



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LUIS GABRIEL CUCUNUBO SANTOS

**PERFIL METABÓLICO EM VACAS MISTIÇAS (HOLANDÊS  
× GIR) DE ALTA PRODUÇÃO:  
EFEITOS DE CONDIÇÃO CORPORAL, GRAU DE SANGUE,  
PRODUÇÃO DE LEITE, CLAUDICAÇÕES E LESÕES DO  
CASCO**

LUIS GABRIEL CUCUNUBO SANTOS

**PERFIL METABÓLICO EM VACAS MISTIÇAS (HOLANDÊS  
× GIR) DE ALTA PRODUÇÃO:  
EFEITOS DE CONDIÇÃO CORPORAL, GRAU DE SANGUE,  
PRODUÇÃO DE LEITE, CLAUDICAÇÕES E LESÕES DO  
CASCO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Dr. Júlio Augusto Naylor Lisbôa.

Londrina  
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

C963 Cucunubo Santos, Luis Gabriel .  
Perfil metabólico em vacas mestiças (Holandês × Gir) de alta produção: :  
efeitos de condição corporal, grau de sangue, produção de leite, claudicações  
e lesões do casco / Luis Gabriel Cucunubo Santos. - Londrina, 2020.  
105 f.

Orientador: Julio Augusto Naylor Lisboa.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina,  
Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal,  
2020.

Inclui bibliografia.

1. Período seco. - Tese. 2. Vaca Mestiça. - Tese. 3. Claudicação. - Tese. 4.  
Balanço energético. - Tese. I. Naylor Lisboa, Julio Augusto . II. Universidade  
Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação  
em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619

LUIS GABRIEL CUCUNUBO SANTOS

**PERFIL METABÓLICO EM VACAS MISTIÇAS (HOLANDÊS  
× GIR) DE ALTA PRODUÇÃO:  
EFEITOS DE CONDIÇÃO CORPORAL, GRAU DE SANGUE,  
PRODUÇÃO DE LEITE, CLAUDICAÇÕES E LESÕES DO  
CASCO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal a Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Dr. Julio Augusto Naylor Lisboa  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Elias Jorge Facury Filho  
Universidade Federal de Minas Gerais –  
UFMG

---

Prof. Dr. Joandes Henrique Fontequê  
Universidade do Estado de Santa Catarina –  
UDESC

---

Prof. Dr. Rudiger Daniel Ollhoff  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná -  
PUCPR

---

Prof. Dr. Pierre Castro Soares  
Universidade Federal Rural de Pernambuco -  
UFRPE

Londrina, 22 de outubro de 2020.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, meus pais, Esther e Pedro, que com seu exemplo de melhoria, me educou para sempre tentar ser uma pessoa melhor. Meus irmãos Pedro, Diana, Felipe e Javier, e minha sobrinha Camila, por seu apoio e paciência incondicionais. À minha avó Antonia, por sua paciência e alegria, meus avós Lucas, Isabel e Eduardo que sempre cuidam de nós do céu, por seu grande exemplo e humildade.

Ao professor Júlio Augusto Naylor Lisbôa, que me aceitou em seu grupo de trabalho, me orientou na preparação do projeto e acreditou em mim durante esses anos de estudo, por sua paciência e por compartilhar seus conhecimentos.

Aos meus amigos de Londrina, por estarem presentes nesses anos, principalmente Caroline Ambiel (porque em Timburi), José Bessegatto (Sudoeste Selvagem) e Fabricio Cerri (um lacanguense de outra cidade), a quem considero parte de minha família. Obrigado por compartilhar muitos momentos de riso, muitas cervejas e jantares. Eles foram parte do meu crescimento pessoal e profissional durante a minha vida no Brasil. Amizade é algo que apesar da distância sempre dura.

A Maíra por seu companheirismo, por ser uma boa pessoa e excelente profissional, e por sua tolerância ao me ensinar português. A Gabriela que sempre me escuta quando eu preciso desabafar. Bruna por seus conselhos e palavras de incentivo. Aos residentes da Clínica de Grandes Animais pelos cafés e conversas. Ao José Carlos e Kelly pelo trabalho em conjunto.

Aos funcionários da fazenda Queima Ferro, por sua ajuda e amizade. Sem vocês essa conquista não seria possível.

Para a equipe do Rehagro, especialmente Guilherme Correa e José Zambrano, que estavam sempre dispostos a ajudar.

À equipe do laboratório de patologia clínica do HV-UDEL, Professora Karina, os residentes Matheus e Laís e os funcionários José e Inês, por sua colaboração e ajuda no processamento de amostras.

Ao Professor Elias Facury por suas contribuições e por encontrar a

fazenda ideal para desenvolver o projeto.

Ao programa de bolsas de estudos PAEC OEA-GCUB Brasil, por me permitir ser um beneficiário do programa.

Ao CNPq-INCT leite (465725/2014-7) e a PROEX/CAPES (1959/2015) por apoiar e financiar o projeto.

Aos meus professores de graduação, mestrado e doutorado, que por seu exemplo me fizeram perceber a importância de estudar tentando ser um profissional cada vez melhor.

*Tive na vida a oportunidade de ter ótimos professores e ótimos colegas de trabalho com quem aprendi muito; porém, as pessoas que aprendi mais, foram meus alunos, eles se tornaram meus grandes professores.*

CUCUNUBO SANTOS, Luis Gabriel. **Perfil metabólico em vacas mestiças (Holandês x Gir) de alta produção:** efeitos de condição corporal, grau de sangue, produção de leite, claudicações e lesões do casco. 2020. 105 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

## RESUMO

No período de transição, as vacas apresentam uma alta demanda nutricional, o que pode causar desequilíbrios metabólicos e aumentar a apresentação de doenças no início da lactação. Vários fatores, como o escore de condição corporal (ECC), o volume de produção de leite, apresentação de claudicações e lesões no casco podem ter relação com o perfil metabólico. O objetivo do estudo foi determinar o efeito das mudanças do ECC no período seco, produção de leite, grau de sangue e a apresentação de claudicações sobre o perfil metabólico, ocorrência de desequilíbrios metabólicos e doenças em vacas mestiças Holandês x Gir de alta produção. 80 vacas foram selecionadas no início do período seco, no primeiro estudo foram agrupadas de acordo com a mudança do ECC entre a secagem e o parto: LLG (grupo baixo-baixo), LNG (grupo baixo-normal), NNG (grupo normal-normal), NHG (grupo normal-alto), reagrupadas por grau de sangue em 1/2, 3/4 e 7/8 (Holandês x Gir) e por produção de leite nos primeiros 60 dias pós-parto sendo grupo de excelente (>30 L) e ótima produção (20 a 30 L). Amostras de sangue foram coletadas nos dias -42, -21, -7, 0, 7, 21, 42 para a determinação de ácidos graxos não esterificados (AGNE), BHB, glicose, colesterol, AST, albumina, proteínas totais, BUN, cálcio total, magnésio e fósforo. No segundo estudo, foram agrupadas em vacas com e sem claudicação no período pré-parto e pós-parto, e vacas com ou sem úlcera de sola no dia 60, além de amostras de sangue foi coletado líquido ruminal nos dias 7 e 42 para mensuração do pH. Foram avaliadas as lesões no casco nos dias -60, 7 e 60, e escore de locomoção em todos os momentos de colheita. ANOVA de medidas repetidas bifatoriais e teste de associação foram empregados para as comparações. No primeiro estudo a mudança ao longo do tempo foi o principal efeito para todas as variáveis estudadas e as diferenças entre grupos e interações foram pouco frequentes, assim como a apresentação de doenças entre os grupos. O ECC aumentou antes do parto em vacas NHG, LNG e as agrupadas de acordo com o cruzamento e a produção de leite. No período pós-parto, a ECC diminuiu em todos os grupos. A hipocalcemia subclínica (HCS) ao parto (53,7%) foi o principal desequilíbrio metabólico, enquanto a ocorrência de cetose subclínica foi baixa (8,7%). Altas concentrações de AGNE pré-parto não foram relacionadas à apresentação de doenças no início da lactação. No segundo estudo as lesões do casco e as claudicações aumentaram entre o período pré-parto e pós-parto. Perda excessiva de ECC pós-parto e HCS foram associados à claudicação no dia 60. O perfil metabólico não diferiu, em geral, entre vacas com e sem claudicação, exceto colesterol, albumina, BUN e magnésio que foram maiores nas vacas sem claudicação. Vacas mestiças Holandês x Gir de alta produção mantem bom equilíbrio metabólico no período de transição e início da lactação e fatores como ECC, grau de sangue, produção de leite e apresentação de claudicações ou lesões no casco influenciam pouco o metabolismo energético, proteico e mineral.

**Palavras-chave:** período seco; vaca mestiça; claudicação; balanço energético.

CUCUNUBO SANTOS, Luis Gabriel. **Metabolic profile in high-yielding Holstein × Gir cows:** effects of body condition, genetic groups, milk production, lameness and hoof injuries. 2020. 105 p. Thesis (Doctorate degree in Health Animal) – Universidade Estadual de Londrina, 2020.

## ABSTRACT

In the transition period, cows have a high nutritional demand, which can cause metabolic imbalances and increase the presentation of diseases in the early lactation. Several factors, such as body condition score (BCS), milk yield volume, lameness presentation, and hoof injuries may be related to metabolic profile. The objective of the study is to determine the effect of BCS changes in the dry period, milk yield, genetic groups of crosses and the presentation of lameness on the metabolic profile, the occurrence of metabolic imbalances and diseases in high-production Holstein × Gir cows. 80 cows were selected at the beginning of the dry period, in the first study the cows were grouped according to the change in the BCS between drying and calving: LLG (low-low group), LNG (low-normal group), NNG (normal-normal group), NHG (normal-high group), regrouped by crosses 1/2, 3/4 and 7/8 (Holstein × Gir) and by milk yield in the first 60 days postpartum, being a group excellent (> 30 kg/day) and optimal production (20 to 30 kg/day). Blood samples were collected on days -42, -21, -7, 0, 7, 21, 42 to determine NEFA, BHB, glucose, cholesterol, AST, albumin, total protein, urea, total calcium, magnesium, and phosphorus. In the second study, cows were grouped into cows with and without lameness in the prepartum and postpartum periods, and cows with sole ulcers on day 60, in addition to blood samples, ruminal fluid was obtained on days 7 and 42 to measure pH, hoof injuries were evaluated on days -60, 7 and 60 and the locomotion score at all times. Two-way of repeated measures ANOVA and association tests were used for comparisons. In the first study, the change over time was the main effect for all studied variables, and differences between groups and interactions were infrequent, and disease presentation was indifferent between groups. BCS increased before calving in NHG, LNG, and cows grouped according to crosses and milk yield. In the postpartum period, BCS decreased in all groups. Subclinical hypocalcemia (SCH) at calving (53.7%) was the main metabolic imbalance, while the occurrence of subclinical ketosis was low (8.7%). High concentrations of NEFA prepartum were not related to the onset of the disease in the early lactation. In the second study, hoof injuries and lameness increased between the prepartum and postpartum periods. Excessive postpartum BCS loss and SCH were associated with lameness on day 60. The metabolic profile did not differ, in general, among lame and non-lame cows but cholesterol, albumin, BUN and magnesium concentrations were higher in non-lame cows. High-yielding Holstein × Gir cows maintain a good metabolic balance in the transition and early lactation periods and factors such as BCS, genetic group, milk production and presentation of lameness or hoof injuries have little influence on energy, protein and mineral metabolism.

**Key-words:** dry period; crossbred cows; lameness; energy balance.

CUCUNUBO SANTOS, Luis Gabriel. **Perfil metabólico en vacas Holstein x Gir de alta producción:** efectos de la condición corporal, grado de sangre, producción de leche cojeras y lesiones de pezuña. 2020. 105 p. Tesis (Doctorado en ciencia animal) – Universidad Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

## RESUMEN

En el período de transición, las vacas tienen una alta demanda nutricional, lo que puede causar desequilibrios metabólicos y aumentar la presentación de enfermedades al inicio de la lactancia. Varios factores, como el score de condición corporal (ECC), el volumen de producción de leche, la presentación de cojera y las lesiones en la pezuña pueden estar relacionados con el perfil metabólico. El objetivo del estudio es determinar el efecto de los cambios de ECC en el periodo seco, la producción de leche, el grado de sangre y la presentación de cojera en el perfil metabólico, la aparición de desequilibrios metabólicos y enfermedades en vacas Holstein x Gir de alta producción. Se seleccionaron 80 vacas al comienzo del período seco, en el primer estudio se agruparon de acuerdo con el cambio en el ECC entre el secado y el parto: LLG (grupo bajo-bajo), LNG (grupo bajo-normal), NNG (grupo normal -normal), NHG (grupo normal-alto), reagrupados por grado sanguíneo 1/2, 3/4 y 7/8 y por producción de leche en los primeros 60 días posparto, siendo un grupo de excelente (> 30 kg/día) y óptima producción (20 a 30 kg/día). Muestras de sangre fueron colectadas los días -42, -21, -7, 0, 7, 21, 42 para determinar AGNE, BHB, glucosa, colesterol, AST, albúmina, proteínas totales, BUN, calcio total, magnesio y fósforo. En el segundo estudio, las vacas se agruparon en vacas con y sin cojera en el período preparto y posparto, y vacas con úlceras de suela en el día 60, además de muestras de sangre se obtuvo líquido ruminal en los días 7 y 42 para medir el pH, las lesiones de pezuña se evaluaron los días -60, 7 y 60 y el score de locomoción en todos los momentos. ANOVA bifactorial de medidas repetidas y pruebas de asociación se utilizaron para las comparaciones. En el primer estudio, las variaciones en el tiempo fue el efecto principal para todos los metabolitos estudiados y las diferencias entre grupos e interacciones fueron poco frecuentes, así como la presentación de enfermedades fue indiferente entre los grupos. El ECC aumentó antes del parto en NHG, NLG y vacas agrupadas de acuerdo con grado de sangre y producción de leche. En el período posparto, ECC disminuyó en todos los grupos. La hipocalcemia subclínica en el momento del parto (53,7%) fue el principal desequilibrio metabólico, mientras que la ocurrencia de cetosis subclínica fue baja (8,7%). Las altas concentraciones de AGNE previas al parto no se relacionaron con el inicio de la enfermedad al comienzo de la lactancia. En el segundo estudio, las lesiones de pezuñas y la cojera aumentaron entre los períodos preparto y posparto. La pérdida excesiva de ECC posparto y la hipocalcemia subclínica se asociaron con cojera en el día 60. El perfil metabólico no difirió, en general, entre vacas con y sin cojera, excepto colesterol, albúmina, BUN y magnesio, que fueron más altas en vacas que sin cojera. Las vacas Holstein x Gir de alta producción mantienen un buen equilibrio metabólico en los períodos de transición y de lactancia temprana y factores como la ECC, grupo genético, producción de leche y la presentación de cojera o lesiones de pezuña tienen poca influencia sobre el metabolismo energético, proteico y mineral.

**Palabras clave:** periodo seco; vaca mestiza; cojera; balance energético.

## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO A

- Figure 1** – Variation of BCS (mean  $\pm$  sd) during the dry and early lactation periods of high-producing Holstein  $\times$  Gir cows grouped by changes in BCS before calving. ....59

### ARTIGO B

- Figure 1** – Percentage of lameness in high-producing Holstein  $\times$  Gir cows from 60 days pre-calving to 60 days in milk. Locomotion score: 1 = healthy cow; 2 = mild lameness; 3 or 4 = moderate or severe lameness. ....84

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO A

- Table 1** – Diets supplied for high-producing Holstein × Gir cows in the prepartum transition period and in the first 100 days of lactation. ....54
- Table 2** – Global means of body condition score (BCS) and concentrations of metabolites in high-producing Holstein × Gir cows distributed by groups according to changes in body condition score during the dry period. Effect of group (G), effect of days relative to calving (D), and interaction between the two factors. ....60
- Table 3** – Global means of body condition score (BCS) and concentrations of metabolites in high-producing Holstein × Gir cows distributed by groups according to the crosses of Holstein × Gir. Effect of group (G), effect of days relative to calving (D), and interaction between the two factors. ....61
- Table 4** – Global means of body condition score (BCS) and concentrations of metabolites in high-producing Holstein × Gir cows distributed by groups according to the daily milk yield in the first 60 days after calving. Effect of group (G), effect of days relative to calving (D), and interaction between the two factors. ....62
- Table 5** – Occurrence of metabolic imbalances and diseases in high-producing Holstein × Gir cows distributed by groups according to changes in body condition score during the dry period, Holstein × Gir crossings and daily milk yield in the first 60 days.....63

### ARTIGO B

- Table 1** – Ingested diets in the prepartum transition period and in the first 100 days of lactation by high-producing Holstein × Gir cows. ....82
- Table 2** – Associations comparing the presentations of lameness and/or hoof injuries in high-producing Holstein × Gir cows at days -60, 7, and 60 relative to calving.....85

<b>Table 3</b> – Associations between the presentation of lameness at days -60, 7, and 60 relative to calving in high-producing Holstein × Gir cows and the presentation of pre- and postpartum metabolic disorders and of diseases in early lactation.....	87
<b>Table 4</b> – Metabolic profile of high-yielding Holstein × Gir cows grouped by presentation of lameness in the prepartum period and in early lactation. Effect of group (G), effect of days relative to calving (D), and interaction between the two factors. ....	88

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> – Nomenclatura padronizada para as doenças dos dígitos dos bovinos.....	30
<b>Quadro 2</b> – Classificação das lesões do casco dos bovinos de acordo com a intensidade.....	31

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGNE	Ácidos graxos não esterificados
AGV	Ácidos graxos voláteis
Alb	Albumine
AST	Aspartato aminotransferase
BCS	Body condition score
BEN	Balanço energético negativo
BHB	Betahidroxibutirato
BUN	Blood urea nitrogen
Ca	Cálcio total
CEUA	Comitê de Ética no uso de Animais
CPT-I	Carnitin palmitoil transferasa 1
DIM	Dias em lactação (days in milk)
DMI	Dry matter intake
ECC	Escore condição corporal
FDA	Fibra detergente ácida
FDN	Fibra detergente neutra
ICAR	International Committee for Animal Recording
LLG	Grupo de baixa baixa (low-low group)
LNG	Grupo de baixa normal (low normal group)
Mg	Magnésio
NEB	Negative energy balance
NEFA	Ácidos graxos não esterificados
NHG	Grupo normal alta (normal high group)
NNG	Grupo normal normal (normal normal group)
NRC	National Research Council

P	Phosphorus
SCH	Subclinical hypocalcemia
TP	Total protein
VLDL	Very low-density lipoproteins

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
2.1	PERFIL METABÓLICO .....	19
2.1.1	Condição Corporal .....	20
2.1.2	Glicose, AGNE e BHB .....	21
2.1.3	Avaliação Laboratorial Do Fígado .....	24
2.1.4	Proteínas .....	25
2.1.5	Minerais .....	26
2.2	CLAUDICAÇÕES .....	28
2.2.1	Classificação Das Lesões Do Casco .....	29
2.2.2	Prevalência Das Claudicações E Lesões Do Casco .....	31
2.2.3	Condição Corporal E Claudicação .....	33
2.3	CONSIDERAÇÕES SOBRE METABOLISMO EM VACAS HOLANDÊS x GIR .....	34
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	39
<b>3</b>	<b>HIPÓTESES</b> .....	48
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	49
4.1	OBJETIVO GERAL .....	49
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	49
<b>5</b>	<b>ARTIGO A –Effect of changes in body condition during the dry period, milk yield and genetic groups on the metabolic profiles of high-producing Holstein x Gir cows</b> .....	50
<b>6</b>	<b>ARTIGO B. Metabolic imbalances, hoof injuries, and metabolic profile of high-producing Holandês x Gir cows showing lameness</b> .....	78
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	99
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	101
	<b>APÊNDICE</b> .....	102
	APÊNDICE A .....	103
	<b>ANEXOS</b> .....	104
	Anexo-A – Table 1.(Supplement artigo B) .....	105

## 1. INTRODUÇÃO

O período de transição em vacas leiteiras é definido como 21 dias pré-parto até 21 dias pós-parto e é caracterizado por alto requerimento nutricional (DRACKLEY, 1999; MULLIGAN *et al.*, 2006). Devido à seleção genética, a produção individual de leite aumenta a cada dia, gerando maior exigência nutricional e mobilização de nutrientes (HARRISON *et al.*, 1990). A redução do consumo de matéria seca no período de transição é acompanhada por mudanças fisiológicas e grande demanda energética fazendo com que as vacas apresentem balanço energético negativo (BEN), o qual pode aumentar o risco de outros desequilíbrios metabólicos (ALLEN; PIANTONI, 2013; DRACKLEY, 1999).

O escore de condição corporal (ECC) é um indicador das reservas energéticas do animal (FERGUSON; GALLIGAN; THOMSEN, 1994). Perdas no ECC são indicadoras de BEN e têm ligação com a produção de leite, a reprodução e saúde (ROCHE *et al.*, 2013). Vacas com BEN mais acentuado têm risco maior de apresentarem hipocalcemia, cetose, fígado gorduroso, deslocamento de abomaso, retenção de placenta e metrite, o que resulta em diminuição da produção e da eficiência reprodutiva nos rebanhos (RUTHERFORD *et al.*, 2016). A concentração sérica elevada dos ácidos graxos não esterificados (AGNE) no período pré-parto e de Betahidroxibutirato (BHB) no pós-parto tem relação com a perda de condição corporal e a apresentação de doenças infecciosas e metabólicas após o parto (OSPINA *et al.*, 2010; SHEEHY *et al.*, 2017).

A adequação da dieta no período pré-parto diminui a apresentação de BEN no início da lactação. Vacas com ECC ideal (3 a 3,5) que recebem níveis altos de energia no período seco podem ter BEN mais acentuado no início da lactação (MANN *et al.*, 2015). Porém, vacas com ECC baixo que recebem altos níveis de energia no pré-parto têm BEN menos acentuado e risco menor de desenvolverem doenças no pós-parto, assemelhando-se a vacas com ECC ideal que consomem dietas com baixo teor de energia no período seco (LITTLE *et al.*, 2016; ROCHE *et al.*, 2017).

As claudicações são um dos principais problemas dos rebanhos leiteiros e têm impacto significativo no bem-estar e na produção das vacas (HUXLEY, 2013). O ECC está associado com a apresentação de claudicação em vacas leiteiras de produção elevada. Vacas com ECC alto no parto ( $\geq 3,75$ ) apresentam perda de peso maior no início da lactação e são mais predispostas a

apresentarem lesões nos cascos, principalmente úlcera de sola (ALAWNEH *et al.*, 2014). Vacas com ECC baixo (<3) no início da lactação possuem risco maior de apresentação de claudicações, provavelmente devido à baixa quantidade de gordura no coxim digital (LEAN *et al.*, 2013).

No Brasil, a prevalência de doenças no período de transição em rebanhos leiteiros, como cetose (21%), síndrome da vaca caída (6,4%), distocia (13,8%), metrite (11,7%), deslocamento de abomaso (1,4%) e retenção de placenta (14,3%), é parecida com as relatadas em outros países (DAROS *et al.*, 2017). As prevalências de claudicações observadas em vacas leiteiras podem variar, por sua vez, de 16% a 50,2% (COSTA *et al.*, 2018; CRUZ *et al.*, 2001; MOREIRA *et al.*, 2018a). As principais doenças podais encontradas foram dermatite digital, úlcera de sola, pododermatite séptica e erosão do talão (MOREIRA *et al.*, 2018a; SOUZA *et al.*, 2015).

Existem muitos estudos sobre o metabolismo em vacas da raça Holandesa. A maior parte da produção de leite no Brasil é obtida, contudo, com a utilização de animais mestiços zebuínos, podendo-se destacar os cruzamentos entre Holandês x Gir com diferentes graus de cruzamento, conhecidos também como vacas mestiças Girolando. Apesar de sua importância para o país, os estudos sobre o metabolismo das vacas Holandês x Gir não são muito numerosos. A eficiência reprodutiva e a produção de leite podem variar de acordo com o grau de sangue nas vacas cruzadas (FACÓ *et al.*, 2005). As vacas Holandês x Gir também apresentam desequilíbrios metabólicos, os quais podem ser influenciados pela estação do ano e pelo sistema de manejo (MOREIRA *et al.*, 2015a).

Muitos dos estudos sobre o perfil metabólico de vacas Holandês x Gir foram realizados utilizando-se vacas de baixa e moderada produção de leite sem levar em conta o ECC e o grau de sangue. O ECC ao parto em vacas mestiças Holandês x Zebu com produção média diária de 14L não influenciou a produção de leite (FREITAS *et al.*, 2008). O impacto que as variações do ECC ao longo do período seco provocam sobre o metabolismo ainda é incerto e deve ser investigado em vacas de alta produção, as quais possuem naturalmente maior demanda metabólica e propensão maior a desenvolverem desequilíbrios metabólicos no início da lactação.

Mesmo nas vacas Holandês, este assunto ainda não está suficientemente esclarecido, assim como, existem poucos estudos sobre a relação

entre os desequilíbrios metabólicos e a apresentação de claudicação e a ocorrência de lesões nos cascos.

O objetivo do presente estudo foi entender as variações do perfil metabólico de vacas Holandêsx Gir de alta produção no período de transição, verificando a sua relação com a variação do ECC no período seco, com o grau de sangue, com a produção de leite e com a ocorrência de lesões do casco e de claudicação no início da lactação.

## 1 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 PERFIL METABÓLICO

O termo “perfil metabólico” faz referência a análises de parâmetros sanguíneos bioquímicos que são usados para avaliação e prevenção de distúrbios metabólicos e nutricionais em rebanhos leiteiros (PUPPEL; KUCZYNSKA, 2016). O leite é um produto complexo que utiliza muitos nutrientes podendo gerar desequilíbrios no organismo. A entrada e a saída dos nutrientes mantêm a homeostase interna e impedem que excessos e deficiências se estabeleçam e provoquem efeitos adversos no organismo (PAYNE, 1972). O perfil metabólico foi idealizado para revelar desequilíbrios antes que as doenças da produção tenham tempo de desencadear sinais clínicos (PAYNE, 1972).

O perfil metabólico tem três objetivos principais: o primeiro é monitorar o estado de saúde do rebanho, o segundo é auxiliar no diagnóstico de problemas metabólicos e de doenças da produção, e o terceiro é identificar vacas metabolicamente superiores (VAN SAUN, 2006). Para realizar perfis metabólicos nos rebanhos inicialmente, eram coletadas sete amostras de sangue de três grupos: vacas secas, vacas no pico de lactação e vacas em segundo terço da lactação. Na atualidade, são considerados mais grupos, e os resultados de mensurações nas amostras de sangue são usados como triagem de saúde do rebanho e para avaliação do risco de doenças no peri-parto (VAN SAUN, 2006). A ocorrência de muitas das doenças do peri-parto em vacas leiteiras sofre influência considerável da nutrição e do estado metabólico, e está associado à adaptação inadequada do balanço energético (HERDT, 2000b).

Atualmente, as categorias indicadas para coleta de amostras para determinação do perfil metabólico são: “*far off dry*” (vacas secas até os 30 dias antes do parto); “*close-up dry*” (vacas dentro do período de 21 dias antes até parto), sendo ideal para esta última categoria a coleta entre 14 e 3 dias pré-parto; e “*fresh cows*” (vacas com até 30 dias pós-parto), sendo ideal coletar do dia 7 ao dia 21; e vacas em lactação sendo a coleta do sangue realizada de acordo com a necessidade, baseando-se em condições de doença, nível de produção e outros problemas (VAN SAUN, 2006).

Os programas de monitoramento, como as rotinas, ações proativas e

análise dirigida na detecção dos problemas, favorecem a possibilidade de pesquisa e intervenção, limitando as consequências, como a apresentação de doenças, custos de tratamento e a redução do desempenho produtivo e reprodutivo. O monitoramento pode ser direcionado ao rebanho em geral ou a um grupo específico com risco maior, objetivando a detecção precoce das doenças e a mudança nos programas de manejo (LEBLANC, 2010).

Como parte do monitoramento, é importante a determinação de metabólitos para a predição de doenças. Os parâmetros do perfil metabólico refletem a condição nutricional da vaca e confirmam a apresentação ou não de desequilíbrios metabólicos (energético, proteico e mineral) (LEBLANC, 2010; PUPPEL; KUCZYNSKA, 2016; SEIFI *et al.*, 2011).

### 2.1.1 Condição corporal

A condição corporal é um índice que avalia gordura e reflete as reservas corporais, usando escalas nas quais valores baixos correspondem a animais magros e valores altos correspondem a obesos (ROCHE *et al.*, 2013). O peso vivo poderia ser outro indicador de reservas corporais, porém, ele não é um bom indicador por ser influenciado pelo número de partos, tempo em lactação, gestação e raça, não refletindo, portanto, mudanças específicas no tecido adiposo (ROCHE *et al.*, 2013).

O ECC mais frequentemente empregado para a avaliação de bovinos admite valores em uma escala de 1 a 5, com variações da ordem de 0,25 (FERGUSON; GALLIGAN; THOMSEN, 1994). Este índice avalia a proporção de gordura corporal subcutânea, mas não considera a gordura intermuscular e intramuscular (PUPPEL; KUCZYNSKA, 2016; ROCHE *et al.*, 2013). A comparação entre ECC e gordura subcutânea por ultrassonografia tem como resultado alta correlação ( $r=0,96$  a  $0,98$ ), considerando-se a espessura de gordura entre 10 e 35 mm e o ECC entre 2 e 4,5 em vacas multíparas Holandês (HUSSEIN; WESTPHALB; STAUFENBIELB, 2013).

O controle homeostático implica que, se a condição nutricional é adequada, a vaca em lactação pode atender às demandas de energia com o consumo de matéria seca e pouca mobilização de reservas energéticas (ROCHE *et al.*, 2013). Porém, o período de transição é um período dramático em que o consumo de matéria seca diminui (DRACKLEY, 1999) e a vaca gestante não lactante passa a

produzir leite o que eleva a demanda por nutrientes e requer adaptação metabólica complexa envolvendo energia, glicose, aminoácidos e minerais (CONTRERAS *et al.*, 2010; OVERTON; WALDRON, 2004). As vacas são propensas a apresentarem BEN e perda de ECC, aumentando-se o risco de apresentação de doenças no início da lactação (DRACKLEY, 1999).

O ECC varia durante a lactação, sendo que o ECC ideal no momento do parto é de 3,0 a 3,5 (ROCHE *et al.*, 2009). As vacas podem ganhar ou perder ECC durante a lactação, e essas alterações fornecem informações sobre a adequação da ingestão de nutrientes em relação às suas necessidades durante esse período (ROCHE *et al.*, 2013). A perda de ECC no pós-parto está diretamente associada com o volume de leite produzido, tendo reflexos negativos sobre a eficiência reprodutiva e sobre a saúde (ROCHE *et al.*, 2009; 2013). Entre 40 e 100 dias em lactação, as vacas geralmente perdem ECC (ROCHE *et al.*, 2009), e esta perda não deve exceder 0,5 unidade de ECC, evitando-se efeitos prejudiciais no desempenho reprodutivo (BUCKLEY *et al.*, 2003).

O ECC ao parto é uma situação relevante e tanto valores altos quanto baixos podem ser prejudiciais à saúde. Vacas que parem muito gordas têm maior diminuição no consumo da matéria seca durante o periparto e BEN mais acentuado do que vacas com ECC ideal ou baixo (PUPPEL; KUCZYNSKA, 2016). Vacas que parem magras, por outro lado, possuem risco maior de apresentarem retenção de placenta, enquanto que vacas com ECC <2,5 ou >3,5 têm maior possibilidade de apresentar hipocalcemia clínica (ROCHE *et al.*, 2013). Essas doenças podem acentuar o BEN, aumentando a perda de ECC no pós-parto (DRACKLEY, 1999).

O ECC no parto também tem relação com a eficiência reprodutiva, afetando a atividade luteal e a expressão de estro, ou seja, vacas que parem magras expressam estro menos vezes do que as vacas com ECC ideal (BEDERE *et al.*, 2018). Além disso, vacas que perdem ECC no período seco têm risco maior de apresentarem doenças uterinas e indigestões e recebem mais medicamentos, como antibióticos e anti-inflamatórios no pós-parto, enquanto que, vacas que ganham ECC no período seco têm maior produção de leite, percentuais mais elevados de gordura e proteína no leite, e menor contagem de células somáticas no leite (CHEBEL; MENDONÇA; BARUSELLI, 2018).

### 2.1.2 Glicose, AGNE e BHB

A glicose é o principal combustível metabólico do organismo, requerido para a função vital dos órgãos, crescimento fetal e produção de leite (KIROVSKI; SLADOJEVIC, 2017; LEBLANC, 2010). Porém, ela é absorvida em pequenas quantidades no intestino, e nos ruminantes a energia é fornecida principalmente por absorção e metabolização de ácidos graxos voláteis (AGV) (KIROVSKI; SLADOJEVIC, 2017). As vacas de alta produção no início da lactação utilizam maior energia para a produção de leite do que a energia consumida fazendo com que apresentem BEN (ABDELA, 2016). O primeiro mecanismo de adaptação para gerar energia suficiente é a gliconeogênese hepática, e o principal substrato é o propionato, um dos AGV produtos da fermentação ruminal (HERDT, 2000a; OVERTON; WALDRON, 2004).

A mobilização lipídica é outro mecanismo importante de adaptação nos períodos de BEN (DRACKLEY, 1999; OVERTON; WALDRON, 2004). O tecido adiposo representa uma reserva de energia corporal e consiste em células que contêm quantidade elevada de triglicerídeos, conhecidas como adipócitos (HERDT, 2000a). Os triglicerídeos são mobilizados na forma de AGNE para o fígado, músculo e outros tecidos para produção de energia (DRACKLEY, 1999; OVERTON; WALDRON, 2004). Esta mobilização de triglicerídeos é conhecida como lipólise, enquanto a síntese de triglicerídeos para armazenamento nos adipócitos denomina-se lipogênese (HERDT, 2000a). No fígado, os AGNE podem entrar nas mitocôndrias onde sofrem oxidação no ciclo de Krebs para a produção de energia. Quando a mobilização de AGNE é excessiva, duas situações podem ocorrer: a produção de corpos cetônicos (acetoacetato, BHB e acetona) dentro das mitocôndrias, e a reesterificação para a síntese de triglicerídeos fora das mitocôndrias (HERDT, 2000a; PUPPEL; KUCZYNSKA, 2016).

A glicose, no início da lactação, é direcionada para a glândula mamária e para o cérebro, fazendo com que a oxidação dos AGNE e dos corpos cetônicos assumam grande importância para o fornecimento de energia para a vaca. A produção exagerada de corpos cetônicos pode, contudo, levar a vaca a desenvolver cetose (HERDT, 2000a; ROCHE *et al.*, 2013).

Em um trabalho realizado por Rossato *et al.* (2001) foi observado que vacas de primeira e de segunda lactação apresentavam, de maneira geral, concentrações de glicose menores nas primeiras 15 semanas pós-parto do que

vacas com maior número de lactações. A diferença era mais evidente na nona semana, coincidindo com o pico de lactação. Isto poderia indicar que vacas com três ou mais lactações têm capacidade maior de manter a homeostase da glicose. A glicose tem papel importante no metabolismo, porém, devido aos mecanismos homeostáticos responsáveis pela manutenção da glicemia, a sua concentração plasmática não é um bom indicador para o monitoramento e avaliação do equilíbrio energético (LEBLANC, 2010).

Os AGNE e o BHB são metabólitos mais apropriados para indicarem desequilíbrios no metabolismo energético (OSPINA *et al.*, 2013). Os AGNE podem ser elevados como resposta a sinais hormonais, como glucagon, corticosteroides, corticotropina e catecolaminas, enquanto a insulina é um hormônio que diminui suas concentrações (OSPINA *et al.*, 2013). A concentração de insulina no sangue é influenciada primariamente pela glicemia e este hormônio incrementa a utilização de glicose no músculo e diminui a gliconeogênese hepática. Com a instalação do BEN, as concentrações de glicose e dos seus precursores, como o propionato, diminuem e o mesmo acontece com a insulina (HERDT 2000a). A insulina promove a lipogênese e suprime a lipólise. Portanto, a mobilização de AGNE diminui, e, no fígado, a atividade da carnitina palmitoil transferase I (CPT I) se reduz, reduzindo a entrada de AGNE nas mitocôndrias, suprimindo a cetogênese (HERDT, 2000a) e aumentando a síntese de triglicerídeos (DRACKLEY, 1999; HERDT, 2000a; OSPINA *et al.*, 2013).

O aumento de AGNE e a reesterificação de triglicerídeos incrementa o acúmulo destes no fígado, já que, para que os triglicerídeos sejam removidos do fígado é necessária a sua conversão em lipoproteínas de baixa densidade (VLDL) (DRACKLEY, 1999; OSPINA *et al.*, 2013), o que ocorre de forma limitada em ruminantes (PUPPEL; KUCZYNSKA, 2016). O acúmulo de triglicerídeos pode causar a esteatose hepática, ou doença do fígado gorduroso, a qual é considerada um dos distúrbios metabólicos de maior gravidade por ser dificilmente reversível (BOBE; YOUNG; BEITZ, 2004).

Sabe-se que concentrações sanguíneas de AGNE maiores de 0,3 mmol/L no pré-parto estão relacionadas com o aumento do risco de apresentação de deslocamento do abomaso, cetose clínica, metrite e retenção de placenta. Enquanto, no pós-parto, concentrações acima de 0,7 mmol/L também indicam aumento do risco de deslocamento do abomaso (OSPINA *et al.*, 2010).

Quando as concentrações de AGNE aumentam, as de BHB também são incrementadas e vacas de alta produção de leite apresentam concentrações maiores de BHB porque desenvolvem BEN mais acentuado no início da lactação (OVERTON *et al.*, 2017). Vacas com concentrações sanguíneas elevadas de BHB (>1,0 mmol/L) nos primeiros 14 dias após o parto têm risco maior de apresentarem deslocamento do abomaso e cetose clínica (OSPINA *et al.*, 2010). Valores de BHB maiores de 1,2 mmol/L são indicadores de cetose subclínica (MULLIGAN *et al.*, 2006) e geralmente valores maiores de 3,0 mmol/L caracterizam cetose clínica (OETZEL, 2004).

### 2.1.3 Avaliação laboratorial do fígado

No período de transição pós-parto e como consequência do BEN, ocorre certo grau de infiltração gordurosa no fígado que é considerada normal quando é controlada (VAN SAUN, 2006). Estima-se que 50% das vacas de leite apresentem algum grau de infiltração, sendo que as vacas obesas são mais propensas a isso, possivelmente, por terem maior reserva de gordura e apresentarem maior diminuição no consumo de matéria seca (BOBE; YOUNG; BEITZ, 2004; ROCHE *et al.*, 2013). O excesso de acúmulo de triglicerídeos gera diminuição das funções metabólicas no fígado (BOBE; YOUNG; BEITZ, 2004; DRACKLEY, 1999). A infiltração nos hepatócitos prejudica a membrana celular e causa sua destruição, liberando enzimas citoplasmáticas e elevando consideravelmente sua atividade no sangue (ĐOKOVIĆ *et al.*, 2017).

A avaliação da integridade do fígado pode ser feita indiretamente pela determinação sérica das atividades de aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamilttransferase (GGT) e sorbitol desidrogenase (SDH), assim como a concentração de bilirrubinas. A elevação das atividades das enzimas indica a presença de lesão no fígado ou colestase. As bilirrubinas permitem avaliar a capacidade de conjugação dos hepatócitos e os problemas no fluxo biliar. Estes resultados devem ser interpretados em conjunto com as concentrações de AGNE e de colesterol (VAN SAU, 2006).

A AST é considerada uma enzima muito sensível em vacas com fígado gorduroso, e a sua atividade é maior nas primeiras semanas pós-parto comparada ao segundo terço de lactação (ĐOKOVIĆ *et al.*, 2017; PUPPEL; KUCZYNSKA, 2016). Vacas com infiltração de triglicerídeos no fígado no início da

lactação têm atividade elevada de AST combinada com concentrações altas de AGNE e de BHB (PUPPEL; KUCZYNSKA, 2016). Porém, um fator de limitação relacionado à interpretação dos resultados desta enzima é o fato de ela não ser específica para danos hepáticos. A sua atividade também aumenta quando existe perda de integridade das células musculares esqueléticas ou cardíacas (PUPPEL; KUCZYNSKA, 2016).

O deslocamento do abomaso e a apresentação de cetose têm forte relação com a incidência de fígado gorduroso, e o BEN acentuado é comum nestas enfermidades (BOBE; YOUNG; BEITZ, 2004; PUPPEL; KUCZYNSKA, 2016). Outros problemas relacionados com o BEN e com o fígado gorduroso no período de transição são hipocalcemia clínica, endometrite e retenção de placenta (PUPPEL; KUCZYNSKA, 2016).

Como já foi mencionado, para diminuir a infiltração de triglicerídeos é preciso que eles sejam transportados para fora do fígado na forma de VLDL. O colesterol total é uma medição indireta de VLDL no sangue, e vacas com concentrações baixas de colesterol total (<75 mg/dL no pré-parto; e <100 mg/dL no pós-parto) têm produção limitada de VLDL (VAN SAUN, 2006).

As concentrações do colesterol no início da lactação estão relacionadas diretamente com o ECC e a reprodução. Vacas com concentrações de colesterol altas, no final da gestação e no início da lactação, retornam à ciclicidade em menor tempo e apresentam menos doenças uterinas após o parto quando comparadas a vacas com concentrações de colesterol baixas (KIM; SUH, 2003). Isso pode ser devido à melhor adaptação metabólica e melhor função hepática.

#### 2.1.4 Proteínas

A mobilização da proteína tecidual como fonte de aminoácidos para metabolismo e gliconeogênese pode ser relativamente pequena durante o período compreendido entre o parto e o pico de lactação, mas é importante nas primeiras duas semanas de lactação.

A avaliação do equilíbrio proteico pode ser feita por parâmetros variados, tais como proteína sérica total, nitrogênio ureico do sangue, creatinina e albumina (PUPPEL; KUCZYNSKA, 2016; VAN SAUN, 2006). As concentrações de proteína, de albumina e de ureia são também indicativas da funcionalidade hepática, e podem decrescer com a infiltração gordurosa (KIROVSKI; SLADOJEVIC, 2017).

Fisiologicamente, as concentrações de proteína total e de albumina podem estar baixas em vacas no pós-parto já que os aminoácidos são usados para a produção de leite (PRODANOVIĆ *et al.*, 2012).

A albumina é sintetizada no citoplasma das células hepáticas e é considerada uma proteína de fase aguda negativa, pois sua concentração diminui durante doenças inflamatórias e infecciosas (PUPPEL; KUCZYNSKA, 2016). A síntese de albumina é menor em vacas com deficiências energéticas (KRAUSE, *et al.*, 2014). Verificou-se que vacas com concentração de albumina baixa no pré-parto possuem risco maior de apresentarem mastite e retenção de placenta no início da lactação (RUPRECHTER *et al.*, 2018).

As concentrações de ureia são influenciadas por vários fatores, como quantidade e degradabilidade de proteínas e de carboidratos na dieta, função hepática e renal (PRODANOVIĆ *et al.*, 2012). As concentrações de ureia dependem da desintoxicação da amônia no fígado (PUPPEL; KUCZYNSKA, 2016), e a ureia é considerada um bom indicador da relação equilibrada entre energia e proteína na dieta (PRODANOVIĆ *et al.*, 2012). Concentrações de ureia baixas podem indicar baixo consumo de matéria seca (SHIN *et al.*, 2015), ou baixo consumo de proteína, enquanto concentrações altas de ureia podem indicar deficiência de energia ou consumo excessivo de proteína bruta.

#### 2.1.5 Minerais

A avaliação dos macroelementos minerais, como cálcio (Ca), magnésio e fósforo tem grande importância especialmente ao redor do parto (VAN SAUN, 2006). A hipocalcemia clínica, também conhecida como paresia puerperal hipocalcêmica ou febre do leite, é uma doença comum em vacas leiteiras, desencadeada por um desequilíbrio do metabolismo do cálcio próximo ao parto. Sua incidência é de aproximadamente 5% (GOFF, 2014). Os valores de referência estabelecidos para o Ca total no sangue são de 8,5 a 10,0 mg/dL (2,12 a 2,5 mmol/L). Considera-se hipocalcemia clínica quando as vacas possuem concentrações baixas e manifestam sinais de paresia ao parto, sendo que os valores mais comuns para gerar a doença são concentrações de Ca total inferiores a 5,5 mg/dL.

Na hipocalcemia subclínica as vacas apresentam concentrações de Ca total entre 1,4 e 2,0 mmol/L (DEGARIS; LEAN, 2009), ou <8,5mg/dL sem

manifestarem sinais clínicos (MARTINEZ *et al.*, 2012). A incidência da hipocalcemia subclínica é maior do que a da hipocalcemia clínica podendo ocorrer em aproximadamente 50% das vacas multíparas (GOFF, 2014).

A hipocalcemia diminui a motilidade do rúmen e do abomaso (GOFF, 2014) o que pode causar deslocamento do abomaso (DEGARIS; LEAN, 2009; REINHARDT *et al.*, 2011). Vacas com hipocalcemia têm consumo menor de matéria seca, o que aumenta a mobilização de gordura e as concentrações sanguíneas de BHB e AGNE (MARTINEZ *et al.*, 2012), incrementando o risco de cetose (RODRÍGUEZ; ARÍS; BACH, 2017).

Outras doenças que se apresentam frequentemente em vacas com hipocalcemia são mastite, retenção de placenta, metrite e endometrite (DEGARIS; LEAN, 2009; REINHARDT *et al.*, 2011). A hipocalcemia reduz a contração muscular o que poderia permitir a entrada dos patógenos na glândula mamaria, e reduz também a resposta imunológica (GOFF, 2014). Porém, esta associação nem sempre foi comprovada (CHAMBERLIN *et al.*, 2013). Essa diferença nos resultados pode ser causada pelo tempo de duração da hipocalcemia. Quando a hipocalcemia subclínica é diagnosticada entre 24 e 48 horas pós-parto existe o risco maior de ocorrer cetose, deslocamento do abomaso, metrite e retenção de placenta (RODRÍGUEZ; ARÍS; BACH, 2017).

O cálcio apresenta um controle homeostático estrito (VAN SAUN, 2006), e quando as concentrações diminuem ocorre aumento da secreção de paratormônio (PTH) (GOFF 2014; MARTÍN-TERESO; MARTENS, 2014). O PTH liga-se aos osteoblastos por meio de receptores de membrana e induz a liberação de citocinas que promoverão a ativação dos osteoclastos, ativando proteínas celulares que iniciam osteólise e liberação do cálcio incrementando as concentrações no sangue. Para que isto aconteça são necessárias concentrações ótimas de magnésio no interior da célula (GOFF, 2014).

O PTH também estimula a produção renal de calcitriol (1,25-dihidroxitamina), a qual é a forma ativa da vitamina D que atua sobre as células intestinais permitindo a absorção de cálcio na forma ativa. O cálcio também pode entrar no organismo por absorção passiva no intestino dependendo da concentração da dieta (GOFF, 2014).

A produção de leite demanda altas quantidades de cálcio. Ao parto a hipocalcemia pode ocorrer por causa de baixa resposta dos receptores ao PTH.

Sabe-se que dietas catiônicas ocasionam alcalose metabólica, o que diminui a resposta ao PTH, e que vacas perdem receptores de calcitriol com a idade (GOFF, 2014; MARTÍN-TERESO; MARTENS, 2014).

O fósforo é um importante macroelemento mineral que tem papel estrutural em tecidos, células e moléculas. A hipofosfatemia intensa (<1,5 mg/dL) e moderada (1,6-4,9 mg/dL) é comumente observada em vacas mantidas em pastagens com baixo teor de fósforo no período pré-parto (GRÜNBERG, 2014). O fósforo tem influência na patogênese da febre do leite, pois concentrações altas de fósforo na dieta pré-parto aumentam o risco de ocorrência da hipocalcemia (DEGARIS; LEAN, 2009), já que o fosfato inibe diretamente enzimas renais impedindo a transformação da vitamina D inativa em calcitriol (GOFF; 2014).

O magnésio não possui mecanismos homeostáticos eficientes, como os responsáveis pela manutenção da calcemia, e depende diretamente do consumo e da eficiência de absorção principalmente no rúmen, sendo que altas concentrações de potássio na dieta interferem de forma negativa (MARTÍN-TERESO; MARTENS, 2014). O magnésio participa nas reações enzimáticas do organismo e sua deficiência pode ocasionar hipocalcemia, já que reduz a secreção do PTH e a sensibilidade ao mesmo (DEGARIS; LEAN, 2009; GOFF 2014). Vacas com concentrações altas de magnésio ao redor do parto apresentam taxa menor de doenças no início da lactação e têm retorno mais rápido à ciclicidade (JEONG *et al* 2018).

## 2.2 CLAUDICAÇÕES

O custo relacionado a casos de claudicação em vacas é estimado em 500 dólares por caso. Além deste custo, outros problemas importantes são o bem-estar das vacas e a diminuição da produção de leite naquela lactação. Quando uma vaca apresenta claudicação ela perde peso por inapetência e por mudanças no comportamento de ingestão de alimentos. A claudicação causa dor reduzindo o número de vezes que a vaca vai se alimentar, a velocidade na ingestão de alimentos e a habilidade em competir com outras vacas por espaço para se alimentar (WHAY; SHEARER, 2017).

A diminuição na produção de leite pode se situar entre 270 e 574 kg após a recuperação da claudicação e as vacas que mais produzem leite têm maior

risco de apresentarem claudicação (HUXLEY, 2013). Uma das causas é a baixa qualidade do casco, que é um tecido de epiderme cornificado e tem função de barreira biológica, protegendo os tecidos, e função mecânica, para sustentação do peso (HOBLET; WEISS, 2001).

A utilização do escore de locomoção (EL) tem várias funções em rebanhos leiteiros, tais como a identificação das vacas que precisam de tratamento, a estimativa da prevalência do problema, e a conscientização do produtor sobre a importância que o problema tem em seu rebanho (TADICH; FLOR; GREEN, 2010).

Para a avaliação do EL utiliza-se uma escala de 1 a 5. O escore 1 significa a locomoção normal. O escore 2 representa vacas com claudicação leve que mantêm a coluna vertebral nivelada em estação e certo grau de cifose quando caminham, mas o andar permanece normal, ou seja, não aparentam claudicação. O escore 3 representa claudicação moderada, sendo que a postura arqueada é notória tanto em estação quanto caminhando, e observa-se encurtamento do passo do(s) membro(s) afetado(s). O escore 4 representa claudicação intensa e vaca mantém cifose em estação ou locomoção e apresenta alteração marcante ao passo, caracterizada por defender o membro afetado durante o seu apoio no solo. O escore 5 representa a claudicação mais acentuada e a vaca demonstra incapacidade ou relutância para suportar o peso sobre algum dos membros, mantendo o membro afetado não apoiado no solo (SPRECHER; HOSTETLER; KANEENE, 1997).

O dano à integridade do epitélio do casco resulta em lesões na sola e na linha branca, caracterizadas por hemorragia e ulceração. Estas lesões podem levar à apresentação de claudicação intensa ou leve (LEACH et al.,1998). A presença de lesões nem sempre tem associação com o EL. Lesões como fissura da linha branca, hemorragia da sola, erosão do talão e dermatite interdigital pouco acentuada não têm correlação com o EL, enquanto lesões como úlcera de sola, sola dupla e dermatite interdigital acentuada possuem correlação moderada com o EL (TADICH; FLOR; GREEN, 2010). A intensidade e o tipo de lesão geram mudanças no EL, mas EL 1 ou 2 nem sempre representam cascos sem lesão.

### 2.2.1 Classificação das lesões do casco

Existe variabilidade na classificação das doenças dos cascos. O International Committee for Animal Recording (ICAR) publicou, no ano de 2015, o

atlas de doenças podais, como resultado do trabalho de vários especialistas do mundo para padronizar e harmonizar a classificação das alterações do casco. No entanto, no Brasil, devido à diversidade do manejo adotado na pecuária de leite existem outras alterações não descritas no atlas, o que fez com que os pesquisadores brasileiros propusessem a nomenclatura apropriada para as demais alterações (BORGES *et al.*, 2017) (Quadro 1).

Existem ainda outras classificações para as lesões do casco. Uma muito utilizada em estudos científicos é a de Greenough e Vermunt (1991), com algumas adaptações de acordo com cada pesquisador, os quais não somente definem as diferentes lesões do casco, mas também apresentam classificação da intensidade das lesões (Quadro 2).

**Quadro 1-** Nomenclatura padronizada para as doenças dos dígitos dos bovinos.

<b>Sigla</b>	<b>Nome</b>	<b>Descrição</b>
UA	Unha assimétrica	Diferença entre largura, comprimento e altura (não corrigível com casqueamento)
PC	Parede dorsal côncava	Concavidade da parede dorsal
SR	Unha em saca-rolha	Torção da unha medial ou lateral, quando a borda dorsal da parede desvia do seu próprio eixo
DD	Dermatite digital	Infeção da pele do dígito com formação de úlcera
DI	Dermatite interdigital	Dermatite no espaço interdigital
SD	Sola dupla	Duas ou mais camadas de sola subjacentes
ET	Erosão do talão	Erosão nos bulbos dos talões que pode ter forma de V
FPA	Fissura da parede axial	Fenda vertical da muralha axial
FHP	Fissura horizontal da parede	Fenda horizontal da parede
FVP	Fissura vertical da parede	Fenda vertical na muralha
HI	Hiperplasia interdigital	Crescimento de tecido fibroso no espaço interdigital
FI	Flegmão interdigital	Edema simétrico e doloroso da porção distal do membro
UT	Unha em tesoura	Unha em cruzamento de pinças
HDS	Hemorragia difusa da sola	Descoloração difusa vermelha clara ou amarelada na sola
HCS	Hemorragia circunscrita da sola	Hemorragia circunscrita com evidente diferença no tecido córneo
ECB	Edema de coroa e/ou bulbo	Edema uni ou bilateral do tecido acima das unhas (coroa do casco)
US	Úlcera de sola	Exposição circunscrita do córion com ou sem necrose
UB	Úlcera de bulbo	Úlcera localizada no bulbo do talão
UP	Úlcera de pinça	Úlcera localizada na pinça
NP	Necrose de pinça	Necrose com possível envolvimento da terceira falange
SF	Sola fina	Tecido córneo desprende com a pressão dos dedos
FLB	Fissura da linha branca	Separação da linha branca que se mantém após o casqueamento
ALB	Abscesso da linha branca	Inflamação necrótica purulenta do córion.
PS	Pododermatite séptica	Processo séptico localizado ou generalizado do corion
PP	Pododermatite do parádígito	Pododermatite do segundo e quinto dedos acessórios
Miíase	Bicheira	Infestação com larvas de mosca varejeira

Adaptado de ICAR (2015) e de BORGES *et al.* (2017).

**Quadro 2-** Classificação das lesões do casco dos bovinos de acordo com a intensidade.

Lesão	Intensidade	Descrição
Úlcera de sola	Leve	Irregularidade da superfície da sola, córion não exposto ou tecido de granulação não observado
	Grave	Penetração da superfície da sola com exposição do tecido do córion e/ou granulação presente
Hemorragia circunscrita da sola	Leve	Presença de coloração rosa claro e/ou amarela difusa em qualquer local na sola
	Moderada	Presença de coloração rosa escura em qualquer local na sola
	Grave	Presença de coloração vermelha ou roxa muito escura em qualquer local na sola
Fissura da linha branca	Leve	Marcas de cor escura na linha branca em qualquer local
	Moderada	Fissura profunda e/ou áreas de necrose na linha branca em qualquer local
	Grave	Fissura muito profunda, com o córion envolvido e/ou exsudato purulento, necrose, tecido de granulação e/ou separação da parede e da sola em qualquer local

Adaptação de Giuliana *et al.* (2017).

### 2.2.2 Prevalência das claudicações e lesões do casco

Existem vários estudos sobre a prevalência de claudicações no mundo, e os resultados são diferentes dependendo da região e do tipo de manejo adotado. Em rebanhos de produção orgânica na Europa, relatou-se a prevalência geral de claudicação de 18%. No entanto, a prevalência foi intensamente variada entre os países: 24%, 25%, 10% e 7% na França, Alemanha, Espanha e Suécia, respectivamente, sendo a prevalência por rebanho de 0 a 79% (SJÖSTRÖM *et al.*, 2018). A prevalência de claudicações em vacas mantidas em sistema *freestall* foi de 21% e em sistema *tiestall* de 15%, no Canadá, sendo que as vacas tiveram 2,66 mais chances de apresentar claudicação quando a cama era úmida comparada à cama seca (JEWELL *et al.*, 2019).

Na Austrália, a prevalência de claudicações de 27% foi relatada em vacas leiteiras mantidas a pasto, sendo que 18,9% apresentavam claudicações acentuadas (RANJBAR *et al.*, 2016). Outro trabalho australiano reportou a prevalência de 3,8% de claudicações em vacas em pastagem (BEGGS *et al.*, 2019), e isto demonstra a grande variabilidade nos resultados dos estudos de levantamento

epidemiológico. Considerando-se a ocorrência específica de lesões no casco, vacas Holandês criadas na Espanha apresentaram as seguintes incidências na primeira lactação: 16,6% de dermatite digital, 9,5% de úlcera de sola e 8,8% de fissura da linha branca. Na segunda lactação, a frequência de dermatite digital foi 13,9%, mas as frequências de úlcera de sola e de fissura da linha branca subiram para 21,4% e 18,7%, respectivamente (CHARFEDDINE; PEREZ, 2017).

Os levantamentos em rebanhos brasileiros não são muito numerosos. No estado do Rio Grande do Sul, a prevalência de claudicação encontrada em vacas leiteiras estabuladas de quatro rebanhos foi de 50,2%. As lesões mais frequentes foram dermatite digital (29,9%), úlcera de sola (18,3%) e dermatite interdigital (17,8%) (CRUZ *et al.*, 2001). No mesmo ano, no estado de Goiás, a lesão mais frequente foi a dermatite digital (24,36%), seguida da dermatite verrucosa (14,53%) e da pododermatite séptica (13,68%) em vacas Holandês, Girolando e Jersey mantidas em regime semiextensivo (SILVA *et al.*, 2001).

No estado de Minas Gerais relatou-se que as lesões mais prevalentes em vacas Holandês x Gir, mantidas em regime de manejo semi-intensivo e intensivo, foram erosão de talão (59,8%), dermatite digital (30,3%), unha em tesoura (24,1%), hemorragia da sola (15,5%) e úlcera de sola (7,1%). A apresentação de lesões múltiplas em cada casco com diferentes combinações entre elas foi algo muito frequente (SOUZA *et al.*, 2007).

Na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará, foram estudados 22 rebanhos com predomínio da raça Indubrasil, cujas vacas eram mantidas em sistema de manejo extensivo. A ocorrência geral de lesões encontrada foi de 22,25%, sendo as mais frequentes a hiperplasia interdigital (80,92%), os cascos com crescimento excessivo (6,42%) e a dermatite interdigital (6,11%) (SILVEIRA *et al.*, 2009).

Em um rebanho de 1600 vacas Holandês estabuladas em Minas Gerais encontraram-se 8,5% de vacas com claudicação, sendo a lesão mais frequente a úlcera de sola (51,47%), seguida de doença da linha branca (25,74%) e sola fina (10,29%) (TOMASELLA *et al.*, 2014). Em um rebanho com 900 vacas Holandês lactantes mantidas em sistema de manejo semiextensivo, no estado de Rio Grande do Sul, acompanhadas por dois anos seguidos, observou-se que 21,6% dos animais apresentaram EL 2, 15,5% deles EL 3, 3,5% deles EL 4, e 2,2% deles EL 5 (BARBOSA *et al.*, 2018).

No estado de Paraná, incluindo-se 50 rebanhos, a claudicação clínica ( $EL \geq 3$ ) foi evidenciada em 42,5% das vacas, sendo a prevalência de 31,9% nas mantidas em sistema de *compost barn* e 43,2% nas mantidas em sistema *freestall* (COSTA et al., 2018).

No estado de Minas Gerais, finalmente, em 48 rebanhos de vacas cruzadas Holandês x zebu (Nelore e Gir) mantidas em sistema semi-intensivo encontraram-se 16% de vacas com claudicação, sendo que 7% apresentavam claudicação intensa. A erosão de talão foi a lesão mais frequente (90%), seguida por fissura da linha branca (50%) e dermatite digital (33%). Dentre os 48 rebanhos examinados 96% tinham dermatite digital, sendo uma doença endêmica (MOREIRA et al., 2018a). Os principais fatores de risco associados com a apresentação de claudicação foram o ECC baixo, o tempo maior de permanência no curral durante o dia e a falta de higiene nas instalações (MOREIRA et al., 2019).

### 2.2.3 Condição corporal e claudicação

A seleção das vacas para a maior produção de leite faz com que estas possuam a cada dia, maior desafio metabólico e períodos de BEN, o que acarreta maior perda peso e de ECC no início da lactação (ALAWNEH et al., 2014). Vacas que no parto possuem  $ECC < 3,0$  têm chance maior de apresentar claudicação no pós-parto, entre a quarta e a décima semanas de lactação ( $OR = 2,9$ ) comparadas com vacas que parem com ECC adequado (HOEDEMAKER; PRANGE; GUNDELACH, 2009).

A produção de leite e as mudanças do peso nos primeiros 50 dias de lactação têm relação com a apresentação de claudicações. Vacas que perdem peso e têm produção elevada possuem risco relativo (RR) maior de apresentarem claudicação ( $RR = 4,36$ ), enquanto vacas com produção baixa e que mantêm ou ganham peso no início da lactação têm menor risco de apresentarem claudicação ( $RR = 1,2$ ) (ALAWNEH et al., 2014).

Vacas em lactação com  $ECC < 2$  apresentam mais claudicação do que as vacas que incrementam o ECC ou que mantêm o  $ECC \geq 2,5$  (RANDALL et al., 2015). Barbosa et al. (2018) encontraram correlação negativa entre o ECC e o EL ( $r = -0,57$ ) em vacas leiteiras durante a lactação.

A espessura do tecido mole da sola, que em parte é composta por tecido adiposo, pode diminuir durante os períodos de emagrecimento e está

diretamente relacionada com a apresentação da úlcera da sola e fissura da linha branca (BICALHO; MACHADO; CAIXETA, 2009). Quando a espessura diminui em situação adjacente ao ápice de falange distal o RR de apresentar úlcera da sola é de 4,25. No entanto, quando a diminuição da espessura é verificada tomando-se como ponto de referência a tuberosidade de inserção do tendão flexor digital profundo, o RR é de 3,6 (TOHOLJ *et al.*, 2014). Estas medições são realizadas por meio de ultrassonografia.

Quando ECC diminui também ocorre a diminuição da espessura de gordura do coxim digital, causando maior contusão na região devido à falta de amortecimento, e isto acontece principalmente nas primeiras semanas pós-parto (BICALHO; MACHADO; CAIXETA, 2009). No entanto, em um estudo prospectivo, foi encontrado que a espessura do coxim digital tem correlação positiva com a espessura da gordura corporal e ECC. As mudanças da gordura corporal pós-parto influenciam pouco a espessura do coxim digital, ou seja, redução de 10 mm na espessura de gordura corporal corresponde a redução de 0,13 mm na espessura do coxim digital, sendo que as vacas perdem 11 mm de gordura corporal do parto até a 9<sup>a</sup> ou 17<sup>a</sup> semana pós-parto. A espessura do coxim digital também é influenciada por outros fatores, como genética, fenótipo, parto, estado fisiológico e hormonal e a presença de lesões. As vacas que desenvolveram úlcera ou hemorragia da sola, apresentam espessura do coxim menor, no entanto, vacas com úlcera de sola tinham um coxim digital mais espesso causado pelo processo inflamatório (NEWSOME *et al.*, 2017).

### 2.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE METABOLISMO EM VACAS HOLANDÊS x GIR

A seleção genética aplicada à raça Holandesa, no mundo inteiro, foi focada em aumento da produção de leite, e dos teores de gordura e de proteína no leite. Por outro lado, a seleção genética aliada à intensificação do sistema de produção tem efeito negativo sobre a fertilidade, a sanidade da glândula mamária e a longevidade (DEZETTER *et al.*, 2015). Os cruzamentos com outras raças procuram melhorar os parâmetros sanitários das vacas Holandês e são realizados em muitos países, observando-se a melhora na sanidade da glândula mamária e nos índices de fertilidade. Isto é comprovada nos cruzamentos com as raças Nordic Red,

Jersey ou Normando (CLASEN; FOGH; KARGO, 2019; DEZETTER *et al.*, 2015).

O Brasil tem produção anual de leite de 25 bilhões de litros sendo o quarto produtor mundial, em 2018 foram ordenhadas 16,4 milhões de vacas (Embrapa, 2019; FAO, 2020), em sua maioria cruzamentos de Holandês e zebu. Destaca-se o cruzamento entre as raças Holandesa e Gir, gerando a raça Girolando (CANAZA-CAYO *et al.*, 2014). O Girolando existe desde 1940 com objetivo de produzir bovinos com alta capacidade de produção de leite como o Holandês e alta rusticidade como o Gir (CANAZA-CAYO *et al.*, 2014).

Cruzamentos entre bovinos *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* são feitos devido aos desafios impostos pelo clima tropical na produção de leite (RIBEIRO *et al.*, 2017). O estresse térmico é um dos problemas importantes em vacas de leite, provocando perdas da produção e econômica consideráveis. Além dos impactos na produção, o estresse térmico reduz a fertilidade das fêmeas e diminui a quantidade e a qualidade dos espermatozoides nos machos (PEGORER *et al.*, 2007).

Sabe-se que não há benefícios em elevar a proporção de genes da raça Holandesa em condições ambientais hostis. Porém, em condições de manejo favoráveis existe aumento da produção, e isto foi comprovado quando se comparam vacas mestiças Girolando de graus variados de sangue Holandês (1/4 até 7/8). A média global de produção das vacas era baixa (3.031 L na lactação). Vacas com grau de sangue Holandês maior produziam mais em manejo intensivo, mas isso não ocorreu quando mantidas em manejo extensivo (FACÓ *et al.*, 2002).

O comportamento metabólico é bem estudado em vacas Holandesas de alta produção, mas o mesmo não pode ser dito no caso das vacas Holandês x Gir, sendo incerto que os conhecimentos possam ser simplesmente extrapolados para esta última raça. Alguns estudos brasileiros mais recentes visaram esclarecer aspectos metabólicos em vacas Girolando (5/8 Holandês x Gir) ou mestiças Girolando (cruzamentos Holandês x Gir com variados graus de sangue e diferentes de 5/8).

Freitas *et al.* (2008) não encontraram efeito do ECC na produção de leite em 25 vacas Holandês x Gir, as quais tinham uma média de produção de relativamente baixa na lactação (14 L/dia em 305 dias). As vacas foram classificadas em dois grupos de acordo com o ECC que apresentavam ao parto: baixo ( $\leq 3,25$ ) e alto ( $> 3,25$ ). A perda de ECC nos primeiros 100 dias de lactação foi maior nas

vacas de ECC alto (0,5) em comparação às de ECC baixo (0,11).

Casagrande (2013) avaliou, em 30 vacas Holandês x Gir multíparas, a conformação e dureza dos cascos no período seco e no início da lactação. Tomando-se o comportamento metabólico de vacas Holandês conhecido na literatura como base para a comparação, constatou que as vacas mestiças tiveram menor mobilização de gordura e baixas concentrações de AGNE e de BHB, até 90 dias de lactação. Constatou-se também que o cálcio sérico estava diretamente relacionado com a qualidade do casco. O autor, entretanto, não citou a produção de leite das vacas estudadas, o que certamente influencia a ocorrência de desequilíbrios metabólicos.

O perfil metabólico foi avaliado em 36 vacas Holandês x Gir com ECC baixo ( $2,6 \pm 0,5$ ) ao parto, e média de produção de leite de 20L nos primeiros 90 dias da lactação. As vacas eram mantidas em sistema de manejo de pastagem durante período das chuvas e durante o período da seca, foram alimentadas com silagem de sorgo. Observou-se que as vacas apresentavam hipoproteïnemia, hipoalbuminemia e elevação na atividade da AST no pré-parto. As concentrações de AGNE e de BHB estavam aumentadas ao parto e aos sete dias de lactação, respectivamente. Todas estas alterações foram revertidas aos 30 dias após o parto (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

O perfil mineral foi avaliado em um estudo com 62 vacas Holandês x Gir, mantidas em sistema semi-intensivo, com produção média diária de leite variando de 20 a 23L nos primeiros 30 dias de lactação, comparando-se as variações nas épocas do verão (n=31) e do inverno (n=31). Concentrações menores de cálcio e de magnésio foram observadas no inverno, sendo que 75% das vacas apresentavam hipocalcemia subclínica e 19% exibiam hipomagnesemia no pós-parto (MOREIRA *et al.*, 2015b). Nas mesmas vacas, os parâmetros energéticos também foram avaliados, demonstrando-se que 32,26% delas apresentavam BEN no pré-parto ( $AGNE \geq 0,4$  mmol/L) e 22,6% apresentavam cetose subclínica no pós-parto (MOREIRA *et al.*, 2015a). O ponto de corte utilizado para definição de BEN foi superior ao relatado por Ospina *et al.* (2010), que estabeleceram que 0,3 mmol/L de AGNE antes do parto aumenta o risco de doenças, razão pela qual a apresentação de BEN poderia ser maior do que a reportada por Moreira *et al.* (2015a).

Um estudo epidemiológico foi realizado no município de Uberlândia, MG, incluindo 343 vacas Holandês x Gir, pertencentes a 13 fazendas leiteiras, das

quais três tinham regime de produção semi-intensivo e o restante adotava regime de produção a pasto. A produção média diária por vaca foi de 21 L no regime semi-intensivo e 14 L no pastejo. Observou-se a tendência de as vacas com ECC < 3 ao parto apresentarem mais retenção de placenta do que as vacas com ECC ideal. A frequência de hipocalcemia subclínica foi de 49,9%, sendo maior nas vacas mantidas em manejo semi-intensivo (59%) (KOMATSU, 2017).

Um estudo foi desenvolvido com vacas Holandês × Gir (F1), pertencentes a uma fazenda com 120 vacas e produção de 2.000 L por dia, comparando-se o perfil metabólico no verão (n=15) e no inverno (n=13). As vacas eram mantidas em semi-confinamento, e a média de produção de leite foi 21,8 L no verão e 22 L no inverno. Não foram encontradas diferenças entre as estações para as variações de AST, AGNE e BHB. No pós-parto houve aumento da atividade da AST e das concentrações de colesterol e de BHB. A cetose subclínica foi observada em 40,0 e 53,8% das vacas no verão e inverno, respectivamente (MOREIRA *et al.*, 2018b).

Daibert *et al.* (2018) compararam o perfil metabólico de vacas Holandês × Gir (1/4 até 5/8) que se mantiveram sadias (n=20) ou que apresentaram doenças uterinas após o parto (n=14). As vacas pertenciam ao mesmo rebanho, manejado a pasto no período seco e mantido confinado a partir de 30 dias antes do parto, apresentando média diária de produção do leite de 24,5 L, e ECC ideal (média de  $3,24 \pm 0,29$ ) ao parto. Não foi encontrada associação entre BEN e doença uterina no pós-parto. No entanto, as vacas com doença uterina apresentaram concentrações maiores de NEFA e menores cálcio no dia do parto.

Por fim, o único estudo com vacas Holandês × Gir que comparou animais com diferentes graus de sangue foi realizado por Franzoni *et al.* (2018), mas somente os valores de AGNE e de glicemia foram determinados. As vacas pertenciam à mesma fazenda e eram manejadas a pasto antes do parto e, durante a lactação, eram confinadas de dia e em soltas para pastoreio à noite. Foram distribuídas em três grupos: 1/2 sangue (n=8), 3/4 (n=10) e 7/8 (n=10). Não foram encontradas diferenças para as concentrações de AGNE entre os grupos. A glicemia foi mais elevada nas vacas 1/2 sangue no período pré-parto e não diferiu durante a lactação. O ECC ao parto foi maior nas vacas 1/2 sangue, as quais apresentaram menor produção diária de leite no pico da lactação (21 L) comparadas às vacas 3/4 (31 L) e 7/8 (28 L).

A cada dia a seleção genética faz com que as vacas Holandês x Gir produzam mais leite e isto pode aumentar o risco de apresentação de desequilíbrios metabólicos. Investigar as influências que fatores tais como a variação do ECC no período pré-parto, a produção de leite e o grau de sangue podem exercer sobre o perfil metabólico é importante para entender os desequilíbrios que vacas Holandês x Gir de alta produção de leite podem experimentar no período de transição. Embora já existam algumas informações sobre o comportamento do perfil metabólico em vacas cruzadas Holandês x Gir, não foi encontrado nenhum estudo que tenha avaliado especificamente os efeitos das mudanças do ECC ao longo do período seco e da quantidade de leite produzida. O grau de sangue causa influência sobre o volume de leite produzido (FRANZONI *et al.*, 2018) e, por este motivo, pode, hipoteticamente, interferir com o equilíbrio metabólico de vacas mestiças no início da lactação. O efeito isolado deste fator sobre o comportamento metabólico merece, portanto, ser investigado.

A relação entre o perfil metabólico e a ocorrência de claudicação e de lesões específicas do casco é algo pouco estudado, até mesmo em vacas Holandês. Existe evidência de que o comportamento metabólico da vaca no período de transição pode influenciar a qualidade do casco (CASAGRANDE, 2013), assim como, a apresentação de lesões (SEPULVEDA *et al.*, 2018), e a hipótese que se formula é a de que vacas que se mantenham energeticamente equilibradas estariam menos predispostas a apresentarem lesões no casco e claudicação no início da lactação. Devido à relevância do assunto em termos preventivos, a investigação disto em vacas Holandês x Gir é plenamente justificável.

## REFERÊNCIAS

ABDELA, N. Sub-acute Ruminant Acidosis (SARA) and its consequence in dairy cattle: a review of past and recent research at global prospective. **Achievements in the Life Sciences**, v. 10, n. 2, p. 187-196, 2016.

ALAWNEH, J. I.; STEVENSON, M. A.; WILLIAMSON, N. B.; LOPEZ-VILLALOBOS, N.; OTLEY, T. The effects of live weight loss and milk production on the risk of lameness in a seasonally calving, pasture fed dairy herd in New Zealand. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 113, n. 1, p. 72-79, 2014.

ALLEN, M. S.; PIANTONI, P.; Metabolic control of feed intake implications for metabolic disease of fresh cows. **The Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 29, n. 2, p. 279-297, 2013.

BARBOSA, A.; PIZONI, C.; LUZ, G. B.; CORREA, M. N.; RABASSA, V. R.; DEL PINO, F. A.; MORAES, F. P.; MARTINS, C. F. Relação entre escore de condição corporal e escore de locomoção em vacas leiteiras submetidas a manejo semiextensivo de alimentação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 4, p.1129-1134, 2018.

BEGGS, D. S.; JONGMAN, E. C.; HEMSWORTH, P. E.; FISHER, A. D. Lameness on Australian dairy farms: A comparison of farmer-identified lameness and formal lameness scoring, and the position of lame cows within the milking order. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 2, p. 1522-1529, 2019.

BEDERE, N.; CUTULLIC, E.; DELABY, L.; GARCIA, F. L.; DISENHAUS, C. Meta-analysis of the relationships between reproduction, milk yield and body condition score in dairy cows. **Livestock Science**, v. 210, n. 4, p. 73-78, 2018.

BICALHO, R. C.; MACHADO, V. S.; CAIXETA, L. S. Lameness in dairy cattle: A debilitating disease or a disease of debilitated cattle? A cross-sectional study of lameness prevalence and thickness of the digital cushion. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 7, p. 3175–3184, 2009.

BOBE, G.; YOUNG, J. W.; BEITZ, D. C. Invited review: pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 10, p. 3105–3124, 2004.

BORGES, J. R.; CÂMARA, A. C.; MOSCARDINI, A. R.; RODRIGUES, C. A.; PITOMBO, C. A.; GRAÇA, F. A.; SILVA, L. A.; SILVA, P. C.; CUNHA, P. H.; VIANNA, R. B.; RABELO, R. E.; OLLHOFF, R. D. Doenças dos dígitos dos bovinos: nomenclatura padronizada para o Brasil. **Revista CFMV**, n. 73, p. 45-52, 2017.

BUCKLEY, F.; O'SULLIVAN, K.; MEE, J. F.; EVANS, R. D.; DILLON, P. Relationships among milk yield, body condition, cow weight, and reproduction in spring-calved Holstein-Friesians. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 7, p. 2308–2319, 2003.

CANAZA-CAYO, A. W.; LOPES, P.; BARBOSA DA SILVA, M. V.; ARAÚJO, J. DE ALMEIDA TORRES, R. F.; MARTINS, M.; WAGNER, A. Estrutura populacional da raça Girolando. **Ciência Rural**, v. 44, n. 11, p. 2072-2077, 2014.

CHAMBERLIN, W. G.; MIDDLETON, J. R.; SPAIN, J. N.; JOHNSON, G. C.; ELLERSIECK, M. R.; PITHUA, P. Subclinical hypocalcemia, plasma biochemical parameters, lipid metabolism, postpartum disease, and fertility in postparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 11, p. 1-12, 2013.

CHARFEDDINE, N.; PÉREZ-CABAL, M. A. Effect of claw disorders on milk production, fertility, and longevity and their economic impact in Spanish Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 1, p. 653–665. 2017.

CHEBEL, R. C.; MENDONÇA, L. G.; BARUSELLI, P. S. Association between body condition score change during the dry period and postpartum health and performance. **Journal of Dairy Science**. v. 101, n. 5, p. 4595-4614, 2018.

CLASEN, J. B.; FOGH, A.; KARGO, M. Differences between performance of F1 crossbreds and Holsteins at different production levels. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 1, p. 436–441, 2019.

CASAGRANDE, F. P. **Perfil metabólico e mineral de vacas no período peri-parto: qualidade e conformação dos cascos**. Belo Horizonte, MG. (Doutorado em Ciências), Universidade Federal de Minas Gerais. 2013.

CONTRERAS, G. A.; O'BOYLE, N. J.; HERDT, T. H.; SORDILLO, L. M. Lipomobilization in periparturient dairy cows influences the composition of plasma nonesterified fatty acids and leukocyte phospholipid fatty acids. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 6, p. 2508–2516. 2010.

COSTA, J. H.; BURNETT, T. A.; VON KEYSERLINGK, M. A.; HÖTZEL, M. J. Prevalence of lameness and leg lesions of lactating dairy cows housed in southern Brazil: Effects of housing systems. **Journal of Dairy Science**, v.101, n. 3, p. 2395-2405, 2018.

CRUZ, C.; DRIEMEIER, D.; CERVA, D. C.; CORBELLINI, L. G. Clinical and epidemiological aspects of bovine digital lesions in southern Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 6, p. 654-657, 2001.

DAIBERT, E; BATISTA DE ALVARENGA, P.; REZENDE, A. L.; FAGUNDES, N. S.; KRÜGER, B. C.; DOS SANTOS, R. M.; MUNDIM, A. V.; SAUT, J, P. Metabolites able to predict uterine diseases in crossbred dairy cows during the transition period. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, n. 3, p. 1037-1048, 2018.

DAROS, R. R.; HÖTZEL, M. J.; BRAN, J. A.; LEBLANC, S. J.; VON KEYSERLINGK, M. A. Prevalence and risk factors for transition period diseases in grazing dairy cows in Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 145, n. 15 p. 16-22, 2017.

DEGARIS, P. J.; LEAN, I. J. Milk fever in dairy cows: A review of pathophysiology and control principles. **The Veterinary Journal**, v 176 n. 1, p. 58-69, 2009.

DEZETTER, C.; LECLERC, H.; MATTALIA, S.; BARBAT, A.; BOICHARD, D. DUCROCQ, V. Inbreeding and crossbreeding parameters for production and fertility traits in Holstein, Montbéliarde, and Normande cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 7, p. 4904-4913, 2015.

DRACKLEY, J. K. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 11, p. 2259-2273, 1999.

ĐOKOVIĆ, R.; CINCOVIĆ, M.; KURĆUBIĆ, V.; ILIĆ, Z.; LALOVIĆ, M.; JAŠOVIĆ, B.; PETROVIĆ, M. Serum enzyme activities in blood and milk in the different stage of lactation in holstein dairy cows. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v. 33, n. 2, p. 193-200, 2017.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). **Anuário leite 2019** Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1109959>>. Acessado em 14 de abril 2020.

FACÓ, O.; LÔBO, R. N.; MARTINS FILHO, R. M.; MOURA, A. A. Análise do desempenho produtivo de diversos grupos genéticos Holandês-Gir no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 5, p. 1944-1952, 2002.

FACÓ, O.; BRAGA, R. N.; MARTINS FILHO, R. M.; LIMA, F. A. Idade ao primeiro parto e intervalo de partos de cinco grupos genéticos Holandês x Gir no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 6, p.1920-1926, 2005.

FERGUSON, J. D.; GALLIGAN, D. T.; THOMSEN, N. Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.77, n. 9, p. 2695-2703, 1994.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). **Food Outlook - Biannual Report on Global Food Markets: June 2020. 1. Rome.** <https://doi.org/10.4060/ca9509en>. Acessado em 10 de outubro 2020.

FRANZONI, A. P.; RIBEIRO DA GLORIA, J.; COSTA, A. L.; MARTINS, R. A.; AMARAL, T. F.; ALVES DE AZEVEDO, R.; CAMPOS, E. F.; COELHO, S. G. Metabolic and hormone profiles of Holstein x Gir cows during pre- and postpartum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 53, n. 3, p. 371-377, 2018.

FREITAS, J. E.; ROCHA, V. R.; RENNÓ, F. P.; PARRELA, M. T.; PINTO DE CARVALHO, A.; ALBUQUERQUE, L. Efeito da condição corporal ao parto sobre o desempenho produtivo de vacas mestiças Holandês x Zebu. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n.1, p. 116-121, 2008.

GIULIANA, G. M.; HEATHER, J. T.; HUXLEY, J. N.; NEWSOME, R. F.; KALER, J. Effect of claw horn lesion type and severity at the time of treatment on outcome of lameness in dairy cows. **The Veterinary Journal**, v. 225, n. 5, p. 16–22, 2017.

GOFF, J. P. Calcium and magnesium disorders. **The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v, 30, n. 2, p. 359-382, 2014

GREENOUGH, P. R.; VERMUNT, J. J. Evaluation of subclinical laminitis in a dairy herd and observations on associated nutritional and management factors. **The Veterinary Record**, v. 128, n. 1, p. 11-17, 1991.

GRÜNBERG, W. Treatment of Phosphorus Balance Disorders. **Veterinary Clinics North America: Food Animal Practice**, v. 30, n. 2, p. 383–408, 2014.

HARRISON, R. O.; FORD, S. P.; YOUNG, J. W.; CONLEY, A. J.; FREEMAN, A. E. Increased Milk Production Versus Reproductive and Energy Status of High Producing Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 10, p. 2749-2758, 1990.

HERDT, T. H. Ruminant adaptation to negative energy balance. Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. **Veterinary Clinics North America: Food Animal Practice**, v. 16, n. 2, p. 215- 230, 2000a.

HERDT, T, H. Variability characteristics and test selection in herd-level nutritional and metabolic profile testing. **Veterinary Clinics North America: Food Animal Practice**, v.16, n. 2, p. 387–403, 2000b.

HOBLET, K. H.; WEISS, W. Metabolic hoof horn disease claw horn disruption. **The Veterinary Clinics of North America: food animal practice**, v. 17, n. 1, p. 111-127, 2001.

HOEDEMAEKER M.; PRANGE, D.; GUNDELACH, Y. Body condition change ante- and postpartum, health and reproductive performance in German Holstein cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. 2, p. 167–173, 2009.

HUXLEY, J. N. Impact of lameness and claw lesions in cows on health and production. **Livestock Science**, v. 156, n. 9, p. 64–70. 2013.

HUSSEIN, H. A.; WESTPHAL, A.; STAUFENBIEL, R. Relationship between body condition score and ultrasound measurement of backfat thickness in multiparous Holstein dairy cows at different production phases. **Australian Veterinary Journal**, v. 9, n. 5, p. 185-189, 2013.

ICAR. Atlas de Saúde Podal. **ICAR Technical Series**. Roma, Itália. 2015.

JEONG, J. K.; CHOI, I. S.; MOON, S. H.; KANG, H. G.; KIM I. H. Relationship between serum magnesium concentration during the transition period, peri- and postpartum disorders, and reproductive performance in dairy cows. **Livestock Science**, v. 213, n. 5, p. 1–6, 2018.

JEWELL, M. T.; CAMERON, M.; SPEARS, J.; MCKENNA, S. L.; COCKRAM, M. S.; SANCHEZ, J.; KEEFE, G. P. Prevalence of lameness and associated risk factors on dairy farms in the Maritime Provinces of Canada. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 4, p. 3392-3405, 2019.

KOMATSU, R. S. **Caracterização do perfil metabólico e epidemiológico de**

**vacas leiteiras mestiças no pós-parto.** Uberlândia, MG (Doutorado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal de Uberlândia. 2017.

KIM, I. H.; SUH, G. H. Effect of the amount of body condition loss from the dry to near calving periods on the subsequent body condition change, occurrence of postpartum diseases, metabolic parameters and reproductive performance in Holstein dairy cows. **Theriogenology**, v. 60, n. 8, p. 1445-1456, 2003.

KIROVSKI, D.; SLADOJEVIC, Z. Prediction and diagnosis of fatty liver in dairy cows. **Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 3, n. 1, p. 1005. 1-7, 2017.

KRAUSE, A. R.; PFEIFER, L. F.; MONTAGNER, P.; WESCHENFELDER, M. M.; SCHWEGLER, E.; LIMA, M. E.; XAVIER, E. G.; BRAUNER, C. C.; SCHMITT, E.; DELPINO, F. A.; MARTINS, C. F.; CORRÊA, M. N.; SCHNEIDER, A. Associations between resumption of post-partum ovarian activity, uterine health and concentrations of metabolites and acute phase proteins during the transition period in Holstein cows. **Animal Reproduction Science**. v.145, n. 1, p. 8–14. 2014.

LEACH, K. A.; LOGUE, D. N.; RANDALL, J. M.; KEMPSON, S. A. Claw lesions in dairy cattle: methods for assessment of sole and white line lesions. **The veterinary journal**, v.155, n. 1, p. 91-112, 1998.

LEAN I. J.; WESTWOOD, C. T.; GOLDBERGER, H. M.; VERMUNT, J. J. Impact of nutrition on lameness and claw health in cattle. **Livestock Science**, v.156, n. 1. p. 71-87, 2013.

LEBLANC, S. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. **Journal of reproduction and development**, v. 56. n. 1, p. 29-35, 2010. Supplement.

LITTLE, M. W.; O'CONNELL, N. E.; WELSH, M. D.; BARLEY, J.; MEADE, K. G.; FERRIS, P. C. Prepartum concentrate supplementation of a diet based on medium quality grass silage: Effects on performance, health, fertility, metabolic function, and immune function of low body condition score cows. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n.9, p. 7102-7122, 2016.

MANN, M.; LEAL YEPES, F. A.; OVERTON, T. R.; WAKSHLAG, J. J.; LOCK, A. L.; RYAN, C. M.; NYDAM, D. V. Dry period plane of energy: effects on feed intake, energy balance, milk production, and composition in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 5, p. 3366-3382, 2015.

MARTÍN-TERESO, J.; MARTENS, H. Calcium and magnesium physiology and nutrition in relation to the prevention of milk fever and tetany (dietary management of macrominerals in preventing disease) **The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 30, n. 2, p. 643–670, 2014.

MARTINEZ, N., C. A.; RISCO, F. S.; LIMA, R. S.; BISINOTTO, L. F.; GRECO, E. S.; RIBEIRO, F.; MAUNSELL, K.; GALVAO, J. E.; SANTOS, J. E.; Evaluation of periparturient calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n.12,

p. 7158–7172, 2012.

MOREIRA, T. F.; FACURY, E. J.; MENESES, R. M.; MENDONÇA, F. L.; LIMA, J. A.; CARVALHO, A. U. Energetic status of crossbreed dairy cows during transition period in two different seasons. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 5, p.1327-1334, 2015a.

MOREIRA, T. F.; ZAMBRANO, J. U.; DE PAULA, V. M.; CASAGRANDE, P. F.; FACURY, E. J.; MOLINA, L. R.; LEME, F. O.; CARVALHO, A. U. Perfil mineral de vacas mestiças Girolanda no período de transição em sistema semi-intensivo em duas estações do ano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 3, p. 249-257, 2015b.

MOREIRA, T. F.; NICOLINO, R. R.; DE ANDREDE, L. S.; FACURY FILHO, E, J.; DE CARVALHO, A. U. Prevalence of lameness and hoof lesions in all year-round grazing cattle in Brazil. **Tropical Animal Health and Production**. v. 50, n. 8, p. 1829–1834, 2018a.

MOREIRA, T. F.; FACURY FILHO, E, J.; ALVES, A. L.; BELLI, C.; MENESES, R. M.; LEME, F. O.; AZAEL, J.; ZAMBRANO, J. U.; RODRIGUES, L. M.; DE CARVALHO, A. U. Metabolic status of crossbreed F1 Holstein × Gir dairy cows during the transition period in two different seasons in Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, n. 6, p. 2487-2500, 2018b.

MOREIRA, T. F.; NICOLINO, R. R.; MENESES, R. M.; FONSECA, G. V.; RODRIGUES, L. M.; FACURY FILHO, E, J.; DE CARVALHO, A. U. Risk factors associated with lameness and hoof lesions in pasture-based dairy cattle systems in southeast Brazil. **Journal Dairy Science**, v. 102, n. 11, p. 10369–10378. 2019.

MULLIGAN, F. J.; O'GRADY, L.; RICE, D. A.; DOHERTY, M. L. A herd health approach to dairy cow nutrition and production diseases of the transition cow. **Animal Reproduction Science**, v. 96, n. 3, p. 331–353. 2006.

NEWSOME, R. F.; GREEN, M. J.; BELL, N. J.; BOLLARD, N. J; MASON, C. S.; WHAY, H. R.; HUXLEY, J. N. A prospective cohort study of digital cushion and corium thickness. Part 1: Associations with body condition, lesion incidence, and proximity to calving. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 6, p. 4745-4758, 2017.

OETZEL, G. R. Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. **Veterinary Clinics North America:Food Animal Practice**, v. 20, n. 3, p. 651–674. 2004.

OLIVEIRA, R. S.; PADUA, M. F.; BARBON, I. M.; SILVA, M. E.; SANTOS, R. M.; MUNDIM, A. V.; SAUT, J. P. Perfil metabólico de vacas mestiças leiteiras com baixo escore de condição corporal no periparto. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 4, p. 362-368, 2014.

OSPINA, P. A.; NYDAM, D. V.; STOKOL, T.; OVERTON, T. R. Association between the proportion of sampled transition cows with increased nonesterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate and disease incidence, pregnancy rate, and milk production at the herd level. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 8, p. 3595–3601, 2010.

OSPINA, P. A.; MCART, J. A.; OVERTON, T. R.; STOKOL, T. ; NYDAM, D. V. Using Nonesterified fatty acids and B-hydroxybutyrate concentrations during the transition period for herd-level monitoring of increased risk of disease and decreased reproductive and milking performance. **The Veterinary Clinic of North America ,Food Animals practice**, v. 29, n. 2, p. 387–412, 2013.

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

OVERTON, T. R.; WALDRON, M. R. Nutritional management of transition dairy cows: strategies to optimize metabolic health. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n 13, p.105–119, 2004. Supplement.

PAYNE, J. M. The future of presymptomatic diagnosis. **Proceedings of the Royal Society of Medicine**, v. 65, 1972.

PEGORER , M. F.; VASCONCELOS, L. M.; TRINCA, L. A.; HANSEN, P. J; BARROS, C. M. Influence of sire and sire breed (Gir versus Holstein) on establishment of pregnancy and embryonic loss in lactating Holstein cows during summer heat stress. **Theriogenology**, v. 67, n. 4, p. 692–697, 2007.

PRODANOVIĆ, R.; SLADOJEVIĆ, Z.; KIROVSKI, D.; VUJANAC, I.; IVETIĆ, V.; SAVIĆ, B.; KURELJUŠIĆ, B.; STEVANČEVIĆ, M. Use of metabolic profiles and body condition scoring for the assessment of energy status of dairy cows. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v. 28, n. 1, p. 25-32, 2012.

PUPPEL, K.; KUCZYNSKA, B. Metabolic profiles of cow's blood; a review. **Journal Science Food Agriculture**, v. 96, n. 13, p. 4321-4328, 2016.

RANDALL, L. V.; GREEN, M. J. CHAGUNDA, M. G. G. MASON, C. ARCHER, S. C. GREEN, L. E. HUXLEY, J. N. Low body condition predisposes cattle to lameness: An 8-year study of one dairy herd . **Journal of Dairy Science**. v. 98, n. 6, p. 3766-3777, 2015.

RANJBAR, S.; RABIEE, A. R.; GUNN, A.; HOUSE, J. K. Identifying risk factors associated with lameness in pasture-based dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 9, p. 7495-7505, 2016.

REINHARDT, T.; LIPPOLIS, J. D.; MC CLUSKEY, B. J.; GOFF, J. P.; HORST, R. L. Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. **The Veterinary Journal**, v. 188, n. 1, p. 122–124, 2011.

RIBEIRO, L. S.; GOES, T. J.; TORRES FILHO, R. A.; ARAÚJO, C.V.; REIS, R. B.; SATURNINO, H. M. Desempenhos produtivo e reprodutivo de um rebanho F1 Holandês x Gir em Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 6, p. 1624-1634, 2017.

ROCHE, J. R.; HEISER, A.; MITCHELL, M. D.; CROOKENDEN, M. A.; WALKER, C.

G.; KAY, J. K.; VAILATI RIBONI, M.; LOOR, J. J.; MEIER, S. Strategies to gain body condition score in pasture-based dairy cows during late lactation and the far-off nonlactating period and their interaction with close-up dry matter intake. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 3, p.1720-1738, 2017.

ROCHE, J. R. KAY, J. K. FRIGGENS, N. C. LOOR, J. J. BERRY, D. P. Assessing and managing body condition score for the prevention of metabolic disease in dairy cows. **The Veterinary Clinics of North America: Food Animals practice**, v. 29, n. 2, p. 323-335, 2013.

ROCHE, J. R.; FRIGGENS, N. C.; KAY, J. K.; FISHER, M. W.; STAFFORD, K. J.; BERRY, D. P. Invited review: Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 12, p. 5769-5801, 2009.

RODRÍGUEZ, E. M.; ARÍS, A.; BACH, A. Associations between subclinical hypocalcemia and postparturient diseases in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 9, p. 7427-7434, 2017.

ROSSATO, W.; GONZÁLEZ, F. H.; DIAS. M. M.; RICCÓ. D.; VALLE. S. F.; ROSA, V. L. Number of lactations affects metabolic profile of dairy cows. **Archives of Veterinary Science**, v. 6, n. 2, p. 83-88, 2001.

RUPRECHTER, G.; ADRIEN, M. L.; LARRIESTRA, A.; MEOTTI, O.; BATISTA, C. MEIKLE, A.; NORO, M. Metabolic predictors of peri-partum diseases and their association with parity in dairy cows. **Research in Veterinary Science**, v.118, n. 3, p. 191-198, 2018.

RUTHERFORD, A. J.; OIKONOMOU, G.; SMITH, R. F. The effect of subclinical ketosis on activity at estrus and reproductive performance in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 6, p. 4808-4815, 2016.

SEIFI. H, A.; LEBLANC, S, J.; LESLIE, K, E.; DUFFIELD, T, F. Metabolic predictors of post-partum disease and culling risk in dairy cattle. **The Veterinary Journal**, v. 188, n. 2, p. 216–220. 2011.

SEPÚLVEDA-VARAS, P.; LOMB, J.; VON KEYSERLINGK, M. A.; HELD, R.; BUSTAMANTE, H.; TADICH, N. Claw horn lesions in mid-lactation primiparous dairy cows under pasture-based systems: Association with behavioral and metabolic changes around calving. **Journal of Dairy Science**. v.101, n. 10, p. 9439-9450, 2018.

SHEEHY, M. R.; FAHEY, A. G.; AUNGIER, A. P.; CARTER, F.; CROWE, M. A.; MULLIGAN, F. J. A comparison of serum metabolic and production profiles of dairy cows that maintained or lost body condition 15 days before calving. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 1, p. 536-547, 2017.

SHIN, E. K.; JEONG, J. K.; CHOI, I. S.; KANG, H. G.; HUR, T.Y.; JUNG, Y. H.; KIM, I. H. Relationships among ketosis, serum metabolites, body condition, and reproductive outcomes in dairy cows. **Theriogenology**, v. 84, n. 2, p. 252–260, 2015.

SILVA, L. A.; SILVA, L. M.; ROMANI, A. F.; RABELO, R. E.; FIORAVANTI, M. C.; DE SOUZA T. M.; DA SILVA, C. A. Características clínicas e epidemiológicas das enfermidades podais em vacas lactantes do município de Orizona – GO. **Ciência Animal Brasileira**, v. 2, n. 2, p. 119-126, 2001.

SILVEIRA, J. A.; ALBERNAZ, T. T.; OLIVEIRA, C. M.; DUARTE, M. D.; BARBOSA, J. D. Afecções podais em vacas da bacia leiteira de Rondon do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 11, p. 905-909, 2009.

SJÖSTRÖM, K.; FALL, N.; BLANCO-PENEDO, I.; DUVAL, J. E.; KRIEGER, M.; EMANUELSON .U. Lameness prevalence and risk factors in organic dairy herds in four European countries. **Livestock Science**, v. 208, n. 12, p. 44–50, 2018.

SPRECHER, D. J.; HOSTETLER, D. E.; KANEENE, J. B. A lameness scoring system that uses posture and gait to predict dairy cattle reproductive performance. **Theriogenology**, v. 47, n. 6, p. 1179–1187, 1997.

SOUZA, R. C.; ÚLTIMO DE CARVALHO, A.; FERREIRA, P. M.; FACURY FILHO, E. J.; FERREIRA, M. G.; FERREIRA, R. G.; COSTA, C. O.; NETO. A. M. Prevalência e distribuição de lesões digitais em vacas leiteiras nas regiões de Belo Horizonte e Pedro Leopoldo. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 4, p. 823-831. 2007.

SOUZA, A. M.; TULIO, L. M.; GAI, V. F. Incidência de lesões podais em bovinos de aptidão leiteira na região oeste do Paraná. **Revista Cultivando o Saber**. Edição Especial, p. 194 – 202, 2015.

TADICH, N.; FLOR, E.; GREEN, L. Associations between hoof lesions and locomotion score in 1098 unsound dairy cows. **The Veterinary Journal**, v. 184, p. 60–65, 2010.

TOHOLJ, B.; CINCOVIC, M.; STEVANCEVIC, M.; SPASOJEVIC, J.; IVETIC, V. POTKONJAK, A. Evaluation of ultrasonography for measuring solar soft tissue thicknesses a predictor of sole ulcer formation in Holstein–Friesian dairy cows. **The Veterinary Journal**, v. 199, n. 2, p. 290–294, 2014.

TOMASELLA, T, E.; NEGRI FILHO, L. C.; AFFONSO, M. Z.; BARCA JUNIOR, F.; DA SILVA, L. C.; OKANO, W. Prevalência e classificações de lesões podais em bovinos leiteiros na região de Belo Horizonte-MG. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 8, n. 1, p. 115 - 128, 2014.

VAN SAUN, R, J. Metabolic profiles for evaluation of the transition period. **Proceedings of American Association of Bovine Practitioners**, v. 39, p. 130–138, 2006.

WHAY, R. H.; SHEARER, J. K. The impact of lameness on welfare of the dairy cow. **The Veterinary Clinics of North America: Food animals practice**, v. 33, n. 2, p. 153–164, 2017.

## 2 HIPÓTESES

H<sub>1</sub>: O ganho de ECC no período seco, o grau de sangue e o volume de leite produzido determinam influência sobre o perfil metabólico de vacas Holandês x Gir de alta produção. (Artigo A)

H<sub>1</sub>: O ganho de ECC no período seco, o grau de sangue e o volume de leite produzido determinam influência sobre a ocorrência de doenças em vacas Holandês x Gir de alta produção no início da lactação. (Artigo A)

H<sub>1</sub>: A apresentação de claudicação ou de lesões do casco em vacas Holandês x Gir de alta produção leiteira está associada com desequilíbrios metabólicos no período de transição. (Artigo B)

H<sub>1</sub>: A apresentação de claudicação ou de lesões do casco em vacas Holandês x Gir de alta produção leiteira está associada com a perda da condição corporal no início da lactação. (Artigo B)

H<sub>1</sub>: Vacas Holandês x Gir de alta produção leiteira com lesões do casco ou claudicação ao redor do parto apresentam perfil metabólico diferente das vacas sadias. (Artigo B)

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil metabólico de vacas Holandês x Gir de alta produção no período de transição, verificando os efeitos de condição corporal, grau de sangue, produção de leite, claudicações e lesões do casco.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar se o incremento de ECC no período seco, o grau de sangue e o volume de leite produzido têm influência sobre a ocorrência de desequilíbrios metabólicos no período de transição.

Verificar se o incremento de ECC no período seco, o grau de sangue e o volume de leite produzido estão associados com a ocorrência de doenças no início da lactação.

Identificar as lesões presentes no casco no período seco e no início da lactação e determinar se têm associação com os desequilíbrios metabólicos no período de transição ou com a perda de ECC após o parto.

Determinar se a apresentação de claudicação ou de lesões do casco no pré-parto e no pós-parto sofrem influência do comportamento metabólico.

## 4 ARTIGO A – Effect of changes in body condition during the dry period, milk yield and degree of crossing on the metabolic profile of high-producing Holstein × Gir cows<sup>1</sup>

### Highlights

- Subclinical hypocalcemia was the most important metabolic disorder
- A high concentration of NEFA was not related to the presentation of diseases
- Prepartum body condition had little influence on the metabolic profile
- High milk yield did not influence the variation in the metabolic profile

### Abstract

This study evaluated the effects of (1) changes in body condition score (BCS) during the dry period, (2) genetic groups, and (3) milk yield on the energy, protein, and mineral balances of high-producing crossbred Holstein × Gir cows. Eighty healthy 2nd to 6th lactation Holstein × Gir cows were distributed by groups according to (1) changes in BCS from day -60 to calving: the low-low group (LLG), low-normal group (LNG), normal-normal group (NNG), and normal or high-high group (NHG); (2) Holstein × Gir crossings: 1/2, 3/4, and 7/8; and (3) mean daily milk yield in the first 60 days: the optimal-yield group (OG; 20-30 L) and the excellent-yield group (EG; > 30 L). BCS; concentrations of nonesterified fatty acids (NEFA),  $\beta$ -hydroxybutyrate (BHB), glucose, cholesterol, total proteins, albumin, blood urea nitrogen, calcium, magnesium, and phosphorus; and the activity of aspartate aminotransferase were measured on days -42, -21, -7, 0, 7, 21, and 42 relative to calving. Postpartum diseases were registered. Two-way repeated-measures ANOVA was performed considering group and time, and the chi-squared test was used to verify the associations between groups, metabolic disorders, and diseases. Among the three ways of grouping the cows, the change over time was the main effect for all studied variables ( $P < 0.001$ ), and differences between groups and interactions were infrequent. BCS increased before calving in cows grouped according to crossings and milk yield and in NHG and LNG cows. NNG and LLG cows maintained and unchanged BCS. In the postpartum period, BCS decreased in all groups. Considering the changes observed in the measured blood constituents, the cows showed similar metabolic profiles in the different studied groups. Prepartum negative energy balance (56/80; 70%) and subclinical hypocalcemia (SCH) at calving (43/80; 53.7%) were the main metabolic imbalances, but the occurrence of subclinical ketosis was negligible (7/80; 8.7%). SCH was more frequent in EG cows ( $P = 0.009$ ). Subclinical and clinical mastitis, clinical endometritis, and metritis were the most diagnosed diseases, without group distinctions. High prepartum NEFA concentrations were not related to the presentation of diseases in early lactation. High-producing Holstein × Gir cows kept in an open confinement system in tropical climate conditions are competent to maintain metabolic balances in late gestation and early lactation regardless of the BCS at calving (low, normal or high), the degree of crossing, or the volume of milk yielded.

**Keywords:** Girolando cow, metabolic disorders, body condition score, transition period.

---

<sup>1</sup> Text formatted according to the rules of the journal Livestock Science (<https://www.elsevier.com/journals/livestock-science/1871-1413/guide-for-authors>)

## INTRODUCTION

High-producing dairy cows have a high metabolic demand around calving because the nutrient requirements increase and the dry matter intake (DMI) is lowered. This period is known as the transition period, comprising the three weeks before and after calving, and is characterized by a negative energy balance (NEB) (Mulligan et al., 2006). Dietary, physiological and energy balance changes in the transition period increase the presentation of metabolic imbalances and increase the risk of diseases (Herdt, 2000; Roche et al., 2013).

To monitor the transition period, metabolic profiles are used, which are analyses of blood biochemical constituents that assess the cows' nutritional status (Puppel and Kuczyńska, 2016). Metabolite determination in cows before calving helps to predict disease after calving. The nonesterified fatty acids (NEFA) concentration is an indicator of body fat mobilization, and the prepartum increase is related to the increased risk of presenting diseases such as displaced abomasum, clinical ketosis, metritis, and retained placenta (Ospina et al., 2010a). Low concentrations of albumin or cholesterol before calving are associated with the presentation of retained placenta and mastitis (Ruprechter et al., 2018).

Body condition score (BCS) is used to monitor the energy status and helps to predict disease in early lactation (Mansouryar et al., 2018; Sheehy et al., 2017). Cows with a high BCS at calving have a greater BCS loss during lactation and an increased risk of developing clinical hypocalcemia and ketosis (Mansouryar et al., 2018). Cows that lose BCS over the transition period have increased concentrations of NEFA and beta-hydroxybutyrate (BHB), decreased fertility and increased health problems compared to cows that had no change in or gained BCS (Barletta et al., 2017). To reduce BCS loss and the risk of diseases in early lactation, energy-rich diets are recommended for cows during the close-up period (Roche et al., 2017). The diet in the far-off period, on the other hand, should be low in energy (Dann et al., 2006). However, a high energy intake during the far-off period for cows with a low BCS improves their metabolism around calving (Roche et al., 2017).

To improve aspects related to health, reproductive parameters and longevity in Holstein cows, crosses are made with other breeds (Mendonça et al., 2014). In tropical countries of Asia, America and Africa, the Gir breed (zebu) is particularly interesting because of its capacity for milk production on pasture, lower nutritional requirements and tolerance to heat and parasites (Santana et al., 2014). Girolando (5/8 Holstein × 3/8 Gir) is a breed created in Brazil in 1978 (Canaza-Cayo et al., 2014). The current milk yield of some Holstein × Gir herds is comparable to that of Holstein herds. The magazine Dairy Global (DairyGlobal - Brazil, 2020) reported that a Girolando cow became the world record holder of daily milk

yield (127 kg/day).

Brazil is the fourth-highest milk producer in the world (Embrapa, 2019), and Holstein × Gir cows produce approximately 80% of this total volume (Canaza-Cayo et al., 2014). It is important to determine and understand the metabolic profile of Holstein × Gir cows, since they can behave differently from Holstein cows. Few studies have evaluated the metabolic profiles of Holstein × Gir cows. These studies compared different seasons (Moreira et al., 2018, 2017, 2015a, 2015b), characterized the behavior in cows with a low BCS at calving (Oliveira et al., 2014), compared cows with uterine diseases and healthy cows (Daibert et al., 2018; Silva Filho et al., 2017), and compared different genetic groups (Franzoni et al., 2018). In general, few differences were found, but the studies were carried out in cows with low or moderate milk yield. We hypothesized that in high-producing Holstein × Gir cows, the BCS gain before calving, the genetic group and the volume of milk yielded could influence the metabolic profile and the occurrence of imbalances in early lactation. The objectives of the current study were to evaluate the effects of changes in body condition during the dry period, of genetic groups, and of milk yield on the energy, protein, and mineral balances of high-producing Holstein × Gir cows.

## **MATERIALS AND METHODS**

This project was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of the Universidade Estadual de Londrina, Brazil, under protocol number 24111.2017.23. The study presented here is part of a PhD thesis (Cucunubo Santos, 2020).

### **Animals and management**

The study was carried out between May 2018 and February 2019 on a dairy farm located in Minas Gerais, Brazil (19° 38' 09.5" S 44° 56' 14.7" W and 698 m of altitude). The rainy season (November to March) is humid and cloudy, with a minimum monthly average temperature of 20 °C and a maximum temperature of 31 °C. The dry season (May to September) is mostly clear, with a minimum temperature of 12 °C and a maximum temperature of 28 °C.

The herd was composed of 620 Holstein × Gir cows in milk, with crossings ranging from 1/2 to 15/16. Eighty healthy dry cows with approximately 210 days of gestation were selected, and they were accompanied up to 60 days in milk (DIM). The studied cows yielded  $7,461 \pm 2,096$  kg of milk in  $291 \pm 65$  days of lactation. Most were in the second and third lactations (75%) and the remainder were in the fourth to sixth lactations (25%). Cows

with dystocia and cows with twin calving were not included in the study.

The cows were kept in an open confinement system and grouped according to the period of production: close-up cows (from 21 days before calving), fresh cows (from calving to 21 DIM), and lactating cows. Each specific lot was housed in uncovered pens with good available space for each cow (10 to 20 m<sup>2</sup>), feeders distributed in the fence of the pen, and trees around the fences as a source of shade. The ground floor of the corral had a paved floor area of approximately 2 m in front of the feeders to avoid moisture accumulation.

The feed was a total mixed ration (TMR) specifically calculated for close-up and lactating cows (Table 1). The feeders were supplied twice a day (5 a.m. and 2 p.m.) so that food was always available, and the cows had free access to water. During the rainy months, the lactating cows had access to pasture (*Panicum maximum*) in addition to receiving a TMR after the milkings. The dry cows (60 days to 21 days before calving) remained exclusively on pasture with free access to water and mineral salt and eventually received corn silage.

Calves were removed soon after calving and the colostrum was milked within a period not exceeding three hours. After this, the cows received, through an esophageal tube, a drench solution containing 20 L of water, 160 g of NaCl, 20 g of KCl, 10 g of CaCl<sub>2</sub>, and 300 mL of propylene glycol. The cows were then transferred to the fresh cow group and milked twice a day (5 a.m. and 2 p.m.) using a mechanical milking system. Every morning, all cows were monitored to assess their health status.

As a part of the farm protocol, cows with retained placenta and some degree of dehydration received a second dose of drench solution 24 hours later. Cows with metritis with signs of systemic involvement were treated with ceftiofur (1.1 mg/kg, every 24 hours, in a total of 3 doses) and flunixin meglumine (2.2 mg/kg, every 24 hours).

The studied cows were distributed into 4 groups according to BCS changes between drying (-60 days) and calving: the low-low group (LLG), composed of 16 cows that maintained a low BCS; the low-normal group (LNG), composed of 19 cows that calved with a normal BCS; the normal-normal group (NNG), composed of 19 cows that maintained a normal BCS; and the normal or high-high group (NHG), composed of 22 cows that reached a high BCS at calving. BCSs < 3.0, from 3.0 to 3.5, and > 3.5 were defined as low, normal and high, respectively.

The cows were regrouped according to genetic groups of Holstein × Gir crosses (the 1/2 (n = 34), 3/4 (n = 32), and 7/8 (n = 14) groups) and according to the average daily milk yielded in the first 60 DIM (the optimal milk-yield group (OG), composed of 24

cows that yielded 20 to 30 kg/day; and the excellent milk-yield group (EG), composed of 51 cows that yielded > 30 kg/day). The OG was composed by 71% of 1/2 cows, 16% of 3/4 cows, and 13% 7/8 cows, while the EG was composed by 27% of 1/2 cows, 55% of 3/4 cows, and 18% of 7/8 cows.

#### Body condition score and milk yield

The conventional scale from 1 to 5 was used for BCS definition (Ferguson et al., 1994; Roche et al., 2013). BCS was evaluated on days -60 ( $\pm$  8), -21 ( $\pm$  7), -7 ( $\pm$  4), 0, 7, 21, and 42 relative to calving. To minimize the subjectivity of the assessment, it was made by a single person, and BCS was established with the aid of the BCS Cowdition app (Bayer Animal Health, Germany), available for smart phones.

The individual milk yielded was measured by means of electronic meters present in the mechanical milking system (Alfa Laval Ltda, SP, Brazil).

**Table 1-** Diets supplied for high-producing Holandês  $\times$  Gir cows in the prepartum transition period and in the first 100 days of lactation.

Ingredients	Pre-partum <sup>†</sup>		Postpartum	
	(kg DM/d)	% (DM)	(kg DM/d)	% (DM)
corn silage	8.3	82.2	10.1	43.6
ryegrass/oat hay	-	-	0.9	3.9
dried citrus pulp	-	-	2.6	11.3
soybean meal	-	-	0.72	3.1
lactating concentrate feed	-	-	7.22	31.2
cotton seed	-	-	1.62	6.9
prepartum concentrate feed	1.8	17.8	-	-
<b>Chemical composition</b>		Recommended*		Recommended*
dry matter (%)	48.8	42.40	52.7	53.20
net energy (Mcal/kg)	2.12	1.54 – 1.62	2.34	2.06
crude protein (%)	15.2	13.5 – 15.0	15.6	17.5
NDF (%)	32.3	25.0 – 33.0	36.3	25.0 – 33.0
ADF (%)	16.7	17.0 – 21.0	12.5	17.0 – 21.0
EE (%)	3.93	3.1	4.40	4.8 – 5.1
Ca (%)	1.10	0.40 – 0.44	0.55	0.74
P (%)	0.24	0.23 – 0.42	0.30	0.38
Mg (%)	0.40	0.40	0.57	0.27
K (%)	0.97	1.32 – 1.35	1.12	1.19
Na (%)	0.43	0.12 – 0.13	0.62	0.34
S (%)	0.44	0.20 – 0.40	0.25	0.20
Cl (%)	1.10	0.42 – 0.89	0.52	0.36
DCAD (mEq/100g MS)	-14.9	-9.8	25.4	22.1

<sup>†</sup> Period of intake: from 21 day before calving; \*Diets formulated according to the NRC (2001) for high production Holstein cows weighing approximately 650 kg before calving and 580 kg at the beginning of lactation. Microminerals in the prepartum diet: zinc (182 ppm), manganese (167 ppm), copper (35.4 ppm), and, iron (571 ppm). Microminerals in the postpartum diet: zinc (75.7 ppm), manganese (75.9 ppm), copper (27.2 ppm), and iron (3499 ppm).

## Blood collection and analysis

Blood samples were taken by coccygeal venipuncture (10 mL) using vacuum tubes without anticoagulant and vacuum tubes with EDTA and sodium fluoride on the following days relative to calving: -42 ( $\pm 8$ ), -21 ( $\pm 7$ ), -7 ( $\pm 4$ ), 0, 7, 21, and 42. After collection, the samples rested for 60 minutes and then were centrifuged ( $2,000 \times g$  for 10 minutes). The obtained serum and plasma were stored in 2 mL aliquots and kept frozen ( $-20^\circ\text{C}$ ) until processing, up to 11 months later.

Serum concentrations of NEFA (NEFA; Randox Laboratories Ltd, UK), BHB (Rabut; Randox Laboratories Ltd, UK), cholesterol (Cholesterol; Flex® reagent cartridge; Siemens), albumin (Alb) (ALB-PP; Gold Analisa Diagnóstica, Ltda), total protein (TP) (TP; Flex® reagent cartridge; Siemens), blood urea nitrogen (BUN) (BUN; Flex® reagent cartridge; Siemens), total calcium (Ca) (Ca; Flex® reagent cartridge; Siemens), magnesium (Mg) (Mg; Flex® reagent cartridge; Siemens), and phosphorus (P) (PHOS; Flex® reagent cartridge; Siemens); plasma concentrations of glucose (GLU; Flex® reagent cartridge; Siemens); and serum activity of aspartate aminotransferase (AST) (AST; Flex® reagent cartridge; Siemens) were measured in an automated spectrophotometer (Dimension Xpand Plus®; Siemens; São Paulo, SP, Brazil) using specific commercial reagents.

## Diseases and metabolic imbalances definition

Diseases that occurred during the beginning of lactation (up to 60 DIM) were recorded. Retained placenta was defined as the retention of fetal membranes for more than 24 hours after calving. Uterine secretions were evaluated by Metrichick® on 7, 21 and 42 DIM. Metritis was diagnosed when fetid watery red-brown vaginal discharge was present within the first 21 DIM (Sheldon et al., 2006). Clinical endometritis was diagnosed when mucopurulent secretion was present on 42 DIM (Sheldon et al., 2006). Clinical mastitis was diagnosed when there were visible changes in milk, accompanied or not by signs of inflammation in the affected mammary gland. Subclinical mastitis was defined by somatic cell counts (SCCs)  $> 200,000$  cells/mL (Adkins and Middleton, 2018). As a routine on the farm, the SCCs were performed once a month in all cows, and the individual sample consisted of a mixture of milk from the four mammary glands. The samples were sent to a reference laboratory and processed by flow cytometry (Somacount 300; Bentley® Instruments Inc., Chaska, Minnesota, USA).

The following cutoff values were used to define NEB: prepartum NEFA concentrations  $> 0.3$  mmol/L (Ospina et al., 2010b) or  $> 0.4$  mmol/L (McArt et al., 2013), in

two consecutive sampling moments; and postpartum NEFA concentrations  $> 0.7$  mmol/L (McArt et al., 2013; Ospina et al., 2010b) on day 7. Subclinical ketosis (SCK) was defined by postpartum BHB concentrations  $> 1.2$  mmol/L (Ospina et al., 2010b). The cutoff value of 2.5 mmol/L in the postpartum period was used to define hypoglycemia (Mair et al., 2016). Subclinical hypocalcemia (SCH) was defined by concentrations of Ca  $< 2,125$  mmol/L (Goff, 2014).

#### Statistical analysis

Two-way repeated-measures ANOVA was used to test the effects of time relative to calving : (-42 , -21, -7, 0, 7, 21 and 42 DIM), the effect of BCS changes in the prepartum period (LLG  $\times$  LNG  $\times$  NNG  $\times$  NHG) and the interaction between these two factors. This same type of analysis was applied in the case of genetic groups (1/2  $\times$  3/4  $\times$  7/8) and milk-yield groups (OG  $\times$  EG). All measured metabolites and BCS were included in these analyses. The total milk yielded in the lactation and the total DIM were compared between groups using one-way ANOVA. The Tukey test was used for all multiple comparisons.

The associations between groups and the presentation of metabolic imbalances (NEB, hypoglycemia, and SCH), the presentation of diseases in the beginning of lactation (retained placenta, metritis, clinical endometritis, clinical mastitis, and subclinical mastitis), and the need for culling after 60 DIM were analyzed by the chi-squared test or by Fisher's exact test. These same tests were used to verify the associations between each metabolic imbalance and the occurrence of diseases, including all the studied cows. The probability of error of 5% was admitted for all tests. Sigma Stat for Windows 3.1 software was used for all statistical analyses.

## RESULTS

In the groups of cows based on changes in BCS during the dry period, 4 cows did not enter the analysis because they lost BCS or they changed from a low to a high BCS. For the groups of cows based on genetic group, 80 cows were used. In the groups composed according to the daily mean milk yield in the first 60 DIM, 5 cows did not enter the analysis because all the data for milk production were not available for these cows.

The total volume of milk yielded over lactation ( $P = 0.411$ ) and the total DIM ( $P = 0.598$ ) did not differ between the groups defined according to BCS changes in the dry period:  $8,227 \pm 2,291$  kg and  $309 \pm 71$  d in the LLG;  $7,530 \pm 1,997$  kg and  $291 \pm 69$  d in the LNG;  $7,229 \pm 1,881$  kg and  $279 \pm 47$  d in the NNG; and  $6,919 \pm 2,244$  kg and  $280 \pm 67$  d in the NHG. The total volume of milk yielded differed between genetic groups ( $P < 0.001$ ),

being greater in 7/8 ( $9,172 \pm 1,837$  kg) and in 3/4 ( $7,976 \pm 1,608$  kg) cows than in 1/2 ( $6,318 \pm 2,093$  kg) cows. Total DIM was higher ( $P = 0.015$ ) in 7/8 ( $331 \pm 60$  d) cows than in 1/2 ( $266 \pm 67$  d) cows, and the 3/4 cows presented intermediate values ( $301 \pm 57$  d). The average daily milk yielded over the first 60 DIM was  $35.9 \pm 3.5$  kg in EG cows and  $25.0 \pm 3.16$  kg in OG cows ( $P < 0.001$ ). The total volume of milk yielded over lactation was higher ( $P < 0.001$ ) for the EG ( $8,188 \pm 1,683$  kg) than for the OG ( $5,859 \pm 1,808$  kg), while the total DIM did not differ ( $P = 0.108$ ):  $301 \pm 65$  d in the EG and  $272 \pm 59$  d in the OG.

BCS variation over time was similar among the three ways of grouping the cows (BCS changes in the dry period, genetic groups, and milk yield), increasing from day -60 to day -21, remaining unchanged until day 0 and then decreasing from day 0 to day 42 (Tables 2, 3, and 4). In the groups defined according to changes in BCS in the dry period, there were differences between groups and a significant interaction (group  $\times$  day). The global means differed between all groups ( $P < 0,001$ ), being greater in NHG cows ( $3.65 \pm 0.29$ ), followed by NNG ( $3.11 \pm 0.30$ ), LNG ( $2.94 \pm 0.25$ ), and LLG cows ( $2.62 \pm 0.20$ ). In accordance with the criteria established for the composition of the groups, the NHG and LNG cows showed an increase in BCS from day -60 to calving, while the NNG and LLG cows maintained an unchanged BCS (Figure 1). In the postpartum period BCS decreased in all groups during the first 6 weeks of lactation, reaching normal values in NHG cows ( $3.25 \pm 0.33$ ), low values in NNG ( $2.78 \pm 0.22$ ) and LNG ( $2.75 \pm 0.30$ ) cows, and lower values in LLG cows ( $2.33 \pm 0.15$ ). Differences between groups were observed at all the sampling times (Figure 1). BCSs differed between the cows grouped according to genetic group, being greater in 1/2 cows than in 7/8 cows (Table 3). No BCS difference was found between OG ( $3.12 \pm 0.42$ ) and EG ( $3.12 \pm 0.48$ ) cows (Table 4).

All measured serum or plasma constituents varied over time relative to calving, and the variation patterns were similar regardless of how the cows were grouped. Differences between groups and interactions were, on the other hand, infrequent (Tables 2, 3, and 4). The concentrations of NEFA and glucose increased on day 0 (calving), while the increase in BHB, Alb, and BUN concentrations occurred after calving. The cholesterol concentration decreased gradually during the prepartum period and increased after calving, reaching its highest value on day 42. AST enzyme activity and TP concentrations varied slightly. AST presented higher values after calving, and TP presented the lowest concentrations around calving (days -7, 0 and 7). The concentrations of Ca and P were low at calving (day 0), while the concentration of Mg was high at calving and showed a lower value at day 7.

The Alb concentration differed between cows grouped according to the change in BCS in the dry period, being higher in NHG cows than in LLG cows (Table 2). In regard to the genetic groups, 1/2 cows presented higher cholesterol concentrations than 7/8 cows and showed the highest BUN concentration (Table 3). The BUN concentration was also greater in OG cows than in EG cows (Table 4). Interactions (group  $\times$  day) were significant for cholesterol and BUN values in the genetic groups and for BHB values in the milk-yield groups. Cows in the 7/8 group showed lower concentrations of cholesterol during lactation (days 7, 21, and 42) and lower concentrations of BUN at days -42 and 21. The BHB concentrations were higher in EG cows at days 21 and 42.

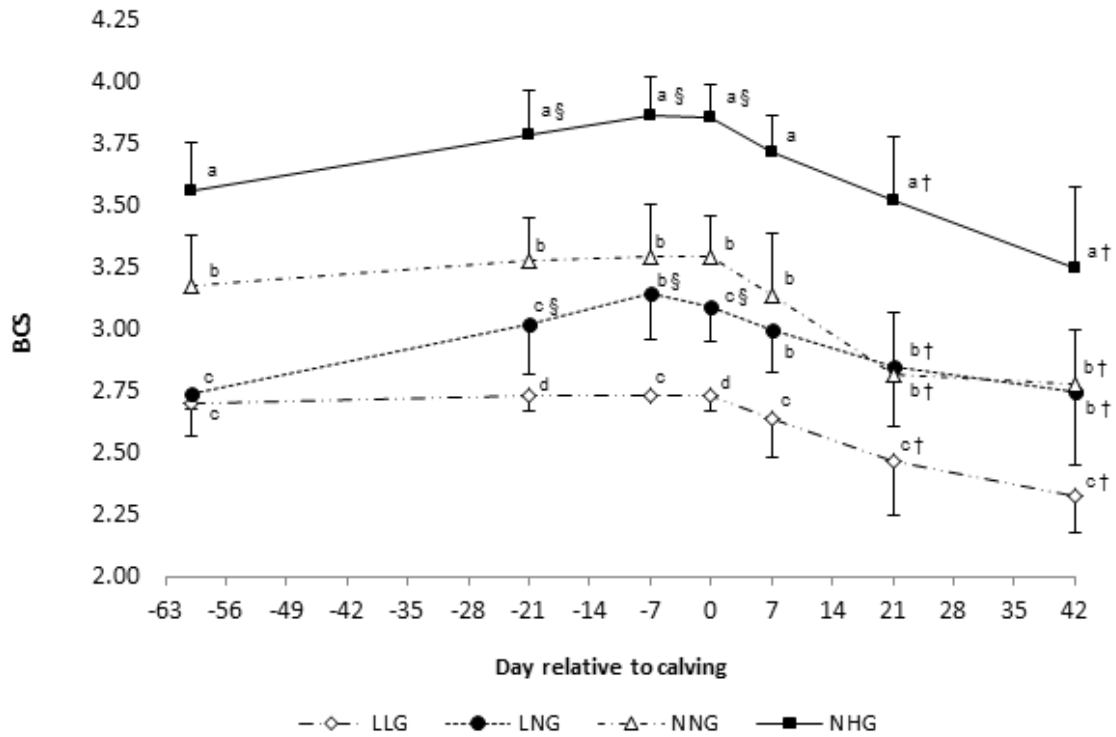
Among the evaluated metabolic imbalances the occurrences of NEB defined by a prepartum NEFA concentration  $> 0.3$  mmol/L in two consecutive sampling times, NEB defined by an NEFA concentration  $> 0.7$  mmol/L at day 7, and SCH at calving, affecting 70%, 38.7%, and 53.7% of the studied cows, respectively, must be emphasized (Table 5). However, when the cutoff of an NEFA concentration  $> 0.4$  mmol/L was assumed to characterize NEB, the frequency of this imbalance dropped to 20%. SCK was uncommon, affecting just 8.7% of the cows, and almost half of the hypocalcemic cows at calving maintained SCH at day 7 (48.8%). In general, these imbalances did not differ between groups. NEB defined by a prepartum NEFA concentration  $> 0.3$  mmol/L in two consecutive sampling times was less frequent in 7/8 cows and SCH was more frequent in EG cows (Table 5).

Fifty-nine cows (73.7%) presented some kind of disorder in the early stage of lactation, and some of them (34/59; 57.6%) had more than one disorder. Subclinical mastitis was the most frequent condition, followed by clinical mastitis, clinical endometritis, metritis, and retained placenta (Table 5). When subclinical mastitis was ignored, the number of cows that developed clinical disorders dropped to 43 (53.7%). The frequencies of these diseases did not differ between groups except for retained placenta, which was more frequent in OG cows. Fourteen cows were culled during lactation for various reasons, and this was more frequent in 7/8 cows (Table 5).

None of the diseases observed in the early stage of lactation was associated with the occurrence of prepartum or postpartum NEB or with the occurrence of SCH ( $P > 0.05$ ). NEB defined by a prepartum NEFA concentration  $> 0.4$  mmol/L at two consecutive sampling times ( $P = 0.537$ ) and NEB defined by an NEFA concentration  $> 0.7$  mmol/L on day 7 ( $P = 0.940$ ) were not associated with SCH. However, NEB defined by a prepartum NEFA concentration  $> 0.3$  mmol/L at two consecutive sampling times and SCH at calving ( $P = 0.024$ ) or SCH at calving and day 7 ( $P = 0.020$ ) were associated. SCH at calving (day 0) was

more frequent in the cows without NEB before calving (18/24; 75% vs. 25/56; 44.6%), and the same was observed for SCH at days 0 and 7 (11/24; 45.8% vs. 10/56; 17.8%).

**Figure 1** – Variation of BCS (mean  $\pm$  sd) during the dry and early lactation periods of high-producing Holstein  $\times$  Gir cows grouped by changes in BCS before calving.



a, a, b, c, d different letters mean differences between groups at each moment.

§ means difference from day -60.

† means difference from day 0.

Groups: low-low (LLG; n=16), low-normal (LNG; n=19), normal-normal (NNG; n=19), and normal or high-high (NHG; n=22). BCS low: < 3.0, normal: 3.0 to 3.5, and high: > 3.5.

1 **Table 2** - Global means of body condition score (BCS) and concentrations of metabolites in high-producing Holstein × Gir cows distributed by  
 2 groups according to changes in body condition score during the dry period. Effect of group (G), effect of days relative to calving (D), and  
 3 interaction between the two factors.

	Days relative to calving							SEM*	<i>P</i> -value		
	-42	-21	-7	0	7	21	42		G <sup>†</sup>	D	G × D
BCS	3.04 <sup>c</sup> §	3.21 <sup>a</sup>	3.26 <sup>a</sup>	3.24 <sup>a</sup>	3.12 <sup>b</sup>	2.91 <sup>d</sup>	2.77 <sup>e</sup>	0.02	<0.001	<0.001	<0.001
NEFA (mmol/L)	0.43 <sup>b</sup>	0.37 <sup>b</sup>	0.39 <sup>b</sup>	0.76 <sup>a</sup>	0.67 <sup>a</sup>	0.43 <sup>b</sup>	0.35 <sup>b</sup>	0.02	0.135	<0.001	0.872
BHB (mmol/L)	0.30 <sup>cd</sup>	0.27 <sup>d</sup>	0.32 <sup>cd</sup>	0.37 <sup>c</sup>	0.66 <sup>a</sup>	0.53 <sup>b</sup>	0.52 <sup>b</sup>	0.02	0.116	<0.001	0.769
Glucose (mmol/L)	3.44 <sup>b</sup>	3.50 <sup>b</sup>	3.39 <sup>b</sup>	5.33 <sup>a</sup>	3.032 <sup>b</sup>	3.13 <sup>b</sup>	3.36 <sup>b</sup>	0.11	0.400	<0.001	0.192
Cholesterol (mmol/L)	3.08 <sup>c</sup>	2.30 <sup>d</sup>	1.87 <sup>e</sup>	1.87 <sup>e</sup>	2.50 <sup>d</sup>	3.93 <sup>b</sup>	5.01 <sup>a</sup>	0.07	0.423	<0.001	0.395
AST (U/L)	66.55 <sup>c</sup>	61.58 <sup>c</sup>	61.66 <sup>c</sup>	71.59 <sup>b</sup>	90.24 <sup>a</sup>	77.69 <sup>b</sup>	69.00 <sup>b</sup>	2.44	0.398	<0.001	0.206
PT (g/L)	82.86 <sup>a</sup>	75.23 <sup>ab</sup>	68.55 <sup>b</sup>	68.80 <sup>b</sup>	71.51 <sup>ab</sup>	81.33 <sup>a</sup>	82.09 <sup>a</sup>	4.03	0.467	<0.001	0.648
Alb (g/L) <sup>¶</sup>	31.04 <sup>b</sup>	29.24 <sup>b</sup>	29.71 <sup>b</sup>	35.37 <sup>a</sup>	36.33 <sup>a</sup>	37.38 <sup>a</sup>	36.91 <sup>a</sup>	0.55	0.040	<0.001	0.333
BUN (mmol/L)	8.33 <sup>bc</sup>	4.70 <sup>d</sup>	4.22 <sup>d</sup>	7.98 <sup>c</sup>	10.55 <sup>a</sup>	10.86 <sup>a</sup>	10.02 <sup>ab</sup>	0.32	0.826	<0.001	0.553
Ca (mmol/L)	2.28 <sup>a</sup>	2.24 <sup>ab</sup>	2.23 <sup>ab</sup>	2.07 <sup>c</sup>	2.17 <sup>bc</sup>	2.22 <sup>ab</sup>	2.16 <sup>bc</sup>	0.02	0.480	<0.001	0.716
P (mmol/L)	2.13 <sup>a</sup>	1.88 <sup>c</sup>	1.85 <sup>d</sup>	1.60 <sup>d</sup>	2.04 <sup>ab</sup>	2.10 <sup>a</sup>	1.91 <sup>bc</sup>	0.03	0.724	<0.001	0.764
Mg (mmol/L)	0.94 <sup>b</sup>	0.95 <sup>b</sup>	0.96 <sup>b</sup>	1.03 <sup>a</sup>	0.88 <sup>c</sup>	0.98 <sup>ab</sup>	0.95 <sup>b</sup>	0.14	0.230	<0.001	0.304

4 \* SEM: standard error of mean.

5 † Groups according to changes in BCS from -60 d to calving: low-low (LLG; n=16), low-normal (LNG; n=19), normal-normal (NNG; n=19), and normal or high-high (NHG; n=22); BCS: low =  
 6 < 3.0, normal = 3.0 to 3.5, high = > 3.5.

7 <sup>a, b, c, d, e</sup> different letters mean differences between the moments.

8 § This measure of BCS was done in day -60.

9 ¶ NHG (35.15 g/L) > LLG (32.65 g/L); LNG (33.50 g/L) = NNG (33.41 g/L) = LLG; LNG = NNG = NHG.

1 **Table 3** - Global means of body condition score (BCS) and concentrations of metabolites in high-producing Holstein × Gir cows distributed by  
 2 groups according to the crosses of Holstein × Gir. Effect of group (G), effect of days relative to calving (D), and interaction between the two  
 3 factors.

	Days relative to calving							SEM*	<i>P</i> -value		
	-42	-21	-7	0	7	21	42		G <sup>†</sup>	D	G × D
BCS <sup>¶</sup>	3.03 <sup>c</sup> §	3.21 <sup>ab</sup>	3.26 <sup>a</sup>	3.25 <sup>a</sup>	3.14 <sup>b</sup>	2.91 <sup>d</sup>	2.78 <sup>e</sup>	0.02	0.047	<0.001	0.537
NEFA (mmol/L)	0.41 <sup>b</sup>	0.37 <sup>b</sup>	0.39 <sup>b</sup>	0.76 <sup>a</sup>	0.66 <sup>a</sup>	0.44 <sup>b</sup>	0.35 <sup>b</sup>	0.02	0.114	<0.001	0.410
BHB (mmol/L)	0.30 <sup>c</sup>	0.30 <sup>c</sup>	0.32 <sup>c</sup>	0.37 <sup>c</sup>	0.67 <sup>a</sup>	0.52 <sup>b</sup>	0.50 <sup>b</sup>	0.02	0.882	<0.001	0.792
Glucose (mmol/L)	3.43 <sup>b</sup>	3.50 <sup>b</sup>	3.36 <sup>b</sup>	5.42 <sup>a</sup>	3.04 <sup>b</sup>	3.12 <sup>b</sup>	3.37 <sup>b</sup>	0.04	0.822	<0.001	0.875
Cholesterol (mmol/L) <sup>¶¶</sup>	3.01 <sup>c</sup>	2.29 <sup>d</sup>	1.85 <sup>e</sup>	1.84 <sup>e</sup>	2.44 <sup>d</sup>	3.74 <sup>b</sup>	4.72 <sup>a</sup>	0.08	0.006	<0.001	<0.001
AST (U/L)	67.06 <sup>c</sup>	61.92 <sup>c</sup>	62.43 <sup>c</sup>	72.35 <sup>bc</sup>	89.10 <sup>a</sup>	77.90 <sup>ab</sup>	68.68 <sup>bc</sup>	2.56	0.418	<0.001	0.797
PT (g/L)	90.80 <sup>a</sup>	76.24 <sup>ab</sup>	68.92 <sup>b</sup>	68.30 <sup>b</sup>	71.04 <sup>b</sup>	81.34 <sup>ab</sup>	82.28 <sup>ab</sup>	4.12	0,253	<0.001	0.577
ALB (g/L)	30.90 <sup>b</sup>	29.45 <sup>b</sup>	29.81 <sup>b</sup>	34.73 <sup>a</sup>	36.20 <sup>a</sup>	36.67 <sup>a</sup>	35.89 <sup>a</sup>	0.57	0.19	<0.001	0.142
BUN (mmol/L) <sup>¶¶¶</sup>	8,51 <sup>b</sup>	4.72 <sup>c</sup>	4.32 <sup>c</sup>	8.07 <sup>b</sup>	10.44 <sup>a</sup>	10.49 <sup>a</sup>	9.78 <sup>ab</sup>	0.35	<0.001	<0.001	0.009
Ca (mmol/L)	2.27 <sup>a</sup>	2.26 <sup>a</sup>	2.23 <sup>ab</sup>	2.05 <sup>c</sup>	2.16 <sup>b</sup>	2.20 <sup>ab</sup>	2.13 <sup>b</sup>	0,02	0.552	<0.001	0.136
P (mmol/L)	2.22 <sup>a</sup>	1.88 <sup>b</sup>	1.87 <sup>b</sup>	1.62 <sup>c</sup>	2.02 <sup>ab</sup>	2.06 <sup>a</sup>	1.89 <sup>b</sup>	0.04	0.150	<0.001	0.298
Mg (mmol/L)	0.93 <sup>b</sup>	0.95 <sup>b</sup>	0.95 <sup>b</sup>	1.02 <sup>a</sup>	0.87 <sup>c</sup>	0.96 <sup>ab</sup>	0.93 <sup>b</sup>	0.01	0.050	<0.001	0.967

\* SEM: standard error of mean.

<sup>†</sup> Groups according to the Holstein × Gir crosses: 1/2 (n=34), 3/4 (n=32), and 7/8 (n=14).

<sup>a, b, c, d, e</sup> different letters mean differences between the moments.

<sup>§</sup> This measure of BCS was done in day -60.

<sup>¶</sup> 1/2 (3.23) > 7/8 (2.94); 3/4 (3.07) = 1/2; 3/4 = 7/8.

<sup>¶¶</sup> 1/2 (3.25 mmol/L) > 7/8 (2.54 mmol/L); 3/4 (2.83 mmol/L) = 1/2; 3/4 = 7/8.

<sup>¶¶¶</sup> 1/2 (9.03 mmol/L) > 3/4 (7.54) = 7/8 (7.57 mmol/L).

4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11

1 **Table 4** - Global means of body condition score (BCS) and concentrations of metabolites in high-producing Holstein × Gir cows distributed by  
 2 groups according to the daily milk yield in the first 60 days after calving. Effect of group (G), effect of days relative to calving (D), and  
 3 interaction between the two factors.

	Days relative to calving							SEM*	P-value		
	-42	-21	-7	0	7	21	42		G <sup>†</sup>	D	G × D
BCS	3.10 <sup>b</sup> §	3.26 <sup>a</sup>	3.31 <sup>a</sup>	3.16 <sup>a</sup>	3.16 <sup>b</sup>	2.94 <sup>c</sup>	2.81 <sup>c</sup>	0.02	0.991	<0.001	0.054
NEFA (mmol/L)	0.45 <sup>b</sup>	0.37 <sup>b</sup>	0.41 <sup>b</sup>	0.78 <sup>a</sup>	0.69 <sup>a</sup>	0.41 <sup>b</sup>	0.34 <sup>b</sup>	0.02	0.201	<0.001	0.225
BHB (mmol/L)	0.30 <sup>c</sup>	0.28 <sup>c</sup>	0.32 <sup>c</sup>	0.37 <sup>c</sup>	0.71 <sup>a</sup>	0.51 <sup>b</sup>	0.50 <sup>b</sup>	0.02	0.150	<0.001	0.038
Glucose (mmol/L)	3.35 <sup>b</sup>	3.51 <sup>b</sup>	3.39 <sup>b</sup>	5.27 <sup>a</sup>	3.06 <sup>b</sup>	3.17 <sup>b</sup>	3.38 <sup>b</sup>	0.11	0.474	0.001	0.091
Cholesterol (mmol/L)	3.11 <sup>c</sup>	2.32 <sup>d</sup>	1.91 <sup>e</sup>	1.89 <sup>e</sup>	2.60 <sup>d</sup>	3.95 <sup>b</sup>	4.99 <sup>a</sup>	0.08	0.324	<0.001	0.311
AST (U/L)	65.83 <sup>bc</sup>	60.55 <sup>c</sup>	62.42 <sup>c</sup>	70.80 <sup>bc</sup>	92.15 <sup>a</sup>	76.42 <sup>b</sup>	68.66 <sup>bc</sup>	2.57	0.724	<0.001	0.986
PT (g/L)	90.67 <sup>a</sup>	75.12 <sup>b</sup>	68.99 <sup>b</sup>	69.23 <sup>b</sup>	71.85 <sup>b</sup>	81.03 <sup>ab</sup>	81.53 <sup>ab</sup>	4.33	1	0.003	0.815
ALB (g/L)	30.91 <sup>b</sup>	29.01 <sup>b</sup>	29.68 <sup>b</sup>	35.53 <sup>a</sup>	36.82 <sup>a</sup>	37.31 <sup>a</sup>	36.47 <sup>a</sup>	0.59	0.70	<0.001	0.727
BUN (mmol/L) <sup>¶</sup>	9.12 <sup>bc</sup>	4.71 <sup>d</sup>	4.55 <sup>d</sup>	7.92 <sup>c</sup>	10.85 <sup>a</sup>	10.87 <sup>a</sup>	9.92 <sup>ab</sup>	0.34	0.037	<0.001	0.903
Ca (mmol/L)	2.28 <sup>a</sup>	2.24 <sup>ab</sup>	2.23 <sup>ab</sup>	2.08 <sup>c</sup>	2.18 <sup>bc</sup>	2.21 <sup>ab</sup>	2.14 <sup>b</sup>	0.02	0.179	<0.001	0.450
P (mmol/L)	2.12 <sup>a</sup>	1.88 <sup>b</sup>	1.88 <sup>b</sup>	1.59 <sup>c</sup>	2.04 <sup>ab</sup>	2.08 <sup>a</sup>	1.89 <sup>b</sup>	0.04	0.094	<0.001	0.811
Mg (mmol/L)	0.93 <sup>bc</sup>	0.95 <sup>b</sup>	0.96 <sup>b</sup>	1.03 <sup>a</sup>	0.89 <sup>c</sup>	0.98 <sup>ab</sup>	0.95 <sup>bc</sup>	0.01	0.381	<0.001	0.612

4 \* SEM: standard error of mean.

5 † Groups according to daily milk yielded in the first 60 DIM: excellent milk yield group (EG > 30 L; n= 51) and optimal milk yield group (OG = 20 to 30 L; n= 24).

6 <sup>a, b, c, d, e</sup> different letters mean differences between the moments.

7 § This measure of BCS was done in day -60.

8 ¶ OG (8.67 mmol/L) > EG (7.89 mmol/L).

**Table 5** – Occurrence of metabolic imbalances and diseases in high-producing Holstein × Gir cows distributed by groups according to changes in body condition score during the dry period, Holstein × Gir crossings and daily milk yield in the first 60 days.

Metabolic imbalance or disease	n	%	P-value		
			BCS change <sup>a</sup>	Genetic group <sup>b</sup>	Milk yield <sup>c</sup>
prepartum NEFA > 0.3 mmol/L <sup>†</sup>	56	70.0	0.062	0.041 <sup>d</sup>	0.318
prepartum NEFA > 0.4 mmol/L <sup>†</sup>	16	20.0	0.868	0.125	0.065
NEFA > 0.7 mmol/L on day 7	31	38.7	0.699	0.264	0.475
postpartum SCK <sup>††</sup>	7	8.7	ND	ND	ND
postpartum hypoglycemia <sup>†††</sup>	11	13.7	0.252	0.169	0.486
SCH on day 0 <sup>††††</sup>	43	53.7	0.585	0.152	0.009 <sup>e</sup>
SCH on days 0 and 7 <sup>††††</sup>	21	26.2	0.953	0.307	0.142
retained placenta	13	16.2	0.175	0.079	0.031 <sup>f</sup>
Metritis	19	23.7	0.182	0.299	0.972
clinical endometritis (day 42) <sup>§</sup>	20	25.6	0.839	0.147	0.419
clinical mastitis	22	27.5	0.166	0.778	0.538
subclinical mastitis in the first month <sup>§§</sup>	23	33.3	0.858	0.471	0.663
subclinical mastitis in the second month <sup>§§§</sup>	28	35.9	0.743	0.774	0.431
culling during lactation (after 60 DIM)	14	17.5	0.657	0.041 <sup>g</sup>	0.093

<sup>a</sup> groups by BCS changes during the dry period: low-low (LLG), low-normal (LNG), normal-normal (NNG), and normal or high-high (NHG); BCS: low < 3.0, normal 3.0 to 3.5, and high > 3.50; total n=76

<sup>b</sup> groups by Holstein x Gir crossings: 1/2, 3/4, and 7/8; total n=80

<sup>c</sup> groups according to the daily milk yielded in the first 60 DIM: OG (20 to 30 L) and EG (> 30 L); total n=75

<sup>†</sup> 2 consecutive samples

<sup>††</sup> SCK: subclinical ketosis; BHB > 1.2 mmol/L

<sup>†††</sup> glucose < 2.5 mmol/L

<sup>††††</sup> SCH: subclinical hypocalcemia; Ca < 2.125 mmol/L

ND: not determined

<sup>d</sup> 1/2 = 79%, 3/4 = 72%, and 7/8 = 43%

<sup>e</sup> OG = 29% and EG = 65%

<sup>f</sup> OG = 29% and EG = 8%

<sup>g</sup> 1/2 = 21%, 3/4 = 6%, and 7/8 = 36%

<sup>§</sup> total n=78

<sup>§§</sup> SCC > 200,000 cell/mL; total n=69

<sup>§§§</sup> SCC > 200,000 cell/mL; total n=78

## Discussion

In the study presented here, we investigated the metabolic profile of high-producing cows which differed from the previous studies with Holstein × Gir cows. In the studied cows, the average daily milk yielded was  $31.5 \pm 8.1$  kg over the first 60 DIM and  $25.8 \pm 4.8$  kg over the entire lactation period. Lower mean values of approximately 20 kg (Moreira

et al., 2018, 2017), 20.8 kg (Oliveira et al., 2014), and 20 to 23 kg (Moreira et al., 2015a; 2015b) were reported in studies that also investigated metabolic profiles. The 1/2 cows yielded lower milk volume than the 3/4 and 7/8 cows, which reinforces previous results in Holstein × Gir cows (Franzoni et al., 2018). However, the average daily milk yielded over the first 60 DIM ( $29.1 \pm 7.8$  kg in 1/2 cows,  $34.5 \pm 6.5$  kg in 3/4 cows, and  $32.0 \pm 8.5$  kg in 7/8 cows) as well as the total milk yielded over lactation were also much higher in the studied cows.

Although the average milk yield during lactation was greater than 9,000 kg in 7/8 cows and greater than 8,000 kg in LLG and EG cows, the volume of milk yielded by the studied Holstein × Gir cows can be considered, in general, lower than that of high-producing Holstein cows. These cows are considered to be the largest milk producers in the world, and values above 10,000 kg of milk per lactation are reported (Aeberhard et al., 2001; Gobikrushanth et al., 2019). Even in Brazil, daily milk averages of 45 kg are reported in free stall conditions (Barletta et al., 2017). The milk production of Holstein cows varies according to the region and management conditions, with reports of production similar to that of the Holstein × Gir cows in this study in different countries such as Brazil (Costa et al., 2018), Germany (Hoedemaker et al., 2009), Austria (Urdl et al., 2015), and the United Kingdom (Pryce et al., 2001).

In our study, there was no effect of BCS on milk production, since the cows grouped by BCS changes in the prepartum period (LLG, LNG, NNG, and NHG cows) presented the same total volume of milk yield in lactation and that cows grouped by milk yield (OG and EG cows) had the same BCS. In contrast, Holstein cows with a high BCS in the precalving period have a higher milk yield and lose more BCS ( $\geq 0.75$ ) than cows with a low prepartum BCS (Gobikrushanth et al., 2019). Other studies report similar milk yield among cows with a high and a low BCS but greater loss of BCS in fat cows in early lactation (Heuer et al., 1999; Mansouryar et al., 2018). Similar to our results, De Freitas et al. (2008) also found no effect of BCS at calving on the milk yield of low-producing Holstein × Gir cows (14 kg/day).

Nevertheless, the BCS of 1/2 cows was higher than that of 7/8 cows but did not differ from that of 3/4 cows (Table 3), which was consistent with the milk production in the three groups. This partially agrees with previous results in Holstein × Gir cows in which 1/2 cows had lower milk yield and higher mean BCS values than 3/4 and 7/8 cows (Franzoni et al., 2018). Genetic selection interferes with BCS changes in Holstein cows, and cows selected for high milk production have a lower BCS and lose more BCS in the first

postpartum weeks (Pryce et al., 2001). In a controlled study, it was found that Holstein cows have a lower BCS in early lactation than Brown Swiss and German Fleckvieh cows handled under the same conditions and having similar milk yield (Urdl et al., 2015). In first-lactation Holstein  $\times$  Gir cows the prepartum and postpartum BCS was higher in 3/4 cows than in 7/8 cows, and the milk yield was the same in both groups (dos Santos et al., 2019). It is possible that this difference is due to the genetic effect caused by the degree of Holstein used in the crossing, which, in turn, can increase milk yield, suggesting that 7/8 cows are more predisposed to imbalances.

The classification of cows with a low BCS ( $\leq 2.75$ ), normal BCS (3.0 - 3.5) and high BCS ( $\geq 3.75$ ) was established by several authors in Holstein cows according to the optimal (normal) BCS interval at calving in which cows were at lower risk of disease (Puppel and Kuczyńska, 2016; Roche et al., 2013). Cows with a high BCS at calving have a higher risk of presenting ketosis and other metabolic disorders than cows that have a normal BCS (Duffield, 2000; Roche et al., 2015, 2013), whereas cows with a low BCS have a higher presentation of infectious diseases in early lactation (Roche et al., 2013). Hoedemaker et al. (2009) found no association between changes in BCS in the dry period of Holstein cows and the presentation of postpartum diseases (hypocalcemia, retained placenta, endometritis, and clinical mastitis); however, BCS at calving was normal. This finding is in accordance with our results. In the studied cows, the metabolic profiles were similar regardless of BCS changes in the dry period, and no association was found between the changes in the prepartum BCS and the presentation of diseases. This suggests that Holstein  $\times$  Gir cows have a metabolic behavior different from that of Holstein cows; however, there are no other studies in Holstein  $\times$  Gir cows that assessed differences in BCS at calving that could support this claim.

Due to the study design and adequate nutritional management, the studied cows did not lose BCS in the prepartum period, which could indicate that they mobilized less fat. In fact, the occurrence of BCS loss in the dry period was infrequent in the studied herd. In the routine diet of dry cows, the control of the energy levels in the far-off diet is recommended to avoid excessive gain in BCS, while the energy supply must be greater in the close-up diet to avoid BCS loss in the prepartum transition period (Dann et al., 2006). In this particular period, cows have a decrease in DMI and hormonal changes, which increase lipolysis, decrease lipogenesis and increase glycogenolysis, causing NEB (Lean et al., 2013). Normally, Holstein cows mobilize fat before calving, losing BCS, even if ideally designed diets are used (Hoedemaker et al., 2009; Kim and Suh, 2003). The few reports available on BCS in the prepartum of Holstein  $\times$  Gir cows demonstrated that there was no loss of BCS

(Daibert et al., 2018; Moreira et al., 2018), indicating that these cows can probably maintain their DMI in the dry period, which decreases the presentation of NEB.

Based on the values of NEFA and BHB concentrations as indicators of energy balance, BCS changes in the dry period did not influence body fat mobilization or NEB after calving (Table 2). Unlike this, BCS changes in Holstein cows in the prepartum period and along the transition period can influence the occurrence of NEB and postpartum concentrations of NEFA and BHB. Cows that maintain a high BCS in the prepartum period (Gobikrushanth et al., 2019; Roche et al., 2013) or cows that lose BCS during the transition period (Barletta et al., 2017; Sheehy et al., 2017) present greater energetic imbalances at the beginning of lactation.

The NEFA and BHB concentrations varied over time without differences between groups. In general, the NEFA concentrations increased at calving, while BHB concentration increased during lactation (Tables 2, 3, and 4). These variations were similar to those already known in Holstein cows (Barletta et al., 2017; Jeong et al., 2015; Sheehy et al., 2017) and to those specifically observed in Holstein × Gir cows (Daibert et al., 2018; Moreira et al., 2018; 2015a; Oliveira et al., 2014). This is explained because the NEB that occurs around calving leads to lipolysis resulting in an increase in the blood concentration of NEFA, which can be metabolized to ketone bodies in the liver, increasing the blood concentration of BHB (Herdt, 2000). EG cows showed greater synthesis of ketone bodies after the first week of lactation than OG cows, which is in agreement with previous findings in Holstein cows (Aeberhard et al., 2001) indicating that the degree of the energy imbalance may be proportional to the volume of milk yielded (Puppel and Kuczyńska, 2016; Roche et al., 2017).

A high percentage of cows presented NEB in the prepartum period and in the beginning of lactation (7 DIM); however, the occurrence of SCK was infrequent (Table 5), and there were no associations with the occurrences of postpartum diseases, which contradicts previous evidence. High NEFA concentrations are indicators of NEB in the prepartum period and are associated mainly with the presentation of abomasal displacement and clinical and subclinical ketosis in early lactation in Holstein cows (Mulligan et al., 2006; Ospina et al., 2010a). In the beginning of lactation, NEB may also be indicated by NEFA concentrations, but the BHB concentration is considered a better indicator (Duffield, 2000; Ospina et al., 2010b), and cows with NEB have an increased risk of developing SCK (Duffield, 2000; Puppel and Kuczyńska, 2016). In Holstein × Gir cows, Moreira et al., (2018, 2015a) reported a higher frequency of imbalances than in the cows of the present study. High concentrations of NEFA, considering the cutoff point of 0.4 mmol/L, were found in 30 to

46% of cows, and 20 to 50% of cows presented SCK, being more frequent at 5 DIM. These discrepancies could probably be due to the characteristics of the diets used in the three studies. Curiously, in the study by Moreira et al. (2018), the cows had a high BCS at calving and did not lose BCS in early lactation, which contradicts the fact that they presented energy imbalance. Similar to our findings, the cows did not present abomasal displacement or clinical ketosis.

Unlike other researchers, we decided to use 2 consecutive values of NEFA concentration over the cutoff point as a criterion for the definition of prepartum NEB to increase the rigor of the decision, since the individual values of NEFA concentration remained, in general, close to the cutoff point. Normally, the value of a single sampling time is used for the definition of NEB (Moreira et al., 2018; 2015; Mulligan et al., 2006; Ospina et al., 2010b), but this may perhaps overestimate the occurrence of the imbalance. In addition, it is uncertain that the cutoff points established for the definition of prepartum NEB in Holstein cows can be used in Holstein  $\times$  Gir cows, and there are no previous studies that can clarify this. The study reported here is the only one that determined associations between prepartum NEB and diseases in early lactation and, even so, evaluated a relatively small number of observations. Daibert et al. (2018) investigated an association between NEB and the occurrence of postpartum uterine diseases in Holstein  $\times$  Gir cows; however, they did not find NEB before calving, and the number of cows was even lower. Further studies in Holstein  $\times$  Gir cows are needed to clarify which critical prepartum values of NEFA concentration may be predictors of early lactation diseases.

The blood glucose peaked on the day of calving (Tables 2, 3, and 4), which probably occurred as a result of increased cortisol related to the stress of labor (Mair et al., 2016). Glucose is maintained by efficient homeostatic mechanisms, and cows with NEB and hypoglycemia have increased fat mobilization, which increases gluconeogenesis and, consequently, blood glucose concentrations (Herdt, 2000). High glucose concentration at calving is a known condition in Holstein cows (Lopera et al., 2018). A similar finding was also reported in Holstein  $\times$  Gir cows (Moreira et al., 2018, 2015a; Silva Filho et al., 2017).

The concentrations of cholesterol and BCS were higher in 1/2 cows than in 7/8 cows. In Holstein cows, high cholesterol concentrations indicate a positive energy balance, presenting a direct relationship with the BCS variation in the beginning of lactation (Cavestany et al., 2005; Kim and Suh, 2003; Sepúlveda-Varas et al., 2015). Cholesterol concentrations varied over time, similar to several previous reports, decreasing in calving and increasing towards day 42, reaching hypercholesterolemia that is considered physiological in

Holstein cows since it is related to the increase in the DMI and the low occurrence of diseases (Cavestany et al., 2005; Kim and Suh, 2003; Sepúlveda-Varas et al., 2015). Holstein × Gir cows showed the same results (Daibert et al., 2018; Moreira et al., 2018, 2015a; Oliveira et al., 2014). The elevation of cholesterol may be the result of increased lipoprotein synthesis in the liver as a means of removing the triglycerides that have accumulated in this organ due to the mobilization of adipose tissue (Cavestany et al., 2005; Puppel and Kuczyńska, 2016). The nonelevated AST values indicate that this process of removing triglycerides was successful in avoiding the occurrence of fatty liver in the studied cows.

The variables that characterize the protein balance showed some variations over time and little influence from the other factors (Tables 2, 3 and 4), and these results are similar to those reported in Holstein (Cavestany et al., 2005) and Holstein × Gir cows (Moreira et al., 2018; Oliveira et al., 2014; Silva Filho et al., 2017). Increases in postpartum BUN concentrations have also been reported in Holstein cows and may be related to the increase in DMI (Shin et al., 2015). TP, Alb, and BUN concentrations are indicators of changes in protein metabolism (Jeong et al., 2015). Protein mobilization is necessary in early lactation, especially for milk production (Lean et al., 2013), and the Alb concentration may decrease due to a reduction in its synthesis or an increase in catabolism due to energy deficiency (Krause et al., 2014; Puppel and Kuczyńska, 2016). BUN concentration may vary depending on dietary protein, nonprotein nitrogen, and energy contents and on ruminal protein degradability (Cavestany et al., 2005; Tufarelli et al., 2015). The values obtained for TP, Alb, and BUN remained within the physiological ranges characterizing the equilibrium condition of the studied cows.

The cows did not present clinical hypocalcemia, but a high number of cows presented SCH at calving, which was the most important imbalance. SCH was more frequent in EG cows, and approximately 50% of SCH cows maintained the imbalance until day 7 (Table 5). This frequency of SCH is compatible with that generally observed in high-producing Holstein cows (Goff, 2014; Neves et al., 2018; Ribeiro et al., 2013) and with that reported in Holstein × Gir cows (Moreira et al., 2017; 2015b). However, the last authors demonstrated that the presentation of SCH in Holstein × Gir cows at calving varied according to the season, being lower (8 to 35%) in summer (hot and rainy months) and very high (72 to 75%) in winter (cold and dry months), which differs from our results since the majority (75%) of the studied cows calved in winter. This is curious because our cows yielded a larger volume of milk, and for this reason, they would be theoretically more likely to have this kind of imbalance. The discrepancy between the results is probably related to qualitative

differences between the offered diets.

Calcium, magnesium and phosphorus changes in the transitional period are metabolic disorders that often occur in high-producing Holstein cows, and hypocalcemia is the main disorder around calving, increasing the risk of culling (DeGaris and Lean, 2008) and the risk of presenting other diseases in early lactation (Neves et al., 2018; Ribeiro et al., 2013; Sepúlveda-Varas et al., 2015). In multiparous Holstein cows, the greater the volume of milk yielded, the greater the risk of developing SCH at calving (Goff, 2014; Neves et al., 2018). Clinical hypocalcemia is associated with BCS at calving, and overconditioned cows have an increased risk of presentation (Heuer et al., 1999). In the studied cows, the frequency of SCH was in fact higher in EG cows. However, it was not related to the BCS presented at calving or to the presentation of diseases in the beginning of lactation.

The serum concentrations of P and Mg varied over time but were similar among the different groups (Tables 2, 3, and 4). P decreased at calving, which was similar to that previously reported in Holstein × Gir cows (Moreira et al., 2017, 2015b; Silva Filho et al., 2017), resembling the known variation in Holstein cows (Jeong et al., 2015; Lopera et al., 2018). As with serum Ca concentration, the decrease in serum P concentration on the day of calving results from the loss of large amounts of this mineral through the colostrum (DeGaris and Lean, 2008; Goff, 2014). Serum Mg concentrations, in turn, increased on the calving day and decreased shortly after reaching the lowest values at 7 DIM. This was similar to that reported in some studies with Holstein × Gir cows (Daibert et al., 2018; Moreira et al., 2017) but differed from others in which the concentration did not change over time (Moreira et al., 2015; Silva Filho et al., 2017). In high-producing Holstein cows, it is common for serum Mg to be increased at parturition and to be reduced at the beginning of lactation, which is related to the loss from colostrum and milk (Jeong et al., 2018). Although the studied cows had a high frequency of SCH, none of them presented hypophosphatemia or hypomagnesemia, which indicates that they were balanced in terms of P and Mg as a result of eating an adequate diet. Hypomagnesemia is currently considered the main risk factor for the development of SCH immediately after calving by reducing the parathyroid hormone (PTH) secretion in response to hypocalcemia and by reducing tissue sensitivity to PTH (DeGaris and Lean, 2008; Goff, 2014). Certainly, the Ca imbalance observed in the studied cows cannot be attributed to a concomitant or previous Mg imbalance.

The diseases diagnosed in the early stage of lactation are commonly reported in dairy cows (Hoedemaker et al., 2009; Jeong et al., 2018; Rupprechter et al., 2018). The high number of occurrences was due, in part, to the rigor of the protocol adopted on the

farm to detect problems. The cow evaluation routine was daily, and the presence of any health change, even if slight, was recorded. The use of Metrichheck® contributed additionally to the increase in the number of occurrences, as it made it possible to diagnose cases of clinical endometritis and some of the cases of metritis. Despite the high number, the observed diseases were of low severity. Cows with clinical endometritis and subclinical mastitis were not treated. In cases of metritis and clinical mastitis, treatment was rarely necessary. It is consistent to admit, therefore, that these diseases had little influence on the metabolic profile of the studied cows, reinforcing previous observations in Holstein × Gir cows (Daibert et al., 2018; Silva Filho et al., 2017).

Well-nourished high-producing Holstein × Gir cows proved to be an efficient alternative for milk production in tropical climate conditions, requiring less sophisticated facilities infrastructure than those required by Holstein cows. Considering the climatic conditions and the type of installation and management used in the present study, it is unlikely that Holstein cows could maintain productivity in this type of system due to the lack of artificial ventilation and to the high ambient temperatures during the day, causing the cows to remain under thermal stress. This resistance to unfavorable hot weather conditions is mainly provided by the Gir breed, which also improves tolerance to parasites (Santana et al., 2014), causing Holstein × Gir cows to be more resistant to heat stress (Da Costa et al., 2015). Both Holstein (Herdt, 2000) and Zebu cows decrease their DMI around calving (Rotta et al., 2015). However, it is known that Holstein cows show a more marked decrease in consumption than crossbred dairy cows (Mendonça et al., 2014), which could explain why the Holstein × Gir cow seems to have a better metabolic adaptation. Currently, there is a tendency to improve the welfare of cows, which would imply the use of open systems, where cows could establish greater socialization and have greater freedom of movement, meaning that the production systems adopted for Holstein × Gir cows can be better accepted in comparison to the intensive systems adopted for Holstein cows. We do not know whether all the advantages demonstrated by high-producing Holstein × Gir cows in tropical climatic conditions would also be seen in cold-climate conditions.

## **Conclusion**

High-producing Holstein × Gir cows kept in an open confinement system present good metabolic adaptation in the transition period. Changes in BCS during the dry period, the degree of crossing, or the volume of milk yielded do not significantly influence the metabolic profile. SCH was the most important imbalance found in Holstein × Gir cows;

however it was not associated with the presentation of diseases in early lactation. Further studies are needed to establish the ideal cutoff point for prepartum NEFA concentration that defines NEB and can be considered a predictor of postpartum diseases in these cows. Well-nourished Holstein × Gir cows are excellent milk producers and are a good alternative in countries with tropical climates, requiring simpler facilities infrastructure than those generally required for Holstein cows.

## REFERENCES

- Adkins, P.R.F., Middleton, J.R., 2018. Methods for Diagnosing Mastitis. *Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract.* 34, 479–491. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2018.07.003>
- Aeberhard, K., Bruckmaier, R.M., Kuepfer, U., Blum, J.W., 2001. Milk Yield and Composition, Nutrition, Body Conformation Traits, Body Condition Scores, Fertility and Diseases in High-Yielding Dairy Cows - Part 1. *J. Vet. Med. Ser. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 48, 97–110. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0442.2001.00292.x>
- Barletta, R. V., Maturana Filho, M., Carvalho, P.D., Del Valle, T.A., Netto, A.S., Rennó, F.P., Mingoti, R.D., Gandra, J.R., Mourão, G.B., Fricke, P.M., Sartori, R., Madureira, E.H., Wiltbank, M.C., 2017. Association of changes among body condition score during the transition period with NEFA and BHBA concentrations, milk production, fertility, and health of Holstein cows. *Theriogenology* 104, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.07.030>
- Canaza-Cayo, A.W., Lopes, P.S., da Silva, M.V.G.B., Cobuci, J.A., Torres, R. de A., Martins, M.F., Arbex, W.A., 2014. Estrutura populacional da raça Girolando. *Cienc. Rural* 44, 2072–2077. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20131307>
- Cavestany, D., Blanc, J.E., Kulcsar, M., Uriarte, G., Chilibroste, P., Meikle, A., Febel, H., Ferraris, A., Krall, E., 2005. Studies of the transition cow under a pasture-based milk production system: Metabolic profiles. *J. Vet. Med. Ser. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 52, 1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.2004.00679.x>
- Costa, J.H.C., Burnett, T.A., von Keyserlingk, M.A.G., Hötzel, M.J., 2018. Prevalence of lameness and leg lesions of lactating dairy cows housed in southern Brazil: Effects of housing systems. *J. Dairy Sci.* 101, 2395–2405. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13462>
- da Costa, A.N.L., Feitosa, J.V., Júnior, P.A.M., de Souza, P.T., de Araújo, A.A., 2014. Hormonal profiles, physiological parameters, and productive and reproductive performances of Girolando cows in the state of Ceará-Brazil. *Int. J. Biometeorol.* 59, 231–236. <https://doi.org/10.1007/s00484-014-0838-0>

- Daibert, E., De Alvarenga, P.B., Rezende, A.L., Fagundes, N.S., Krüger, B.C., Dos Santos, R.M., Mundim, A.V., Saut, J.P.E., 2018. Metabolites able to predict uterine diseases in crossbred dairy cows during the transition period. *Semin. Agrar.* 39, 1037–1048. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n3p1037>
- DairyGlobal - Brazil: Cow breaks world record for milk production [WWW Document], n.d. URL <https://www.dairyglobal.net/Milking/Articles/2020/3/Brazil-Cow-breaks-world-record-for-milk-production-553736E/> (accessed 5.19.20).
- Dann, H.M., Litherland, N.B., Underwood, J.P., Bionaz, M., D'Angelo, A., McFadden, J.W., Drackley, J.K., 2006. Diets during far-off and close-up dry periods affect periparturient metabolism and lactation in multiparous cows. *J. Dairy Sci.* 89, 3563–3577. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72396-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72396-7)
- De Freitas, J.E., Rocha, V.R., Rennó, F.P., De Mello, M.T.P., De Carvalho, A.P., Caldeira, L.A., 2008. Efeito da condição corporal ao parto sobre o desempenho produtivo de vacas mestiças Holandês x Zebu. *Rev. Bras. Zootec.* 37, 116–121. <https://doi.org/10.1590/s1516-35982008000100017>
- DeGaris, P.J., Lean, I.J., 2008. Milk fever in dairy cows: A review of pathophysiology and control principles. *Vet. J.* 176, 58–69. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.029>
- dos Santos, G.B., Brandão, F.Z., dos Santos Ribeiro, L., Ferreira, A.L., Campos, M.M., Machado, F.S., de Carvalho, B.C., 2019. Milk production and composition, food consumption, and energy balance of postpartum crossbred Holstein-Gir dairy cows fed two diets of different energy levels. *Trop. Anim. Health Prod.* 51, 65–71. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1660-1>
- Duffield, T., 2000. Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 16, 231–253. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30103-1](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30103-1)
- Embrapa, 2019. Edição Digital em [embrapa.br/gado-de-leite](http://embrapa.br/gado-de-leite) [WWW Document]. URL <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1109959> (accessed 5.22.20).
- Ferguson, J.D., Galligan, D.T., Thomsen, N., 1994. Principal Descriptors of Body Condition Score in Holstein Cows. *J. Dairy Sci.* 77, 2695–2703. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77212-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77212-X)
- Franzoni, A.P.S., da Gloria, J.R., Costa, A.L.B. de S.A., Martins, R.A., Amaral, T.F., de Azevedo, R.A., Campos, E.F., Coelho, S.G., 2018. Metabolic and hormone profiles of Holstein x Gyr cows during pre- and postpartum. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 53, 371–377. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2018000300012>

- Gobikrushanth, M., Macmillan, K., Behrouzi, A., Hoff, B., Colazo, M.G., 2019. The factors associated with postpartum body condition score change and its relationship with serum analytes, milk production and reproductive performance in dairy cows. *Livest. Sci.* 228, 151–160. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.05.016>
- Goff, J.P., 2014. Calcium and Magnesium Disorders. *Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract.* 30, 359–382. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2014.04.003>
- Herd, T.H., 2000. Ruminant Adaptation to Negative Energy Balance. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 16, 215–230. [https://doi.org/10.1016/s0749-0720\(15\)30102-x](https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30102-x)
- Heuer, C., Schukken, Y.H., Dobbelaar, P., 1999. Postpartum body condition score and results from the first test day milk as predictors of disease, fertility, yield, and culling in commercial dairy herds. *J. Dairy Sci.* 82, 295–304. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75236-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75236-7)
- Hoedemaker, M., Prange, D., Gundelach, Y., 2009. Body condition change ante- and postpartum, health and reproductive performance in German Holstein Cows. *Reprod. Domest. Anim.* 44, 167–173. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00992.x>
- Jeong, J.K., Choi, I.S., Kang, H.G., Hur, T.Y., Jung, Y.H., Kim, I.H., 2015. Relationship between serum metabolites, body condition, peri- and postpartum health and resumption of postpartum cyclicity in dairy cows. *Livest. Sci.* 181, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2015.09.022>
- Jeong, J.K., Choi, I.S., Moon, S.H., Kang, H.G., Kim, I.H., 2018. Relationship between serum magnesium concentration during the transition period, peri- and postpartum disorders, and reproductive performance in dairy cows. *Livest. Sci.* 213, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2018.04.013>
- Kim, I.H., Suh, G.H., 2003. Effect of the amount of body condition loss from the dry to near calving periods on the subsequent body condition change, occurrence of postpartum diseases, metabolic parameters and reproductive performance in Holstein dairy cows. *Theriogenology* 60, 1445–1446. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00135-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00135-3)
- Krause, A.R.T., Pfeifer, L.F.M., Montagner, P., Weschenfelder, M.M., Schwegler, E., Lima, M.E., Xavier, E.G., Brauner, C.C., Schmitt, E., Del Pino, F.A.B., Martins, C.F., Corrêa, M.N., Schneider, A., 2014. Associations between resumption of postpartum ovarian activity, uterine health and concentrations of metabolites and acute phase proteins during the transition period in Holstein cows. *Anim. Reprod. Sci.* 145, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.12.016>
- Lean, I.J., Van Saun, R., DeGaris, P.J., 2013. Energy and protein nutrition management of

transition dairy cows. *Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract.* 29, 337–366. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2013.03.005>

Lopera, C., Zimpel, R., Vieira-Neto, A., Lopes, F.R., Ortiz, W., Poindexter, M., Faria, B.N., Gambarini, M.L., Block, E., Nelson, C.D., Santos, J.E.P., 2018. Effects of level of dietary cation-anion difference and duration of prepartum feeding on performance and metabolism of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 101, 7907–7927. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14580>

Mair, B., Drillich, M., Klein-Jöbstl, D., Kanz, P., Borchardt, S., Meyer, L., Schwendenwein, I., Iwersen, M., 2016. Glucose concentration in capillary blood of dairy cows obtained by a minimally invasive lancet technique and determined with three different hand-held devices. *BMC Vet. Res.* 12, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0662-3>

Mansouryar, M., Mirzaei-Alamouti, H., Banadaky, M.D., Nielsen, M.O., 2018. Calving body condition score combined with milk test data and rectal temperature improved the prognostic value of non-invasive markers for infectious diseases in Holstein cows. *Livest. Sci.* 212, 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2018.03.021>

McArt, J.A.A., Nydam, D. V., Oetzel, G.R., Overton, T.R., Ospina, P.A., 2013. Elevated non-esterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate and their association with transition dairy cow performance. *Vet. J.* 198, 560–570. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.08.011>

Mendonça, L.G.D., Abade, C.C., da Silva, E.M., Litherland, N.B., Hansen, L.B., Hansen, W.P., Chebel, R.C., 2014. Comparison of peripartum metabolic status and postpartum health of Holstein and Montbéliarde-sired crossbred dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97, 805–818. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7159>

Moreira, T.F., Facury Filho, E.J., Costa, A.L.B.S.A., Meneses, R.M., Casagrande, F.P., Leme, F.O.P., Uribe, J.A.Z., Carvalho, A.U., 2017. Mineral profile of crossbred F1 Holstein  $\times$  Gyr dairy cows during the transition period in summer and winter. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 69, 1013–1020. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9240>

Moreira, T. F., Facury Filho, E.J., Meneses, R.M., Mendonça, F.L.M., Lima, J.A.M., Carvalho, A.U., 2015. Energetic status of crossbred dairy cows during transition period in two different seasons. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 67, 1327–1334. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-8287>

Moreira, T.F., Filho, E.J.F., Costa Belli, A.L.S.A., Meneses, R.M., Leme, F.O.P., Uribe, J.A.Z., Rodrigues, L.M., Carvalho, A.U., 2018. Metabolic status of crossbred f1 holstein  $\times$  gyr dairy cows during the transition period in two different seasons in Brazil. *Semin. Agrar.* 39, 2487–2500. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n6p2487>

Moreira, Tiago F., Zambrano, J.U., de Paula, V.M., Casagrande, F.P., Facury Filho, E.J.,

- Molina, L.R., Leme, F.O.P., Carvalho, A.U., 2015. Serum mineral profile of Girolanda cows during transition period in semi-intensive system in two seasons. *Pesqui. Vet. Bras.* 35, 249–257. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015000300007>
- Mulligan, F.J., O’Grady, L., Rice, D.A., Doherty, M.L., 2006. A herd health approach to dairy cow nutrition and production diseases of the transition cow. *Anim. Reprod. Sci.* 96, 331–353. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.08.011>
- Neves, R.C., Leno, B.M., Curler, M.D., Thomas, M.J., Overton, T.R., McArt, J.A.A., 2018. Association of immediate postpartum plasma calcium concentration with early-lactation clinical diseases, culling, reproduction, and milk production in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 101, 547–555. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13313>
- Oliveira, R.S.B.R., Moura, A.R.F., Pádua, M.F.S., Barbon, I.M., Silva, M.E.M., Santos, R.M., Mundim, A. V., Saut, J.P.E., 2014. Perfil metabólico de vacas mestiças leiteiras com baixo escore de condição corporal no periparto. *Pesqui. Vet. Bras.* 34, 362–368. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014000400011>
- Ospina, P.A., Nydam, D. V., Stokol, T., Overton, T.R., 2010a. Association between the proportion of sampled transition cows with increased nonesterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate and disease incidence, pregnancy rate, and milk production at the herd level. *J. Dairy Sci.* 93, 3595–3601. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3074>
- Ospina, P.A., Nydam, D. V., Stokol, T., Overton, T.R., 2010b. Evaluation of nonesterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. *J. Dairy Sci.* 93, 546–554. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2277>
- Pryce, J.E., Coffey, M.P., Simm, G., 2001. The relationship between body condition score and reproductive performance. *J. Dairy Sci.* 84, 1508–1515. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)70184-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)70184-1)
- Puppel, K., Kuczyńska, B., 2016. Metabolic profiles of cow’s blood; a review. *J. Sci. Food Agric.* 96, 4321–4328. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7779>
- Ribeiro, E.S., Lima, F.S., Greco, L.F., Bisinotto, R.S., Monteiro, A.P.A., Favoreto, M., Ayres, H., Marsola, R.S., Martinez, N., Thatcher, W.W., Santos, J.E.P., 2013. Prevalence of periparturient diseases and effects on fertility of seasonally calving grazing dairy cows supplemented with concentrates. *J. Dairy Sci.* 96, 5682–5697. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6335>
- Roche, J.R., Heiser, A., Mitchell, M.D., Crookenden, M.A., Walker, C.G., Kay, J.K., Riboni, M.V., Loor, J.J., Meier, S., 2017. Strategies to gain body condition score in pasture-based dairy cows during late lactation and the far-off nonlactating period and their

- interaction with close-up dry matter intake. *J. Dairy Sci.* 100, 1720–1738. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11591>
- Roche, J.R., Kay, J.K., Friggens, N.C., Loor, J.J., Berry, D.P., 2013. Assessing and managing body condition score for the prevention of metabolic disease in dairy cows. *Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract.* 29, 323–335. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2013.03.003>
- Roche, J.R., Meier, S., Heiser, A., Mitchell, M.D., Walker, C.G., Crookenden, M.A., Riboni, M.V., Loor, J.J., Kay, J.K., 2015. Effects of precalving body condition score and prepartum feeding level on production, reproduction, and health parameters in pasture-based transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98, 7164–7182. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9269>
- Rotta, P.P., Filho, S.C.V., Gionbelli, T.R.S., Costa e Silva, L.F., Engle, T.E., Marcondes, M.I., Machado, F.S., Villadiego, F.A.C., Silva, L.H.R., 2015. Effects of day of gestation and feeding regimen in Holstein × Gyr cows: I. Apparent total-tract digestibility, Nitrogen balance, And fat deposition. *J. Dairy Sci.* 98, 3197–3210. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8280>
- Rupprechter, G., Adrien, M. de L., Larriestra, A., Meotti, O., Batista, C., Meikle, A., Noro, M., 2018. Metabolic predictors of peri-partum diseases and their association with parity in dairy cows. *Res. Vet. Sci.* 118, 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.02.005>
- Santana, M.L., Pereira, R.J., Bignardi, A.B., El Faro, L., Tonhati, H., Albuquerque, L.G., 2014. History, structure, and genetic diversity of Brazilian Gir cattle. *Livest. Sci.* 163, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.02.007>
- Sepúlveda-Varas, P., Weary, D.M., Noro, M., Von Keyserlingk, M.A.G., 2015. Transition diseases in grazing dairy cows are related to serum cholesterol and other analytes. *PLoS One* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122317>
- Sheehy, M.R., Fahey, A.G., Aungier, S.P.M., Carter, F., Crowe, M.A., Mulligan, F.J., 2017. A comparison of serum metabolic and production profiles of dairy cows that maintained or lost body condition 15 days before calving. *J. Dairy Sci.* 100, 536–547. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11206>
- Sheldon, I.M., Lewis, G.S., LeBlanc, S., Gilbert, R.O., 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* 65, 1516–1530. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.08.021>
- Shin, E.K., Jeong, J.K., Choi, I.S., Kang, H.G., Hur, T.Y., Jung, Y.H., Kim, I.H., 2015. Relationships among ketosis, serum metabolites, body condition, and reproductive outcomes in dairy cows. *Theriogenology* 84, 252–260. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.03.014>

- Silva Filho, A.P., Mendonça, C.L., Souto, R.J.C., Silva, R.J., Soares, P.C., Afonso, J.A.B., 2017. Biochemical and hormonal indicators from healthy and sickly crossbred dairy cows during late pregnancy and early lactation. *Pesqui. Vet. Bras.* 37, 1229–1240. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2017001100007>
- Tufarelli, V., Lacalandra, G.M., Laudadio, V., 2015. Reproductive and Metabolic Responses of Early-lactating Dairy Cows Fed Different Dietary Protein Sources. *Reprod. Domest. Anim.* 50, 735–739. <https://doi.org/10.1111/rda.12566>
- Urdl, M., Gruber, L., Obritzhauser, W., Schauer, A., 2015. Metabolic parameters and their relationship to energy balance in multiparous Simmental, Brown Swiss and Holstein cows in the periparturient period as influenced by energy supply pre- and post-calving. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 99, 174–189. <https://doi.org/10.1111/jpn.12178>

## **5 ARTIGO B. Metabolic imbalances, hoof injuries, and metabolic profile of high-producing Holstein × Gir cows showing lameness<sup>2</sup>**

### **Abstract**

This study attempted to determine the associations between metabolic imbalances and lameness or hoof injuries in high-producing Holstein × Gir cows, and to determine whether the metabolic profile affects the occurrence of lameness. Eighty cows were followed from -60 to 60 days relative to calving and hoof injuries were reported on days -60, 7 and 60. Locomotion score (LS), body condition score (BCS), the concentrations of non-esterified fatty acids,  $\beta$ -hydroxybutyrate, glucose, cholesterol, albumin, total protein, blood urea nitrogen (BUN), calcium, phosphorus, and magnesium, and the activity of aspartate aminotransferase were determined at days -42, -21, -7, 0, 7, 21 and 42. The McNemar and Chi-square tests were used to compare frequencies of lameness and hoof injuries over time and to verify the associations between lameness, BCS, hoof injuries, and metabolic disorders. Two-way repeated measures ANOVA was used considering groups (non-lame × lame cows) and variations of BCS and metabolites over time. Lameness and hoof injuries increased between days -60 (20% and 66.3%) and 60 (44.7% and 98.6%). Excessive postpartum loss of BCS ( $P = 0.017$ ) and subclinical hypocalcemia ( $P = 0.012$ ) were associated with lameness on day 60. In general, the metabolic profile did not differ between lame and non-lame cows but cholesterol, albumin, BUN and magnesium concentrations were higher in non-lame cows. The postpartum decrease in BCS can affect the presentation of lameness, and the metabolic profile of lame cows shows little difference from that of non-lame cows.

**Keywords:** dairy cow, transition period, body condition, metabolic disorders.

---

<sup>2</sup> Text formatted according to the rules of the journal Tropical Animal Health and Production (<https://www.springer.com/journal/11250/submission-guidelines>)

## Introduction

Lameness is a very important problem in cows, affecting animals' welfare, interfering with natural behavior, ovarian activity, and estrus intensity (Whay and Shearer, 2017), and causing economic losses due to decreased productivity of dairy herds, treatment costs (Liang et al., 2017), and compromised reproductive efficiency (Charfeddine and Pérez-Cabal, 2017). The intensity of lameness is related to the presence and severity of hoof injuries, which increase the sensitivity to mechanical nociceptive stimuli (Whay et al., 1997). Changes in the locomotion score (LS) vary depending on the type of hoof injury, and lesions such as sole ulcer, double sole, interdigital dermatitis, and fissure of the white line markedly affect the LS (Tadich et al., 2010).

Postpartum body condition score (BCS) is associated with the presentation of lameness, and cows with BCS < 3.0 have a higher risk (Hoedemaker et al., 2009). This finding could be explained by the relationship between the BCS and the thickness of the digital cushion. The lower the BCS is, the lower the thickness is, increasing the presentation of hoof injuries, mainly sole ulcer (Bicalho et al., 2009). This relationship between BCS and the digital cushion by itself does not explain the presentation of injuries, and other genetic and hormonal factors and physiological states are likely to be involved (Newsome et al., 2017). High-producing dairy cows have a negative energy balance (NEB) in the transition period, causing them to lose BCS. Large losses of BCS are associated with metabolic disorders (Allen and Piantoni, 2013), which could influence the occurrence of lameness.

The prevalence of lameness in dairy herds in Brazil is between 16% and 50%, including observations in Holstein (Costa et al., 2018) and Holstein × Gir cows (Moreira et al., 2019). Holstein × Gir (Zebu) cows are crosses that have high milk yield and high rusticity, which makes them important in tropical countries (Santana et al., 2014). In

these cows a high presentation of hoof injuries was reported such as heel erosion, white line fissure and sole hemorrhages (Moreira et al., 2018).

Few studies have investigated the relationship between energy metabolism or metabolic profile and the occurrence of lameness (Ristevski et al., 2017; Paiano et al., 2019) or hoof injury (Sepúlveda-Varas et al., 2018). All of these studies involved observations in Holstein cows. Only one study was carried out with Holstein × Gir cows, but investigated the physical characteristics of the hoof (Casagrande, 2013). Our hypothesis was that the presentation of lameness or hoof injuries in high-producing Holstein × Gir cows is associated with metabolic imbalances in the transition period and with the loss of BCS in early lactation and that the metabolic profile is different between lame and non-lame cows. The objective of this study was to determine the associations between metabolic imbalances and lameness or hoof injuries, as well as to determine whether the metabolic profile interferes with the occurrence of lameness in the pre- and postpartum periods.

## **Materials and methods**

The study presented here is part of a PhD thesis (Cucunubo Santos, 2020). Eighty Holstein × Gir cows with 7 months of gestation were randomly selected in a dairy farm located in Minas Gerais, Brazil (19 ° 38 '09 .5 "S 44 ° 56 '14.7" W and 698 m altitude). The average production was 13,600 L per day, with 620 lactating cows. The study was performed from May 2018 to February 2019, and the average minimum temperature varied from 12 to 20°C, while the maximum varied from 28 to 31°C. The studied cows were in their second and third (n=60) or fourth to sixth (n=20) pregnancies.

Cows in the dry period (60 to 21 prepartum days) were kept on grass pasture (*Panicum maximum*) with free access to water and mineral salt, receiving corn silage eventually according to the pasture availability. During the transition period and lactation, the

cows were kept in an open confinement system, being fed a total mixed ration (TMR) calculated for each stage (Table 1). In addition to the TMR, lactating cows had access to pastures during the rainy months (November to February). The open confinement system was characterized by roofless corrals with unpaved ground, except the feeding area to avoid the accumulation of feces and mud. The cows had good available individual space (10 to 20 m<sup>2</sup>). Cows were milked twice a day using a mechanical milking system. The distance between the corral and the milking parlor was 100 m with a regular paved floor. The cows waited up to 30 min in the waiting area. Once a week they passed through a footbath (3.0 × 1.5 × 0.2 m) containing 5% formaldehyde located at the milking parlor exit. Hoof trimming was routinely performed on all cows on the farm only once a year, which occurred two months before the study began.

All procedures were performed by a single trained examiner. BCS was determined assisted by the BCS Cowdition app (Bayer Animal Health, Germany), available for smartphones, using the scale described by Ferguson et al. (1994), while the LS was determined using a scale from 1 to 5 described by Sprecher et al. (1997). BCS and LS were evaluated on days -60 ( $\pm 8$ ), -21 ( $\pm 7$ ), -7 ( $\pm 4$ ), 0, 7, 21, 42 and 60 relative to calving. The 4 limbs were evaluated to determine the presentation of hoof injuries on days -60, 7 and 60 relative to calving. The hoofs were subjected to a simple and superficial cleaning, removing 2 mm of sole with a hoof knife. The hoof injuries were defined according to the standardized classification (ICAR, 2015; Borges et al., 2017). The severity of the injuries was also evaluated using the methodology of Tadich et al. (2010) and Miguel-Pacheco et al. (2017). Mild, moderate, and severe injuries were classified as degree 1, 2, and 3, respectively. Health disorders such as retained placenta, metritis, clinical endometritis, and clinical mastitis were recorded in the first 60 days in milk (DIM). Cows with lameness or lame hoof lesions were not treated during the study period.

**Table 1.** Ingested diets in the prepartum transition period and in the first 100 days of lactation by high-producing Holandês × Gir cows.

	Pre-partum <sup>†</sup>		Postpartum	
	(kg DM/d)	% (DM)	(kg DM/d)	% (DM)
<b>Ingredients</b>				
corn silage	8.3	82.2	10.1	43.6
ryegrass/oat hay	-	-	0.9	3.9
dried citrus pulp	-	-	2.6	11.3
soybean meal	-	-	0.72	3.1
lactating concentrate feed	-	-	7.22	31.2
cotton seed	-	-	1.62	6.9
prepartum concentrate feed	1.8	17.8	-	-
<b>Chemical composition</b>				
		Recommended*		Recommended*
dry matter (%)	48.8	42.40	52.7	53.20
net energy (Mcal/kg)	2.12	1.54 – 1.62	2.34	2.06
crude protein (%)	15.2	13.5 – 15.0	15.6	17.5
NDF (%)	32.3	25.0 – 33.0	36.3	25.0 – 33.0
ADF (%)	16.7	17.0 – 21.0	12.5	17.0 – 21.0
EE (%)	3.93	3.1	4.40	4.8 – 5.1
Ca (%)	1.10	0.40 – 0.44	0.55	0.74
P (%)	0.24	0.23 – 0.42	0.30	0.38
Mg (%)	0.40	0.40	0.57	0.27
K (%)	0.97	1.32 – 1.35	1.12	1.19
Na (%)	0.43	0.12 – 0.13	0.62	0.34
S (%)	0.44	0.20 – 0.40	0.25	0.20
Cl (%)	1.10	0.42 – 0.89	0.52	0.36
DCAD (mEq/100g MS)	-14.9	-9.8	25.4	22.1

<sup>†</sup> Period of intake: from 21 day before calving; \*Diets formulated according to the NRC (2001) for high production Holstein cows weighing approximately 650 kg before calving and 580 kg at the beginning of lactation. Microminerals in the prepartum diet: zinc (182 ppm), manganese (167 ppm), copper (35.4 ppm), and, iron (571 ppm). Microminerals in the postpartum diet: zinc (75.7 ppm), manganese (75.9 ppm), copper (27.2 ppm), and iron (3499 ppm).

Blood samples were taken by coccygeal venipuncture on days -42(± 8), -21 (± 7), -7 (± 4), 0, 7, 21 and 42 relative to calving. Vacuum tubes without anticoagulant and with EDTA and sodium fluoride were used, and serum and plasma were obtained after centrifugation (2,000 × g for 10 min) and kept frozen (-20 °C) in 2 mL aliquots until processing. Serum concentrations of non-esterified fatty acids (NEFA), beta-hydroxybutyrate (BHB), cholesterol, albumin (Alb), total protein (TP), urea nitrogen (BUN), total calcium (Ca), magnesium (Mg), phosphorus (P); plasma concentration of glucose; and serum activity of aspartate aminotransferase (AST) were measured in an automated spectrophotometer

(Dimension Xpand Plus®; Siemens; São Paulo, SP, Brazil).

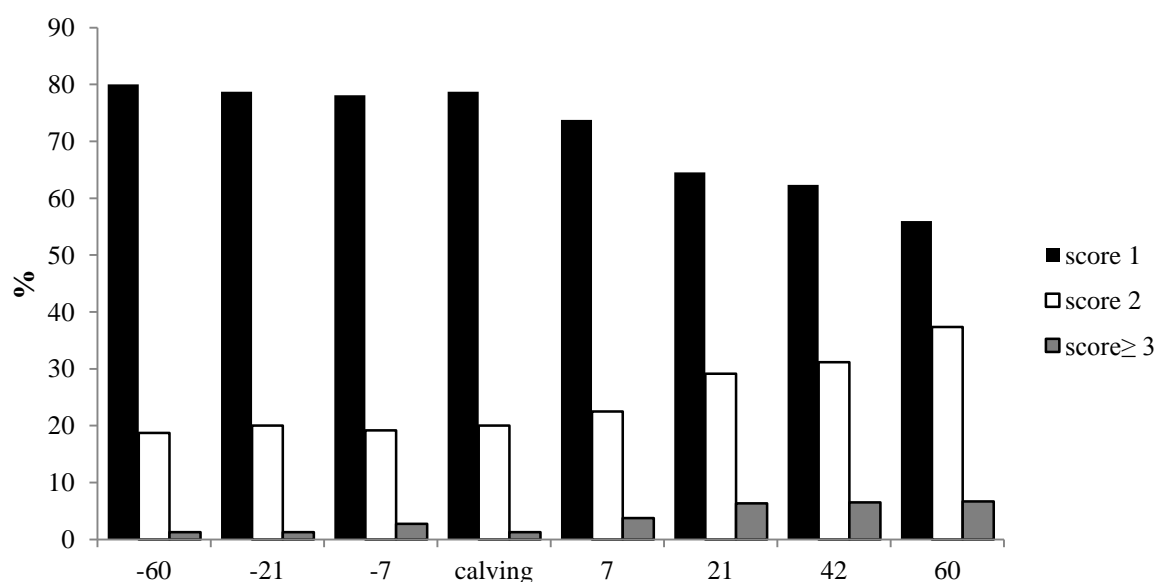
At days 7 and 42 of lactation, 200 mL of ruminal fluid was taken by ororuminal tube 4 hours after the morning feeding. The first 180 mL were discarded and the pH was measured using a portable digital pH meter (Akso Exact Instrument®; China).

The McNemar test was applied to compare proportions of cows with and without lameness and/or hoof injuries at different times relative to calving (-60 × 7 days, -60 × 60 days, and 7 × 60 days). Considering the specific days -60, 7 and 60 relative to calving, the associations between the presentation of lameness and the low BCS, the presence of hoof injury, the presentation of pre- and postpartum metabolic imbalances, and the presentation of diseases in early lactation were tested by Chi-square or by the exact Fisher test. On the same specific days, the associations between the loss of BCS in the postpartum period (0 to 60 DIM) and the presentation of lameness or the presence of some hoof injuries were also tested. For this, the BCS loss was classified as moderate ( $\leq 0.5$ ) and excessive ( $\geq 0.75$ ).

For analysis of the metabolic profile, the cows were grouped into lame and non-lame cows, in the prepartum and in the postpartum periods. Two-way repeated measures ANOVA was used to test the effect of time relative to calving (-42, -21 -7, 0, 7, 21 and 42 DIM), the effect of lameness (non-lame × lame cows), and the interaction between these two factors. All measured metabolites and the BCS were included in these analyses. Two-way ANOVA was used to compare the pH of rumen fluid in lame and non-lame cows in the postpartum period at the two times of sample collection (7 and 42 DIM). Tukey's test was used for all multiple comparisons. An error probability of 5% was admitted for all tests. Sigma Stat for Windows 3.1 software was used for all statistical analyses. In the specific case of McNemar test, the OpenEpi program was used ([www.OpenEpi.com](http://www.OpenEpi.com)).

## Results

The studied cows yielded  $7,461 \pm 2,096$  kg of milk in  $291 \pm 65$  DIM. The presentation of lameness and hoof varied differently over time, increasing in the postpartum period (Figure 1, Table 2). Most affected cows had mild lameness. At 60 DIM, a total of 476 lesions were found in the examined hoofs, and 80.8% of these injuries were classified as mild. Severe injuries were infrequent (2.4%). The most frequent injuries were heel erosion and axial wall fissure, while other infectious injuries were rare (Table 2). The hoof injury called sole erosion in the present study differs from those included in the ICAR (2015) and Borges et al. (2017) classification. It was characterized by a loss of continuity of the sole similar to shallow erosions (up to 2 mm in depth), generally circular, with different sizes (ranging from 0.5 to 1.0 cm in diameter), generally unique, without necrosis, without hemorrhage and without granulation tissue. It presented varied locations, but distinct and generally distant from the classic location of the sole ulcer and it was not painful because the cows were not lame (19/32 with NE=1) or had mild lameness (13/32 with NE=2).



**Figure 1.** Percentage of lameness in high-producing Holstein × Gir cows from 60 days pre-calving to 60 days in milk. Locomotion score: 1 = healthy cow; 2 = mild lameness; 3 or 4 = moderate or severe lameness.

There was a trend of association between lameness and low BCS (Table 3). This condition was found in 47.6% (10/21) of lame cows and 23.7% (14/59) of non-lame cows at 7 DIM, and in 76.4% (26/34) of lame cows and 52.3% (22/42) of non-lame cows at 60 DIM. Lameness was associated with hoof injuries, with SCH on days -60 and 60, and with prepartum Alb < 30 g/L at 7 DIM. Pre- and postpartum NEB and diseases in early lactation were not related to lameness (Table 3).

**Table 2.** Associations comparing the presentations of lameness and/or hoof injuries in high-producing Holstein × Gir cows at days -60, 7, and 60 relative to calving.

Occurrence	Day -60	Day 7	Day 60	P-value	days	days
	(n = 80) n (%)	(n = 80) n (%)	(n = 76) n (%)			
lameness*	16 (20.0)	21 (26.3)	34 (44.7)	0.332	0.002	<0.001
LS 2	15 (18.8)	18 (22.5)	29 (38.1)	0.6464	0.013	0.007
LS 3 or 4	1 (1.3)	3 (3.8)	5 (6.6)	ND	ND	ND
hoof injuries	53 (66.3)	72 (90.0)	74 (98.6)	0.001	ND	ND
heel erosion	16 (20.0)	31 (38.8)	51 (67.1)	0.014	0.002	<0.001
white line fissure	12 (15.0)	52 (65.0)	26 (34.2)	<0.001	<0.001	0.014
axial wall fissure	25 (31.2)	40 (50.0)	45 (60.5)	0.024	0.336	0.003
sole hemorrhage <sup>‡</sup>	11 (13.8)	13 (16.3)	18 (23.7)	0.789	0.211	0.052
sole erosion <sup>††</sup>	2 (2.5)	9 (11.3)	32 (42.1)	0.070	<0.001	<0.001
digital dermatitis	0	3 (3.75)	3 (3.75)	ND	ND	ND
septic pododermatitis	1 (1.25)	1 (1.25)	4 (5.2)	ND	ND	ND
interdigital dermatitis	0	0	2 (2.6)	ND	ND	ND
interdigital hyperplasia	0	2 (2.5)	2 (2.6)	ND	ND	ND
just infectious type injury <sup>†</sup>	7 (8.8)	0	0	ND	ND	ND
just non-infectious type injury <sup>††</sup>	35 (43.8)	43 (53.8)	21 (28.9)	0.859	0.004	0.090
mixed injuries <sup>†††</sup>	10 (12.5)	33 (41.3)	53 (69.7)	<0.001	<0.001	<0.001
lameness with degree 1 injury <sup>§</sup>	12 (15.0)	8 (10.0)	9 (11.8)	0.386	0.772	1.000
lameness with degree 2 injury <sup>a</sup>	4 (5.0)	13 (16.3)	25 (32.9)	0.026	0.009	<0.001
non-lame without injury	25 (31.2)	4 (5.0)	1 (1.31)	ND	ND	ND
non-lame with degree 1 injury	34 (42.5)	43 (53.7)	18 (25.0)	0.044	<0.001	<0.001
non-lame with degree 2 injury <sup>b</sup>	5 (6.3)	12 (15.0)	23 (30.3)	0.145	0.021	<0.001

\* lameness: locomotion score  $\geq 2$

LS: locomotion score

<sup>‡</sup> sole hemorrhage: circumscribed form (frequent) and diffused form (infrequent)

<sup>†††</sup> Hoof injury different from those included in the ICAR (2015) and Borges et al. (2017) classification.

<sup>†</sup> digital dermatitis, interdigital dermatitis, heel erosion, or septic pododermatitis without other concomitant injuries

---

ND: not determined; few positive cows; all lame cows at days 7 and 60 presented hoof injuries

†† any type of injury not concomitant to the infectious type

††† concomitant non-infectious and infectious injuries

§ Injury severity: 1 = mild degree; 2 = moderate degree; and 3 = severe degree

<sup>a</sup> degree 3 injury were observed in 1 cow at days -60 and 7, and in 3 cows at day 60

<sup>b</sup> degree 3 injury were observed in 2 cows at day 7 and in 3 cows at day 60

Postpartum BCS loss was moderate in 50 cows (65.8%) and excessive in 26 (34.2%). The magnitude of BCS loss was not related to the occurrence of lameness, heel erosion, axial wall or white line fissures, and sole hemorrhage or erosion, on days -60 and 7. However, on day 60, lameness was more frequent ( $P = 0.017$ ) in cows that had excessive BCS loss (17/26, 65.4%) compared to those that had moderate BCS loss (17/50, 34.0%). There was a trend towards a higher frequency of axial wall fissure (20/26, 76.9%,  $P = 0.062$ ) and sole erosion (15/26, 57.7%,  $P = 0.081$ ) in cows with excessive loss of BCS compared to cows with moderate loss (26/50, 52.0% and 17/50, 34.0%, respectively).

Lame cows in the prepartum period had lower concentrations of BHB, cholesterol, Alb, BUN, and Mg (Table 4). Interactions were shown for cholesterol and Mg. Cholesterol was higher in non-lame cows on days 21 and 42 ( $4.00 \pm 0.86$  and  $5.19 \pm 1.30$  mmol/L, respectively) compared to lame cows ( $3.44 \pm 0.98$  and  $4.07 \pm 1.36$  mmol/L, respectively). Mg was higher, on days 7 and 21, in non-lame cows ( $0.91 \pm 0.15$  and  $0.99 \pm 0.14$  mmol/L, respectively) than in lame cows ( $0.77 \pm 0.16$  and  $0.91 \pm 0.15$  mmol/L, respectively).

Considering the presentation in the postpartum period, lame cows showed lower values of BCS, cholesterol, glucose, Alb, BUN, Ca and Mg (Table 4). Interactions were verified for cholesterol and glucose. Cholesterol was lower in lame cows on days -42 ( $2.80 \pm 1.10$  mmol/L), 7 ( $2.18 \pm 0.56$  mmol/L), 21 ( $3.36 \pm 0.82$  mmol/L) and 42 ( $4.168 \pm 1.38$  mmol/L), compared to non-lame cows ( $3.20 \pm 1.22$  mmol/L,  $2.71 \pm 0.67$  mmol/L,  $4.18 \pm 0.84$  mmol/L, and  $5.40 \pm 1.17$  mmol/L, respectively). On calving day, glucose was also lower in lame cows ( $4.81 \pm 2.04$  mmol/L vs.  $5.70 \pm 2.24$  mmol/L).

The pH of rumen fluid was lower ( $P < 0.001$ ) in lame ( $6.54 \pm 0.25$ ) than non-lame ( $6.71 \pm 0.31$ ) cows, as well as on day 7 ( $6.56 \pm 0.30$ ) compared to day 42 ( $6.74 \pm 0.24$ ).

**Table 3.** Associations between the presentation of lameness at days -60, 7, and 60 relative to calving in high-producing Holstein  $\times$  Gir cows and the presentation of pre- and postpartum metabolic disorders and of diseases in early lactation.

Occurrence	n	day -60	day 7	day 60
		16 lame cows <i>P</i>	21 lame cows <i>P</i>	34 lame cows <i>P</i>
BCS $\leq 2,75$	*	0.465	0.076	0.054
hoof injuries	**	0.007	ND	ND
prepartum NEB (NEFA $> 0.4$ mmol/L) <sup>†a</sup>	16	0.130	0.656	0.902
postpartum NEB (NEFA $> 0.7$ mmol/L) <sup>†a</sup>	31	0.070	0.850	0.443
SCH at calving (Ca $< 2.125$ mmol/L) <sup>b</sup>	43	0.014	0.536	0.012
prepartum albuminemia $< 30$ g/L <sup>†c</sup>	33	0.282	0.047	0.107
retained placenta	13	0.319	0.951	0.704
metritis	19	0.446	0.133	0.295
clinical endometritis at day 42	20	0.123	0.946	0.093
clinical mastitis up to day 60	22	0.950	0.679	0.712

total n: 80 cows on days -60 and 7, and 75 cows on day 60

\* 36 cows at day -60; 24 cows at day 7; and 47 cows at day 60

\*\* 53 cows at day -60; 76 cows at day 7; and 74 cows at day 60

ND: not determined; all lame cows at days 7 and 60 presented hoof injuries

<sup>†</sup> at any sampling time

cut-off points established by <sup>a</sup> Mcart et al. (2013); <sup>b</sup> Goff. (2014); <sup>c</sup> Rupprechter et al. (2018)

**Table 4.** Metabolic profile of high-yielding Holstein × Gir cows grouped by presentation of lameness in the prepartum period and in early lactation. Effect of group (G), effect of days relative to calving (D), and interaction between the two factors.

	Groups		SEM	<i>P</i> -value		
	non-lame*	lame*		G	D†	G × D
Prepartum Period (-60 days to calving)						
n	63	17				
BCS	3.11	2.91	0.03	0.054	<0.001	0.898
NEFA (mmol/L)	0.49	0.47	0.03	0.476	<0.001	0.980
BHB (mmol/L)	0.44	0.38	0.02	0.025	<0.001	0.091
Cholesterol ( mmol/L)	3.00	2.65	0.09	0.043	<0.001	<0.001
Glucose (mmol/L)	3.62	3.52	0.12	0.302	<0.001	0.423
AST (U/L)	71.06	69.71	2.83	0.707	<0.001	0.243
Protein (g/L)	77.08	77.26	4.65	0.961	0.015	0.911
Albumin (g/L)	34.31	31.61	0.63	<0.001	<0.001	0.740
BUN (mmol/L)	8.41	7.38	0.38	0.016	<0.001	0.628
Ca (mmol/L)	2.20	2.18	0.02	0.369	<0.001	0.344
P (mmol/L)	1.94	1.90	0.04	0.397	<0.001	0.578
Mg (mmol/L)	0.97	0.91	0.01	0.019	<0.001	0.028
Postpartum Period (calving to 60 days)						
n	51	29				
BCS	3.16	2.92	0.02	0.008	<0.001	0.155
NEFA (mmol/L)	0.49	0.49	0.02	0.997	<0.001	0.354
BHB (mmol/L)	0.43	0.43	0.02	0.929	<0.001	0.955
Cholesterol ( mmol/L)	3.12	2.60	0.08	<0.001	<0.001	<0.001
Glucose (mmol/L)	3.67	3.48	0.10	0.025	<0.001	0.039
AST (U/L)	69.19	73.63	2.43	0.144	<0.001	0.486
Protein (g/L)	78.05	75.76	3.95	0.477	<0.001	0.746
Albumin (g/L)	34.74	31.98	0.53	<0.001	<0.001	0.790
BUN (mmol/L)	9.22	7.62	0.32	0.014	<0.001	0.080
Ca (mmol/L)	2.21	2.18	0.02	0.027	<0.001	0.125
P (mmol/L)	1.19	1.90	0.03	0.413	<0.001	0.807
Mg (mmol/L)	0.97	0.93	0.01	0.030	<0.001	0.218

SEM: standard error of mean

BCS: body condition score

\* Healthy: locomotion score = 1; Lameness: locomotion score  $\geq 2$  in at least 2 consecutive times. The locomotion score and the BCS were evaluated at -60, -21, -7, 0, 7, 21, 42, and 60 days relative to calving.

† Blood samples were taken on -42, -21, -7, 0, 7, 21, and 42 days relative to calving.

## Discussion

The occurrence of lameness increased after calving, reinforcing previous observations in Holstein cows (Whay et al., 1997), and the presentation of moderate and severe lameness was higher at 60 DIM (6.6%). This frequency was lower than that reported in Holstein × Gir (16%) (Moreira et al., 2018) and Holstein cows (42.5%) (Costa et al., 2018). The frequency of mild lameness at 60 DIM (38.2%) was, in its turn, higher than that reported by Moreira et al. (2018) (18%). The low prevalence of lameness indicates good farm management and can be the result of the hoof trimming performed 2 months before the start of the study: however, a single hoof trimming does not always have a positive effect on cows with moderate lameness (García-Muñoz et al., 2017). The foot baths containing formaldehyde, used routinely in the studied herd, are considered one of the effective preventive measures for lameness (Greenough, 2007).

Hoof injuries also increased in early lactation, affecting almost all cows, and heel erosion was the most frequent injury. These results are similar to previous observations in Holstein × Gir cows (Moreira et al., 2018). Axial wall fissure also presented high occurrence in our study, which contrasts with the claim that it has low prevalence in Brazil (Borges et al., 2017). This type of injury is common in cows kept in pasture systems and is associated with long-distance walking on trails with abundant gravel (Somers and O’Grady, 2015). The studied cows were kept on a compacted dirt floor containing small stones, which could explain the high prevalence. However, the stones were present in relatively small quantities. As reported by Moreira et al. (2018), the sole ulcers were also prominent in the studied cows but were mainly lesions with a mild degree of severity.

Hoof injuries were associated with presentation of lameness. However, some cows showed hoof injuries but no changes in the LS, reinforcing that the LS may not be a sensitive indicator of the presence of all types of injuries (Tadich et al., 2010; Moreira et al.,

2018). The excessive postpartum loss of BCS was related to the occurrence of lameness at 60 DIM, tending to be associated with the occurrence of some hoof injuries. Low BCS in early lactation is a risk factor for the presentation of lameness in high-producing Holstein cows kept in confined (Hoedemaker et al., 2009; Ristevski et al., 2017) or in pasture (Alawneh et al., 2014) systems. This was also shown for Holstein × Gir cows (Moreira et al., 2019). Bicalho et al. (2009) found a direct relationship between BCS and the thickness of the digital cushion and demonstrated that the presentations of sole ulcer and white line disease were associated with decreased thickness of the digital cushion. However, the results of Newsome et al. (2017) indicate that despite this relationship, other predisposing factors, such as the integrity of the suspensory apparatus, calving, physiological and hormonal status, genetics, and the previous existence of hoof injuries, may be even more important.

No association was found between NEB and lameness, and the occurrence of subclinical ketosis was infrequent (8.7%), which could indicate that the cows presented a good energy balance. The concentrations of NEFA and BHB did not differ between lame and non-lame cows in the postpartum period, but BHB concentrations were higher in lame cows before calving. Since the concentration was lower than 1.2 mmol/L, which is considered the critical value indicator of subclinical ketosis (McArt et al., 2013), it can be assumed that the difference does not have biological importance. To date, there is poor information on the relationship between metabolic status and the presentation of lameness and hoof injuries. It was shown that cows with postpartum hoof injuries (Sepúlveda-Varas et al., 2018) and cows with severe lameness (Paiano et al., 2019) had higher concentrations of NEFA and BHB. In Holstein cows, it was shown that high milk yield, low BCS and high concentration of BHB are important risk factors for the occurrence of chronic lameness (Ristevski et al., 2017). NEFA and BHB are energy metabolite indicators of lipomobilization and high concentrations in the transition period are associated with a higher risk for some diseases (Allen and

Piantoni, 2013; McArt et al., 2013). However, there are no cutoff points related to the occurrence of lameness or hoof injuries.

The contrast between our results and those of these other researchers can probably be explained by the fact that most of the studied cows had mild lameness and a mild degree of hoof injuries. In contrast, (Ristevski et al., 2017) and (Paiano et al., 2019) studied cows with moderate to severe lameness and Sepúlveda-Varas et al. (2018) studied cows that had severe hoof injuries. In these situations, the involvement of energy metabolism could be more pronounced. Zhang et al. (2015) also found no differences in NEFA and BHB concentrations in cows with severe lameness compared to healthy cows in early lactation. However, the number of cows per group was very small.

In relation to cholesterol, the lame cows showed lower concentrations mainly in the postpartum period, which agrees with previous observations (Paiano et al., 2019). Cholesterol is considered an indicator of energy balance, especially in early lactation, since its concentration is positively related to dry matter intake (Cavestany et al., 2005). On the other hand, cows with postpartum diseases have lower concentrations (Sepúlveda-Varas et al., 2015; Rupprechter et al., 2018), which could reflect lower food intake. The effects of lameness or hoof injuries on cholesterol metabolism should be clarified. Cows with clinical laminitis have been shown to have higher expression of ApoA-IV apolipoprotein and HMGCR membrane glycoprotein, which are related to cholesterol transport and biosynthesis, respectively (Dong et al., 2015). It is uncertain whether this phenomenon also occurs in other digital diseases.

Holstein × Gir cows that showed lameness, before or after calving, showed slightly lower concentrations of Alb and BUN, but the TP did not differ from non-lame cows. Similar results for TP and Alb have already been reported in lame Holstein cows at the beginning of lactation (Paiano et al., 2019). In contrast, cows with chronic laminitis may have

lower concentrations of TP (Belge et al., 2004). Alb is a negative acute phase protein that can predict postpartum diseases when decreased before calving (Bertoni et al., 2008; Rupprechter et al., 2018). The concentrations of BUN, in turn, vary according to dietary protein and energy levels (Cavestany et al., 2005), and the synthesis of urea in the liver may be decreased due to the presence of various inflammatory processes at the beginning of lactation, which compromise liver functions (Bertoni et al., 2008). Therefore, the inflammatory nature of the injuries seen in the hooves could explain the results for Alb and BUN. Impaired liver function, if present, can be considered mild in the studied cows and was not accompanied by increased AST activity.

Regarding minerals, SCH at calving was the main imbalance observed in the studied cows and was associated with lameness at 60 DIM, but not at 7 DIM. We are unaware of other studies on the subject that can be compared. The biological importance of the observed relationship can be considered doubtful, since hypocalcemia is a transient imbalance close to calving, while the frequencies of lameness and hoof injuries gradually increase up to 60 days after calving. The concentrations of Ca and Mg were slightly lower in cows with lameness. Normally serum calcium is linked to protein, especially albumin, which can influence the total calcium serum concentration (Goff, 2014) and could explain our results since lame cows also had lower Alb concentrations, just as previously reported (Paiano et al., 2019). There are no other studies that have investigated Ca, Mg or P values in cows with lameness or hoof injuries. However, in Holstein  $\times$  Gir cows, serum Ca and Mg showed a positive correlation with hoof hardness and growth at the beginning of lactation, while serum P showed a negative correlation with hoof hardness (Casagrande, 2013). Ca and Mg participate in the synthesis of keratin, and the deficiencies of these minerals decrease the quality of the hoof (Greenough, 2007), which can result in a greater presentation of injuries and lameness. Despite the transient SCH, the studied cows maintained physiological serum

values of Ca, P and Mg and ingested sufficient amounts of these minerals, indicating that they were balanced.

Based on the pH values of the rumen fluid, it was shown that the studied cows did not present subacute ruminal acidosis (SARA), considered a primary cause of laminitis (Greenough, 2007). A pH value  $\leq 5.9$  confirms the diagnosis of SARA when the ruminal fluid is obtained through an oro-ruminal tube (Abdela, 2016). Although lame cows had a lower pH than non-lame cows, rumen fermentation disorder must be ruled out as a factor influencing the results.

This is one of the few studies that investigated the relationship between the metabolic profile and the occurrence of lameness or hoof injury, being the first with Holstein  $\times$  Gir cows, a breed suitable for tropical countries with high milk yield capacity. The variations in the metabolites throughout the prepartum transition period and the beginning of lactation were compatible with those already reported in Holstein (Cavestany et al., 2005) and Holstein  $\times$  Gir (Moreira et al., 2015) cows, which indicates that the studied cows remained reasonably balanced. Despite this, and although the majority of lameness cases were mild, the excessive loss of BCS after calving can contribute to the occurrence of lameness and hoof injuries at the beginning of lactation. Well-nourished cows with mild to moderate lameness may maintain a metabolic profile with little difference from cows without lameness. Further studies are needed to clarify whether there is a relationship between moderate to severe lameness and marked metabolic changes in high-yielding Holstein  $\times$  Gir cows.

### **Ethics Committee**

This project was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of the Universidade Estadual de Londrina, Brazil, under protocol number 24111.2017.23, and was carried out in accordance with Brazilian law and guidelines of National Council for Animal Experiment Control (CONCEA).

## References

- Abdela, N., 2016. Sub-acute Ruminant Acidosis (SARA) and its Consequence in Dairy Cattle: A Review of Past and Recent Research at Global Prospective Achievements in the Life Sciences, 10, 187–196
- Alawneh, J.I., Stevenson, M.A., Williamson, N.B., Lopez-Villalobos, N. and Otley, T., 2014. The effects of liveweight loss and milk production on the risk of lameness in a seasonally calving, pasture fed dairy herd in New Zealand Preventive Veterinary Medicine, doi: 10.1016/j.prevetmed.2013.10.010
- Allen, M.S. and Piantoni, P., 2013. Metabolic control of feed intake. Implications for metabolic disease of fresh cows. Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice, 29, 279–297
- Belge, F., Bildik, A., Belge, A., Kiliçalp, D. and Atasoy, N., 2004. Possible association between chronic laminitis and some biochemical parameters in dairy cattle. Australian Veterinary Journal, 82, 556–557
- Bertoni, G., Trevisi, E., Han, X. and Bionaz, M., 2008. Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows. Journal of Dairy Science, 91, 3300–3310
- Bicalho, R.C., Machado, V.S. and Caixeta, L.S., 2009. Lameness in dairy cattle: A debilitating disease or a disease of debilitated cattle? A cross-sectional study of lameness prevalence and thickness of the digital cushion. Journal of Dairy Science, 92, 3175–3184
- Borges, J.R., Câmara, A.C., Moscardini, A.R., Rodrigues, C.A., Pitombo, C.A., Graça, F.A., Silva, I. A., Silva, P.C., Cunha, P.H., Vianna, R.B., Rabelo, R.E. and Ollhoff, R.D., 2017. Doenças dos dígitos dos bovinos: nomenclatura padronizada para o Brasil. CFMV, 73, 45–52
- Casagrande, F.P., 2013. Perfil metabólico e mineral de vacas no período peri-parto: qualidade

- e conformação dos cascos. (Universidade Federal de Minas , Belo Horizonte, MG, Brazil.)
- Cavestany, D., Blanc, J.E., Kulcsar, M., Uriarte, G., Chilbroste, P., Meikle, A., Febel, H., Ferraris, A. and Krall, E., 2005. Studies of the transition cow under a pasture-based milk production system: Metabolic profiles. *Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine*, 52, 1–7
- Charfeddine, N. and Pérez-Cabal, M.A., 2017. Effect of claw disorders on milk production, fertility, and longevity, and their economic impact in Spanish Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 100, 653–665
- Costa, J.H.C., Burnett, T.A., von Keyserlingk, M.A.G. and Hötzel, M.J., 2018. Prevalence of lameness and leg lesions of lactating dairy cows housed in southern Brazil: Effects of housing systems. *Journal of Dairy Science*, 101, 2395–2405
- Dong, S.W., Zhang, S.D., Wang, D.S., Wang, H., Shang, X.F., Yan, P., Yan, Z.T. and Yang, Z.Q., 2015. Comparative proteomics analysis provide novel insight into laminitis in Chinese Holstein cows. *BMC Veterinary Research*, 11, 161
- Ferguson, J.D., Galligan, D.T. and Thomsen, N., 1994. Principal Descriptors of Body Condition Score in Holstein Cows *Journal of Dairy Science*, 77, 2695–2703
- García-Muñoz, A., Singh, N., Leonardi, C. and Silva-del-Río, N., 2017. Effect of hoof trimmer intervention in moderately lame cows on lameness progression and milk yield. *Journal of Dairy Science*, 100, 9205–9214
- Goff, J.P., 2014. Calcium and Magnesium Disorders. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 30, 359–382
- Greenough, P.R., 2007. *Bovine Laminitis and Lameness*, 1st ed. Saunders Elsevier (ed), (Edinburgh)
- Hoedemaker, M., Prange, D. and Gundelach, Y., 2009. Body condition change ante- and

- postpartum, health and reproductive performance in German Holstein Cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 44, 167–173
- ICAR, 2015. *Claw Health Atlas*, (Roma, Italy)
- Liang, D., Arnold, L.M., Stowe, C.J., Harmon, R.J. and Bewley, J.M., 2017. Estimating US dairy clinical disease costs with a stochastic simulation model. *Journal of Dairy Science*, 100, 1472–1486
- McArt, J.A.A., Nydam, D. V., Oetzel, G.R., Overton, T.R. and Ospina, P.A., 2013. Elevated non-esterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate and their association with transition dairy cow performance. *Veterinary Journal*, 198, 560–570
- Miguel-Pacheco, G.G., Thomas, H.J., Huxley, J.N., Newsome, R.F. and Kaler, J., 2017. Effect of claw horn lesion type and severity at the time of treatment on outcome of lameness in dairy cows. *Veterinary Journal*, 225, 16–22
- Moreira, T.F., Facury Filho, E.J., Meneses, R.M., Mendonça, F.L.M., Lima, J.A.M. and Carvalho, A.U., 2015. Energetic status of crossbreed dairy cows during transition period in two different seasons *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, 67, 1327–1334
- Moreira, T.F., Nicolino, R.R., de Andrade, L.S., Filho, E.J.F. and de Carvalho, A.U., 2018. Prevalence of lameness and hoof lesions in all year-round grazing cattle in Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, 50, 1829–1834
- Moreira, T.F., Nicolino, R.R., Meneses, R.M., Fonseca, G. V., Rodrigues, L.M., Facury Filho, E.J. and Carvalho, A.U., 2019. Risk factors associated with lameness and hoof lesions in pasture-based dairy cattle systems in southeast Brazil. *Journal of Dairy Science*, 102, 10369–10378
- Newsome, R.F., Green, M.J., Bell, N.J., Bollard, N.J., Mason, C.S., Whay, H.R. and Huxley, J.N., 2017. A prospective cohort study of digital cushion and corium thickness. Part 1:

- Associations with body condition, lesion incidence, and proximity to calving. *Journal of Dairy Science*, 100, 4745–4758
- Paiano, R.B., Birgel, D.B., Ollhoff, R.D. and Birgel Junior, E.H., 2019. Biochemical Profile and Productive Performance in Dairy Cows with Lameness During Postpartum Period. *Acta Scientiae Veterinariae*, 47, 1673–1680
- Ristevski, M., Toholj, B., Cincović, M., Trojačanec, P., Starič, J. and Smolec, O., 2017. Milk production, body condition score and metabolic parameters at the peak of lactation as risk factors for chronic lameness in dairy cows. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 23, 721–727
- Rupprechter, G., Adrien, M. de L., Larriestra, A., Meotti, O., Batista, C., Meikle, A. and Noro, M., 2018. Metabolic predictors of peri-partum diseases and their association with parity in dairy cows. *Research in Veterinary Science*, 118, 191–198
- Santana, M.L., Pereira, R.J., Bignardi, A.B., El Faro, L., Tonhati, H. and Albuquerque, L.G., 2014. History, structure, and genetic diversity of Brazilian Gir cattle. *Livestock Science*, 163, 26–33
- Sepúlveda-Varas, P., Lomb, J., von Keyserlingk, M.A.G., Held, R., Bustamante, H. and Tadich, N., 2018. Claw horn lesions in mid-lactation primiparous dairy cows under pasture-based systems: Association with behavioral and metabolic changes around calving. *Journal of Dairy Science*, 101, 9439–9450
- Sepúlveda-Varas, P., Weary, D.M., Noro, M. and Von Keyserlingk, M.A.G., 2015. Transition diseases in grazing dairy cows are related to serum cholesterol and other analytes. *PLoS ONE*, 10
- Somers, J. and O'Grady, L., 2015. Foot lesions in lame cows on 10 dairy farms in Ireland. *Irish Veterinary Journal*, 68, 1–7
- Sprecher, D.J., Hostetler, D.E. and Kaneene, J.B., 1997. A lameness scoring system that uses

posture and gait to predict dairy cattle reproductive performance. *Theriogenology*, 47, 1179–1187

Tadich, N., Flor, E. and Green, L., 2010. Associations between hoof lesions and locomotion score in 1098 unsound dairy cows. *Veterinary Journal*, 184, 60–65

Whay, H.R. and Shearer, J.K., 2017. The Impact of Lameness on Welfare of the Dairy Cow. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 33, 153–164

Whay, H.R., Waterman, A.E. and Webster, A.J.F., 1997. Associations between locomotion, claw lesions and nociceptive threshold in dairy heifers during the peri-partum period. *Veterinary Journal*, 154, 155–161

Zhang, G., Hailemariam, D., Dervishi, E., Deng, Q., Goldansaz, S.A., Dunn, S.M. and Ametaj, B.N., 2015. Alterations of innate immunity reactants in transition dairy cows before clinical signs of lameness. *Animals*, 5, 717–747

## 6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Nos últimos anos a produção de leite individual tem aumentado devido especialmente à seleção genética. A vaca Holandês x Gir é parte dessa realidade, com aumento da sua produção leiteira e demanda metabólica. Nesta tese foi abordado o comportamento metabólico das vacas Holandês x Gir de alta produção analisando diferentes aspectos que mudam o comportamento metabólico em outras raças como a Holandês. Além disso, a abordagem da influência do metabolismo na apresentação de lesões do casco e claudicações e vice-versa é um tema que ainda tem carência de estudos.

Os cruzamentos de zebu e Holandês produzem perto de 80% do leite do Brasil, sendo a mais importante para este fim as vacas Holandês x Gir. A rusticidade e adaptabilidade às condições tropicais fazem que seja um animal com menor estresse calórico e podendo ser mantido em instalações menos sofisticadas que as requeridas por vacas Holandês.

Os estudos de metabolismo no período de transição da vaca Holandês x Gir geralmente são de vacas com produções de 12 a 18 l. No entanto, já existem muitas vacas Holandês x Gir com produção similar de vacas Holandês. No mundo existem numerosos estudos sobre o ECC e a relação com apresentação de doenças no pós-parto em vacas Holandês e alguns marcadores metabólicos como AGNE e BHB que poderiam prever doenças no pós-parto. Entretanto, os valores poderiam ser diferentes dependendo da região e raça. Em nosso trabalho, apesar de muitas vacas apresentarem valores elevados de AGNE no pré-parto, não apresentaram associação entre as doenças no pós-parto, sendo necessários estudos que estabeleçam novos pontos de corte para as vacas Holandês x Gir.

Em nosso trabalho foi encontrado que mesmo sendo vacas de alta produção, estas apresentam menos desordens metabólicas que o reportado em vacas Holandês. Isto pode ser ocasionado por um bom manejo na fazenda onde o estudo foi realizado, ou todas as vacas Holandês x Gir de alta produção poderiam ser consideradas metabolicamente superiores, no entanto, é necessário mais fazendas com Holandês x Gir de alta produção para determinar a prevalência de doenças pós-parto e desequilíbrios metabólicos.

Quanto às claudicações e lesões de casco, já era estabelecido associação entre o ECC e a posterior apresentação de lesões e claudicação em

vacas Holandês. As claudicações são um dos maiores problemas que acometem as vacas leiteiras. A compreensão da fisiopatologia e das relações destas com o metabolismo foi a temática que tentamos trabalhar para poder contribuir com estratégias futuras de controle. Poucos estudos relacionando os parâmetros metabólicos com a posterior apresentação de claudicação ou lesão de casco são encontrados. No entanto, trabalhos encontrados demonstram que existe associação. Porém, é importante avaliar vacas com diferentes scores de locomoção e estabelecer a influência do número de lactações nesta associação.

Estudos populacionais e controlados também são necessários para corroborar os benefícios metabólicos e a saúde de vacas Holandês x Gir de alta produção de leiteira em países tropicais.

## 7 CONCLUSÕES

As vacas Holandês x Gir de alta produção mantidas em sistema de confinamento aberto em condições climáticas tropicais são competentes para manter o equilíbrio metabólico no final da gestação e no início da lactação, independentemente do ECC no parto (baixa, normal ou alta), do grau de cruzamento ou do volume de leite produzido, quando são alimentadas de forma adequada.

Mudanças de ECC no período seco, o grau de sangue e a produção de leite em vacas Holandês x Gir de alta produção não apresentaram associação com a ocorrência de doenças e desequilíbrios metabólicos no início da lactação.

Apresentação de lesões do casco em vacas Holandês x Gir de alta produção não é influenciada por apresentação de doenças ou desequilíbrios metabólicos. No entanto, apresentação de claudicação no pós-parto se relaciona com a perda excessiva de ECC.

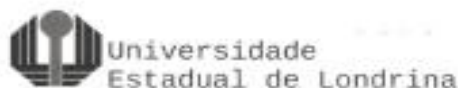
O perfil metabólico em vacas Holandês x Gir de alta produção é similar, geralmente, entre vacas com claudicação e sem claudicação, sendo que as concentrações de colesterol, albumina, BUN e magnésio foram maiores nas vacas sem claudicação.

As vacas Holandês x Gir deste estudo mostraram boa adaptação metabólica, sendo o desequilíbrio mais frequente a hipocalcemia subclínica no parto. O BEN pré-parto não estava relacionado à apresentação de doenças pós-parto, por isso é importante estudar no futuro se esse comportamento se repete e determinar pontos de corte para a determinação do BEN em vacas Holandês x Gir

**APÊNDICE**

## APÊNDICE A

## Aprovação do CEUA dos artigos A e B



Universidade  
Estadual de Londrina

## COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 05/2018

Londrina, 23 de janeiro de 2018.

Prezado (a) professor (a)

Certificamos que o projeto intitulado: "Efeito das mudanças da condição corporal durante o período seco sobre o balanço energético e a ocorrência de lesões do casco em vacas Holandesas e Girolando no início da lactação." Protocolo CEUA nº 24111.2017.23 sob a responsabilidade de **Julio Augusto Naylor Lisboa**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UUEL), em reunião realizada em **22/01/2018**.

O objetivo é estudar o comportamento do perfil metabólico de vacas Holandesas e Girolando de alta produção no período de transição, verificando a sua relação com a variação da condição corporal no período seco e com a ocorrência de lesões do casco e claudicação no início da lactação. Grau de invasividade=1

Vigência do Projeto	01/02/2018 a 31/12/2020
Espécie/inhagem	Vacas Holandesas e Girolando
Nº de animais	160
Peso/idade	Adultas/560 kg
Sexo	Fêmeas
Origem	Fazenda, propriedades rurais em Minas Gerais/MG
Amostras a serem coletadas	Sangue, líquido ruminal

Cumprir orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UUEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição, para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente.

*Maria Fernanda R. Graciano*  
Prof. Dra. Maria Fernanda Rodrigues Graciano  
Coordenadora da CEUA/UUEL

Ilmo.(a) Sr.(a)  
**Prof. (a) Dr (a). Julio Augusto Naylor Lisboa**  
Responsável pelo projeto  
Departamento de Clínicas Veterinárias/CCA

C/C para o HV/CCA  
C/C para a Chefe do Depto de Clínicas Veterinária/CCA  
C/C para a Direção de Centro do CCA

**ANEXOS**

## Anexo A -

**Table 1. (Supplement artigo B).** Associations between the presentation of lameness or hoof injuries and the loss of BCS from calving to 60 days in milk in high-yielding Holstein x Gir cows

Loss of BCS		≤0.5 (n=50)	≥0.75 (n=26)	<i>P-value</i>
day -60				
lameness	with	9	5	0.856
	without	41	21	
hoof injuries	with	31	19	0.477
	without	19	7	
heel erosion	with	11	5	0.987
	without	39	21	
axial wall fissure	with	13	12	0.129
	without	37	14	
white line fissure	with	7	5	0.793
	without	43	21	
sole hemorrhage	with	7	2	0.664
	without	43	24	
day 7				
lameness	with	14	6	0.851
	without	36	20	
heel erosion	with	17	13	0.266
	without	33	13	
axial wall fissure	with	25	14	0.939
	without	25	12	
white line fissure	with	31	19	0.477
	without	19	7	
sole hemorrhage	with	9	3	0.705
	without	41	23	
sole ulcer	with	6	2	0.852
	without	44	24	
day 60				
lameness	with	17	17	0.017
	without	33	9	
heel erosion	with	38	14	0.087
	without	12	12	
axial wall fissure	with	26	20	0.062
	without	24	6	
white line fissure	with	18	8	0.840
	without	32	18	
sole hemorrhage	with	9	9	0.183
	without	41	17	
sole ulcer	with	17	15	0.081
	without	33	11	