until the completed form has been received by the Editorial Office. Signing the form does not put any limitation on the personal freedom of authors to use their own material contained in their article.

The authors must obtain a written permission to reproduce material that is owned by a third party (for example in review papers); they must also include the relevant credit in their paper. The written agreements have to be sent to the Editorial Office at submission of their manuscript.

## **Publication of the manuscript**

A free PDF file will be emailed to the corresponding author. To facilitate earlier dissemination, articles are published online in *FirstView* with their doi number at <https://www.cambridge.org/core/journals/animal> ahead of being published as part of an issue. It should be stressed that ***no change in the paper, even quite minor, is possible once the paper is in the FirstView list.***