RODRIGO GARDINAL

**Efeito da suplementação prolongada de grão de soja cru e integral no pré-parto sobre o
desempenho produtivo, qualidade oocitária e embrionária, e função imune de vacas
leiteiras**

Pirassununga

2016

RODRIGO GARDINAL

**Efeito da suplementação prolongada de grão de soja cru e integral no pré-parto sobre o
desempenho produtivo, qualidade oocitária e embrionária, e função imune de vacas
leiteiras**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Nutrição e Produção Animal da Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de Concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Francisco Palma Rennó

Pirassununga

2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3278
FMVZ

Gardinal, Rodrigo
Efeito da suplementação prolongada de grão de soja cru e integral no pré-parto sobre o desempenho produtivo, qualidade oocitária e embrionária, e função imune de vacas leiteiras / Rodrigo Gardinal. -- 2016.
174 f. il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Palma Rennó.

1. Ácidos graxos. 2. Início de lactação. 3. Período de transição. 4. Balanço energético negativo.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação comparativa da suplementação de ácidos graxos saturados e insaturados sobre o desempenho produtivo, qualidade oocitária e embrionária, e metabolismo de vacas leiteiras no período de transição e início de lactação", protocolado sob o nº 2966/2013, utilizando 36 (trinta e seis) bovinos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Francisco Palma Rennó, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 10/4/2013.

We certify that the Research "Comparative evaluation of saturated and unsaturated fatty acids supplementation during transition period and early lactation on productive performance, oocyte and embryo quality, and metabolism of dairy cows", protocol number 2966/2013, utilizing 36 (thirty-six) dairy cows, under the responsibility Prof. Dr. Francisco Palma Rennó, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 4/10/2013.

São Paulo, 15 de abril de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: GARDINAL, Rodrigo

Título: Efeito da suplementação prolongada de grão de soja cru e integral no pré-parto sobre o desempenho produtivo, qualidade oocitária e embrionária, e função imune de vacas leiteiras

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho as pessoas que sempre me apoiaram tanto nas horas boas e, principalmente, nas ruins, que sempre me estenderam as mãos, me aconselharam, me incentivaram, me mostraram o caminho certo, fizeram cada dia da minha vida um grande motivo para se viver e querer viver mais e mais ao lado dessas pessoas, que a cima de tudo sempre quiseram a minha felicidade, e que tenho certeza que não mediram e nunca medirão esforços para que isto ocorresse, que mesmo estando longe, sempre estavam comigo, nem que fosse em pensamentos. Essas pessoas são meus familiares, em especial, a minha mãe Maria Tereza, meu pai Odair (in memoriam), meu irmão Claudemir, meu Tio Bila, minha tia Maria José e minha namorada Lea....

..... Vocês moram no meu coração !!!!!!!

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer antes de tudo à Deus, que é a motivação intrínseca das minhas conquistas, o qual me guia e fortalece.

À Universidade de São Paulo, a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, e ao Departamento de Nutrição e Produção Animal pela oportunidade de realização deste curso.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudo e apoio a esta pesquisa.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Francisco Palma Rennó, pela orientação, pela confiança, pelos ensinamentos, discussões acadêmicas, por sempre me enxergar como um colega de profissão e não somente como um simples aluno, possibilitando assim, a geração dos resultados, que hoje, apresento.

À minha mãe, Maria Tereza, por todo apoio, carinho, esforço, e toda confiança depositada em mim, pois sei que não mediu, em momento algum, o esforço que tanto faz para me ajudar. Obrigado mamãe!

Ao meu pai, Odair (*in memoriam*), por todo apoio e compreensão, que mesmo dentro de nossas dificuldades, tenho certeza que sempre esteve ao meu lado. Obrigado Seu Oda!

Ao meu Tio Bila, pessoa que considero como um pai, que também nunca mediu esforço em nenhum momento para ver minha formação e minha felicidade. Obrigado Tio Bila, essa conquista tem grande parte de seu suor também.

Ao meu irmão Claudemir e minha cunhada Fabiana, que mesmo estando longe se preocuparam, apoiaram, incentivaram e ajudaram em todas as minhas decisões.

À minha namorada Lea, pela dedicação, paciência, carinho, apoio, amor, estando ao meu lado nas horas boas e ruins, sempre incentivando. Obrigado por fazer parte de minha vida e ajuda nesse trabalho.

À Jade (Gorda) pelo carinho, amor e companheirismo.

À Dna Dete pela atenção, acolhimento, paciência, respeito e pelos almoços saborosos. Obrigado...

Agradeço a toda família Calomeni e Delfino. Tio Cláudio e Tia Ligia vocês fizeram da minha vida em Pirassununga tudo mais fácil me dando tudo o que eu precisasse... Parte de tudo isso tem, com certeza, as mãos de vocês..... Amo vocês...

Agradeço ao Gustavo Calomeni, amigo, parceiro e com certeza acima de tudo um irmão. Pessoa esta que sem duvida nenhuma, fez com que tudo ficasse mais fácil para esta minha conquista. Se fosse agradecer tudo o que fez e tem feito por mim, com certeza, precisaria dobrar o número de páginas dessa tese. Mas do fundo do meu coração obrigado por ser essa pessoa que você é, e a cima de tudo, obrigado por ser meu amigo. Valeu meu Brother....

Agradeço ao meu outro brother e sua família... Tiago Tomazi (Gaúcho), pela amizade, ajuda, acolhimento, apoio e pelos grandes momentos de risadas. Valeu meu querido...

Agradeço todos os meus amigos pirassununguenses.... Pessoal do XutaQéMacumba Futebol Clube por toda ajuda, risada e momentos juntos, vocês fazem minha pirassununga cada vez mais divertida.

A minha querida amiga, salve, salve, Nara Regina (Hilária), pessoa esta que tenho um carinho enorme. Hilária você é demais.

Agradeço a toda a equipe de pós e ex-pós do LPBL, Jefinho, José Esler, Rafael Barleta (Bizão), Rodolfo (Badá), Vitor, Lenita, Cibelly, Gustavo (Xará), Caio (Bumba), Catimbó, Filipe (Galderi), Piracicaba, Elmelson, Pablo, que sempre me ajudaram, que sempre estiveram no LPBL, com chuva ou com sol, sábado ou domingo em especial àqueles que fizeram desse trabalho uma realidade. Obrigado

Ao Laboratório de Imunodiagnóstico do Departamento de Clínica Médica (LI-VCM-FMVZ-USP) e responsáveis e colaboradores pelo apoio, ajuda e dedicação, em especial a Prof^ª. Dr^ª. Alice Maria Melville Paiva Della Libera, Dr. Camila Freitas Batista e Dr. Heloisa Godoi Bertagnon.

Aos companheiros, parceiros, amigos e agregados da Piramodels pelos momentos inesquecíveis. Em especial aos amigos: Caio Lucas, Xibungo, Frodo, Perna, Mateus Orlandin, Camila, Flavinho.

A todos os professores do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP), aos professores do VRA, em especial ao Prof. Rubens, Prof. Ed Hoffman e a Profa. Annelise e ao Prof. Arlindo Saran Netto da FZEA.

Aos funcionários do VNP, da fábrica de ração da PCAPS, Estábulo leiteiro da PCAPS.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Agradeço a todos que de uma forma ou de outra me ajudaram, me ajuda, que fizeram ou fazem parte dessa minha jornada e que com certeza estou esquecendo.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem
foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

RESUMO

GARDINAL, R. **Efeito da suplementação prolongada de grão de soja cru e integral no pré-parto sobre o desempenho produtivo, qualidade oocitária e embrionária, e função imune de vacas leiteiras.** [Effect of prolonged supplementation with raw whole soybean during prepartum on productive performance, oocyte and embryo quality, and immune function of dairy cows]. 2016. 174 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

Objetivou-se avaliar o efeito da suplementação prolongada de grão de soja cru e integral (GSI) como fonte de ácido graxo $\omega 6$ sobre o desempenho produtivo, perfil metabólico, qualidade oocitária e embrionária e função imune de vacas leiteiras no período de transição e início de lactação. Foram selecionadas 44 vacas da raça Holandesa, múltiparas e gestantes, com parto previsto para 90 dias após o início da avaliação e fornecimento das dietas experimentais, porém em razão da ocorrência de enfermidades metabólicas ou infecciosas (3 abortos; 3 deslocamentos de abomaso; 3 enfermidades podais; 4 distocias) 13 animais foram retirados do experimento. As vacas foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos experimentais diferindo entre eles o início do fornecimento de grão de soja cru e integral (GSI) durante o pré-parto. A dieta era baseada na inclusão de 12% de GSI %MS, com aproximadamente 5,1% de extrato etéreo (EE) o início de seu fornecimento foi conforme descrito a seguir: Grupo 0: Animais não receberam dieta contendo GSI no pré-parto; Grupo 30: Início do fornecimento de dieta com GSI nos 30 dias finais da gestação; Grupo 60: Início do fornecimento de dieta com GSI nos 60 dias finais da gestação; Grupo 90: Início do fornecimento de dieta com GSI nos 90 dias finais da gestação. Após o parto, todas as vacas receberam dieta única com 5,1% de EE, baseada na inclusão de 12% de GSI %MS até 90 dias de lactação. Os animais foram arraçoados de acordo com o consumo de matéria seca no dia anterior, de forma a ser mantido porcentual de sobras das dietas, diariamente, entre 5 e 10%. As amostras dos alimentos e sobras foram coletadas diariamente e armazenadas a -20°C . Semanalmente as amostras coletadas diariamente foram misturadas e foi retirada uma amostra composta referente a um período de uma semana, a fim de mensurar o consumo de matéria seca e nutrientes. Amostras de fezes foram coletadas nos dias -56, -21, 21, 56 e 84 dias em relação ao parto, com o propósito de mensurar a digestibilidade da matéria seca e nutrientes. A produção de leite foi mensurada diariamente e para a composição dos teores de gordura, proteína, lactose e perfil de ácidos graxos amostras foram coletadas semanalmente. As amostras de sangue para análise dos metabólitos sanguíneos foram coletadas semanalmente. Amostras de sangue para mensurar a atividade do sistema imune foram coletadas na semanas

-8, -4, -2, -1 em relação ao parto, parto, +1, +2, +4 e +8 semanas no período pós-parto. Nos dias 21, 42, 63 e 84 do período pós-parto foram realizadas aspirações foliculares, com posterior fertilização *in vitro* dos oócitos. Todas as variáveis mensuradas foram analisadas pelo procedimento PROC MIXED do SAS 9.4 através de regressão polinomial, utilizando efeito fixo de tratamento, semana, interação tratamento*semana e efeito de animal dentro de tratamento como aleatório. Utilizou nível de 5% de significância. Foi observado efeito ($P<0,05$) linear crescente para CEE no pré-parto. Não foi observado diferenças no CMS e nutrientes no pós-parto. Não houve alteração da digestibilidade nos períodos pré e pós-parto. Não houve alteração no balanço de energia e nitrogênio nos períodos pré e pós-parto. Não foi observado diferença na produção, composição e teor dos componentes totais do leite. No perfil de ácidos graxos do leite houve efeito ($P<0,05$) linear decrescente para as concentrações de C16:1*cis*, C18:1 *cis*, total de C:18 insaturado, total de AG monoinsaturados, insaturados e a relação do total de AGS:AGI. Foi observado efeito linear ($P<0,05$) crescente para o total de AG saturado e efeito ($P<0,05$) quadrático para C18:2, CLA*cis9-trans11*, e total de AGPI. Foi observado efeito linear crescente ($P<0,05$) para colesterol total, LDL no pré-parto e linear decrescente ($P<0,05$) para GGT nos períodos pré e pós-parto. Foi observado efeito quadrático ($P<0,05$) para HDL no pré-parto e AST no pós-parto. Em relação a atividade do sistema imune foi observado efeito linear ($P<0,05$) crescente para o percentual de CD3⁺ ativos no pós-parto, para o percentual de monócitos que produziram espécie reativa de oxigênio (ERO) no pós-parto quando foram estimulados por *S.aureus* e *E.coli* e para a intensidade de imunofluorescência de ERO para granulócitos no pós-parto quando estimulados por *S.aureus*. Foi observado efeito ($P<0,05$) quadrático para o percentual de granulócitos, mononucleares, CD8⁺ ativos no pós-parto e para o percentual de granulócitos que produziram ERO no pós-parto quando estimulados por *E.coli*. A suplementação prolongada com GSI no pré-parto melhora a atividade do sistema imune, não melhora a qualidade oocitária e embrionária bem como não influencia negativamente os parametros produtivos de vacas leiteiras no período de transição e início de lactação.

Palavras-chave: Ácidos graxos. Início de lactação. Período de transição. Balanço energético negativo.

ABSTRACT

GARDINAL, E. **Effect of prolonged supplementation with raw whole soybean during prepartum on productive performance, oocyte and embryo quality, and immune function of dairy cows.** [Efeito da suplementação prolongada de grão de soja cru e integral no pré-parto sobre o desempenho produtivo, qualidade oocitária e embrionária, e função imune de vacas leiteiras]. 2016. 174 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

The objective was to evaluate the effect of prolonged supplementation with whole soybean grain (WSG) as a source of $\omega 6$ fatty acid on the productive performance, metabolic profile, oocyte and embryo quality, and immune function of dairy cows during the transition period and early lactation. Forty-four multiparous, pregnant Holstein cows, with calving predicted to 90 days after the beginning of the evaluation and supply of the experimental diets were selected. However, due to the occurrence of metabolic or infectious disorders (3 abortions, 3 displaced abomasums, 3 foot disorders, 4 dystocias), 13 animals were removed from the experiment. Cows were randomly assigned to one of four experimental groups, which differed in period of supply of whole soybean grains during the prepartum. The diet was based on 12% of WSG (%DM) and had approximately 5.1% of ether extract (EE). Diet supply was as follows: Group 0) control diet not containing WSG; Group 30) WSG supply starting 30 days before predicted calving date; Group 60) WSG supply starting 60 days before predicted calving; Group 90) WSG supply starting 90 days before predicted calving date. After calving, all cows received a single diet with 5.1% EE, based on inclusion of 12% WSG (%DM) until 90 days of lactation. Animals were fed *ad libitum* to ensure between 5 and 10%orts daily. Dry matter and nutrients intake were evaluated. Samples of feeds and orts were collected daily and stored at -20°C. Samples were composited weekly and analyzed for chemical and bromatological characteristics. Feces samples were collected on days -56, -21, 21, 56, 84 (related to the predicted calving), in order to measure the digestibility of dry matter and nutrients. Milk yield was measured daily and milk samples were collected weekly for evaluation of fat, protein and lactose percentages, and fatty acids profile. Blood samples were taken weekly for analysis of blood metabolites. To measure the activity of the immune system, blood samples were collected at weeks -8, -4, -2, -1 prepartum, at calving, and at weeks +1, +2, +4, +8 postpartum. On days 21, 42, 63 and 84 postpartum, follicular aspirations were performed, with subsequent in-vitro fertilization of the oocytes. All measured variables

were analyzed using PROC MIXED of SAS 9.4 through polynomial regression, considering as fixed effects the dietary treatment, week and interaction treatment*week, and animal as random effect. The 5% level of significance was considered. A crescent linear effect was observed ($P < 0.05$) for prepartum ether extract intake. There was no difference in dry matter and nutrients intake during the postpartum period. There were no differences in digestibility pre and postpartum. No difference in energy and nitrogen balance during pre and postpartum periods was observed. Milk production and composition did not differ among dietary treatments. When evaluating the milk fatty acids profile, a decreasing linear effect was noted ($P < 0.05$) for the concentrations of C16:1 *cis*, C18:1 *cis*, total unsaturated C18, total monounsaturated fatty acids, total unsaturated fatty acids and total SFA:UFA ratio. There was an increasing linear effect ($P < 0.05$) for the total of saturated fatty acids and a quadratic effect ($P < 0.05$) for C18:2, CLA *cis9-trans11*, and total PUFA. It was observed increasing linear effect ($P < 0.05$) for total cholesterol and LDL in the prepartum period, and decreasing linear effect ($P < 0.05$) for GGT in the pre and postpartum. We observed a quadratic effect ($P < 0.05$) for HDL in prepartum and for AST during the postpartum. Regarding the activity of the immune system, there was a crescent linear effect ($P < 0.05$) for the percentage of active CD3⁺ in the postpartum period, for the percentage of monocytes producing reactive oxygen species (ROS) during postpartum period when stimulated by *S. aureus* and *E. coli*, and for granulocytes ROS immunofluorescence intensity during postpartum when stimulated by *S. aureus*. Quadratic effect was observed ($P < 0.05$) for the percentage of granulocytes, mononuclear cells, active CD8⁺ in the postpartum period and the percentage of granulocytes that produced ROS when stimulated by *E. coli*. Prolonged supplementation with RWS in the prepartum improves the activity of the immune system, however it does not improve oocyte and embryo quality and does not adversely affect the production performance of dairy cows during the transition period and early lactation.

Keywords: Fatty acids. Early lactation. Transition period. Negative energy balance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema do metabolismo de ácidos graxos não esterificados em vacas leiteiras ...	29
Figura 2 - Etapas bioquímicas para biohidrogenação de ácido linoleico e linolênico no rúmen. Onde, A: microrganismos do grupo A; B: microrganismos do grupo B	33
Figura 3 - Consumo de matéria seca (kg/dia) nos períodos pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais	91
Figura 4 - Consumo de matéria seca em porcentagem peso vivo (%PV) nos períodos pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais	92
Figura 5 - Consumo de extrato etéreo (EE; kg/dia) nos períodos pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais. INT.: Semanas -4, -3, -2 e -1 (0 ^a vs. 30 ^b vs. 60 ^b vs. 90 ^b ; P<0,05)	93
Figura 6 - Coeficiente de digestibilidade da matéria seca nos períodos pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais	97
Figura 7 - Coeficiente de digestibilidade da proteína bruta nos períodos pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais	97
Figura 8 - Coeficiente de digestibilidade do extrato etéreo nos períodos pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais	98
Figura 9 - Coeficiente de digestibilidade do FDN nos períodos pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais	98
Figura 10 - Balanço de energia, nos períodos pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais	101
Figura 11 - Excreção de nitrogênio urinário, nos períodos pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais	103
Figura 12 - Nitrogênio absorvido, nos períodos pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais	104
Figura 13 - Consumo de nitrogênio, nos períodos pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais	105
Figura 14 - Produção de leite, no pós-parto de acordo com os grupos experimentais	108
Figura 15 - Produção de leite corrigida, no pós-parto de acordo com os grupos experimentais	108
Figura 16 - Teor de gordura, no pós-parto de acordo com os grupos experimentais	109
Figura 17 - Produção de gordura, no pós-parto de acordo com os grupos experimentais	109

Figura 18 - Teor de proteína, no pós-parto de acordo com os grupos experimentais	110
Figura 19 - Produção de proteína, no pós-parto de acordo com os grupos experimentais.....	110
Figura 20 - Produção de lactose, no pós-parto de acordo com os grupos experimentais.....	111
Figura 21 - Produção de lactose, no pós-parto de acordo com os grupos experimentais.....	111
Figura 22 - Concentração de C18:1 <i>cis</i> -9 no período pós-parto de acordo com os grupos experimentais	116
Figura 23 - Concentração de C18:2 <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 no período pós-parto de acordo com os grupos experimentais	117
Figura 24 - Concentração de CLA <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 no período pós-parto de acordo com os grupos experimentais	117
Figura 25 - Concentração do total de ácidos graxos monoinsaturados no período pós-parto de acordo com os grupos experimentais	118
Figura 26 - Concentração do total de ácidos graxos polinsaturados no período pós-parto de acordo com os grupos experimentais	118
Figura 27 - Concentração do total de ácidos graxos insaturados no período pós-parto de acordo com os grupos experimentais	119
Figura 28 - Peso corpóreo nos períodos pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais	123
Figura 29 - Mudança de peso corpóreo nos períodos pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais	123
Figura 30 - Concentrações séricas de colesterol total no pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais	126
Figura 31 - Concentrações séricas de HDL no pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais	127
Figura 32 - Concentrações séricas de LDL no pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais	127
Figura 33 - Concentrações séricas de ácidos graxos não esterificados no pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais	129
Figura 34 - Concentrações séricas de β -hidroxibutirato no pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais	130
Figura 35 - Concentrações séricas de AST no pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais	131
Figura 36 - Concentrações séricas de GGT no pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais	132

Figura 37 - Embriões clivados no período de lactação de acordo com os grupos experimentais	135
Figura 38 - Porcentagem de linfócitos positivos no pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais. INT.: Semana 4 (0 ^a vs. 30 ^{ab} vs. 60 ^b vs. 90 ^b ; P<0,05); Semana 8 (0 ^a vs. 30 ^b vs. 60 ^b vs. 90 ^b ; P<0,05).....	138
Figura 39 - Porcentagem de granulócitos positivos no pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais	138
Figura 40 - Porcentagem de CD8 ⁺ positivos no pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais	139
Figura 41 - Porcentagem de CD138 ⁺ positivos no pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais. INT.: Semana 4 (0 ^a vs. 30 ^b vs. 60 ^b vs. 90 ^b ; P<0,05)	141
Figura 42 - Porcentagem de CD14 ⁺ positivos no pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais. INT.: Semana 4 (0 ^a vs. 30 ^b vs. 60 ^b vs. 90 ^b ; P<0,05); Semana 8 (0 ^a vs. 30 ^b vs. 60 ^b vs. 90 ^b ; P<0,05)	141
Figura 43 - Porcentagem de granulócitos que produziram ERO no pré e pós-parto estimulados com E.coli em função dos grupos experimentais.....	144
Figura 44 - Intensidade de fluorescência de fagocitose em granulócitos no pré e pós-parto estimulados com <i>S.aureus</i> em função dos grupos experimentais	145
Figura 45 - Porcentagem de CD14 ⁺ que produziram ERO no pré e pós-parto estimulados com <i>S.aureus</i> em função dos grupos experimentais	148
Figura 46 - Porcentagem de CD14 ⁺ que produziram ERO no pré e pós-parto estimulados com <i>E.coli</i> em função dos grupos experimentais.....	149

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição bromatológica dos ingredientes utilizados em dietas	69
Tabela 2 - Composição percentual dos concentrados experimentais	70
Tabela 3 - Composição bromatológica dos concentrados experimentais.....	71
Tabela 4 - Composição percentual das dietas experimentais	72
Tabela 5 - Composição bromatológica das dietas experimentais.....	73
Tabela 6 - Médias ($\pm$ EPM) do consumo de matéria e nutrientes no período pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais	90
Tabela 7 - Médias ($\pm$ EPM) da digestibilidade aparente total da matéria seca e nutrientes no período pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais	95
Tabela 8 - Média ($\pm$ EPM) do balanço de energia de acordo com os grupos experimentais	99
Tabela 9 - Média ($\pm$ EPM) do balanço de nitrogênio de acordo com os grupos experimentais	102
Tabela 10 - Média ($\pm$ EPM) da produção e composição do leite de acordo com os grupos experimentais	106
Tabela 11 - Média ($\pm$ EPM) do perfil de ácidos graxos do leite de acordo com os grupos experimentais	115
Tabela 12 - Média ($\pm$ EPM) do peso corporal (PC), escore de condição corporal (ECC) e mudança de peso corporal (MPC) no período pré e pós-parto de acordo os grupos experimentais	121
Tabela 13 - Média ($\pm$ EPM) dos metabólitos plasmáticos pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais	125
Tabela 14 - Médias ($\pm$ EPM) da qualidade oocitária e embrionária em função dos grupos experimentais	133
Tabela 15 - Médias ($\pm$ EPM) das populações de granulócitos, mononucleares e suas subpopulações em função dos grupos experimentais	137
Tabela 16 - Médias ($\pm$ EPM) da porcentagem de produção de ERO, fagocitose e Intensidade de Florescência de ERO e fagocitose de granulócitos estimulados por <i>S.aureus</i> e <i>E.coli</i> no pré e pós-parto em função dos grupos experimentais.....	143
Tabela 17 - Médias ($\pm$ EPM) da porcentagem de produção de ERO, Fagocitose e Intensidade de Florescência de ERO e fagocitose de CD14 ⁺ estimulados por <i>S.aureus</i> e <i>E.coli</i> no pré e pós-parto em função dos grupos experimentais	147

ABREVIACÕES

AG	Ácido Graxo
AGs	Ácidos Graxos
AGCL	Ácidos Graxos de Cadeia Longa
AGI	Ácido Graxo Insaturado
AGIs	Ácidos Graxos Insaturados
AGLs	Ácidos Graxos Livres
AGNE	Ácidos Graxos não esterificados
AGPI	Ácido Graxo Polinsaturado
AGPIs	Ácidos Graxos Polinsaturados
AGS	Ácido Graxo Saturado
AGSs	Ácidos Graxos Saturados
BE	Balanço Energético
BEN	Balanço Energético Negativo
BHB	β -hidroxibutirato
BLAD	Deficiência de adesão de leucócitos em bovinos
Ca-AGs	Sais de cálcio de ácidos graxos
Ca-AGIs	Sais de cálcio de ácidos graxos insaturados
Ca-AGPIs	Sais de cálcio de ácidos graxos polinsaturados
CD	Cluster of differentiation
CMS	Consumo de matéria seca
CNF	Carboidratos não fibrosos
DEL	Dias em lactação

DHA	Ácido docosaheptaenóico
DPC	Dipalmitoil-fosfatidilcolina
EE	Extrato Etéreo
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
GSI	Grão de soja cru e integral
HDL	Colesterol na lipoproteína de alta densidade
IFF	Intensidade de Fluorescência de cada atividade
LDL	Colesterol na lipoproteína de baixa densidade
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade
MIV	Maturação oocitária <i>in vitro</i>
MO	Matéria orgânica
MS	Matéria seca
OPU	Aspiração folicular
PB	Proteína bruta
VLDL	Colesterol na lipoproteína de muita baixa densidade
$\omega 3$	Omega 3
$\omega 6$	Omega 6

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 HIPÓTESE	25
3 OBJETIVOS	26
4 REVISÃO DE LITERATURA	27
4.1 PERÍODO DE TRANSIÇÃO E INÍCIO DE LACTAÇÃO EM VACAS LEITEIRAS	27
4.2 NUTRIÇÃO E ALIMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS NO PERÍODO DE TRANSIÇÃO E INÍCIO DE LACTAÇÃO	30
4.3 LÍPIDEOS NA ALIMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS NO PERÍODO DE TRANSIÇÃO E INÍCIO DE LACTAÇÃO	31
4.3.1 Metabolismo de lipídeos em vacas leiteiras	32
4.3.2 Ácidos graxos insaturados na alimentação de vacas leiteiras	34
4.3.3 Grão de soja	36
4.4 ÁCIDOS GRAXOS $\omega 6$ E O DESEMPENHO PRODUTIVO DE VACAS LEITEIRAS	36
4.4.1 Consumo e digestibilidade da matéria seca e nutrientes	37
4.4.2 Produção, composição e perfil de ácidos graxos do leite	41
4.4.3 Perfil metabólico	46
4.4.4 Balanço de energia e nitrogênio	49
4.5 ÁCIDOS GRAXOS $\Omega 6$ E QUALIDADE OOCITÁRIA E EMBRIONÁRIA DE VACAS LEITEIRAS	51
4.5.1 Síntese de hormônios reprodutivos	52
4.5.1.1 Prostaglandina $F_{2\alpha}$	52
4.5.1.2 Progesterona	53
4.5.2 Qualidade oocitária	55
4.5.3 Qualidade embrionária	57
4.6 ÁCIDOS GRAXOS $\omega 6$ SOBRE A FUNÇÃO IMUNE DE VACAS LEITEIRAS	59
4.6.1 Fagocitose	62
4.6.2 Adesão celular	65
5 MATERIAL E MÉTODOS	67
5.1 ANIMAIS E INSTALAÇÕES	67
5.2 DIETAS EXPERIMENTAIS E ANÁLISE DE ALIMENTOS	67
5.3 DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL	74

5.4	BALANÇO DE ENERGIA	75
5.5	BALANÇO DE NITROGÊNIO	76
5.6	PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE	78
5.7	PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE.....	78
5.8	AVALIAÇÃO DO ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL E PESO CORPORAL	79
5.9	METABÓLITOS PLASMÁTICOS.....	79
5.10	QUALIDADE OOCITÁRIA E EMBRIONÁRIA	80
5.11	FAGOCITOSE E ADESÃO CELULAR.....	84
5.11.1	Metabolismo oxidativo	85
5.11.2	Fagocitose	85
5.11.3	Avaliação da expressão da proteína CD14 e CH 138 em leucócitos sanguíneos	86
5.11.4	Análise em citometria de fluxo	87
5.12	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	87
6	RESULTADOS.....	89
6.1	CONSUMO DE MATÉRIA SECA E NUTRIENTES.....	89
6.2	DIGESTIBILIDADE DA MATÉRIA SECA E NUTRIENTES.....	94
6.3	BALANÇO DE ENERGIA	99
6.4	BALANÇO DE NITROGÊNIO	101
6.5	PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE	106
6.6.	PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE.....	114
6.7	PESO E ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL	121
6.8	PARÂMETROS SANGUÍNEOS	124
6.9	QUALIDADE OOCITÁRIA E EMBRIONÁRIA	133
6.10	CÉLULAS LEUCOCITÁRIAS.....	136
6.11	FAGOCITOSE (CÉLULAS POSITIVAS E INTENSIDADE)	142
7	CONCLUSÕES	150
	REFERÊNCIAS.....	151

1 INTRODUÇÃO

A utilização de ácidos graxos (AGs) na alimentação de ruminantes é uma estratégia utilizada com objetivo de aumentar a densidade energética da dieta, principalmente em animais no período de transição (-21 dias a + 21 dias em relação do parto). Isto ocorre devido à grande demanda de energia por parte do animal ao mesmo tempo em que há redução de consumo nesta fase, pois fisiologicamente a vaca sai do estado gestante e não lactante para outro não gestante e lactante, fazendo com que as mudanças homeorréticas sejam grandes e complexas.

Na última década a suplementação de ruminantes com AGs ganhou destaque, principalmente a suplementação com ácidos graxos polinsaturados (AGPIs), pois além do efeito energético que pode ajudar nas condições metabólicas das vacas no período de transição existe o fator nutracêutico.

Os AGPIs, principalmente, os classificados como $\omega 3$ e $\omega 6$, apresentam propriedades benéficas a saúde animal devido a seus fatores nutracêuticos, melhorando funções e parâmetros fisiológicos, além da sua função primordial como fonte energética (CALDERI-TORRES et al., 2011).

Em vacas leiteiras, cada vez mais tentam investigar a ação dos AGPIs ($\omega 3$ e $\omega 6$, principalmente) na produção e composição do leite (GANDRA et al., 2016 no prelo¹), no sistema reprodutivo (SILVESTRE et al., 2011), no sistema imunológico (GRECO et al., 2015) e outros sistemas.

Segundo Greco (2014), a suplementação com ácido linoleico ($\omega 6$) estimula as células do sistema imunológico a responder melhor durante o período de estresse do parto, pois a vaca utiliza ácido linoleico para produzir prostaglandina $F_{2\alpha}$ e outros precursores ativadores do sistema imunológico com ação pró-inflamatórias.

Silvestre et al. (2008) demonstraram que vacas no período de transição suplementadas com ácido graxo linoleico apresentaram melhor resposta na produção e englobamento de bactérias patogênicas, por neutrófilos em relação a outras fontes de ácidos graxos saturados.

¹ GANDRA, J.R.; BARLETTA, R.V.; MINGOTI, R.D.; VERDURICO, L.C.; FREITAS JUNIOR, J.E.; OLIVEIRA, L.J.; TAKIYA, C.S.; KFOURY JUNIOR, J.R.; WILTBANK, M.C.; RENNO, F.P. Effects of whole flaxseed, raw soybeans, and calcium salts of fatty acids on measures of cellular immune function of transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 2016. No prelo.

A ação dos AGPIs no sistema reprodutivo é muito discutida, porém estudos mostram que suas principais ações são como precursores e/ou mediadores da síntese de hormônios, como por exemplo, as prostaglandinas (PG), contribuindo assim com a involução uterina e a volta a ciclicidade em vacas recém paridas (SANTOS et al., 2008). Porém, segundo Santos et al. (2010) isso depende do tipo, tamanho, quantidade de instaurações dos AGs, pois dependendo do AG ele pode não interferir na síntese de precursores, hormônios que regulam o sistema reprodutivo, ou mesmo interferir de forma negativa, fazendo com que a melhor qualidade oocitária e embrionária seja devido a atenuação do balanço energético negativo e não pela característica nutracêutica.

No entanto, poucos são os estudos com AGPIs em vacas leiteiras e consequentemente a ação exata no organismo do animal. Na literatura ainda não foi descrito o efeito do tempo de suplementação com AGPIs sobre a qualidade oocitária e embrionária levando em consideração o tempo necessário de formação e crescimento de folículos primordiais até o estágio de folículos pré-ovulatórios.

Segundo Staples et al. (1998), há vários mecanismos possíveis pelos quais os AGs pode aumentar a função reprodutiva: 1) diminuição do balanço energético negativo; 2) aumento da esteroidogênese favorável ao aumento da fertilidade; 3) manipulação da insulina tal que estimule o desenvolvimento folicular ovariano; 4) aumento das concentrações plasmáticas de colesterol que, por sua vez, serve como precursor para síntese de progesterona; 5) inibição da produção e liberação da $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Desta forma, a utilização de AGPIs na alimentação de vacas no período final de lactação, transição e início de lactação pode promover maior absorção de ácidos graxos essenciais, principalmente o ácido graxo linoleico, alterando de forma benéfica o metabolismo hepático, função reprodutiva, sistema imune, além de promover melhor atendimento das exigências nutricionais por meio de maior ingestão de energia, melhorando o desempenho produtivo e reprodutivo de vacas no início de lactação.

Sendo as sementes de oleaginosas fontes de alguns AGPIs, como o $\omega 3$ e $\omega 6$, dentre elas a semente de linhaça e o grão de soja, respectivamente. O Brasil um grande produtor e exportador de grão de soja integral, é altamente viável e desejável verificar se o tempo de suplementação com fonte de ácido graxo $\omega 6$ influência no metabolismo de vacas leiteiras no período de transição e início de lactação.

2 HIPÓTESE

O aumento do tempo de fornecimento de grão de soja cru e integral em dieta de vacas no pré-parto melhora a qualidade oocitária, embrionária e o sistema imune, sem prejudicar o desempenho produtivo de vacas leiteiras no período de transição e início de lactação.

3 OBJETIVOS

Objetivou-se avaliar o efeito do aumento do tempo de fornecimento de grão de soja cru e integral na dieta de vacas leiteiras no pré-parto sobre o desempenho produtivo (consumo e digestibilidade de matéria seca e nutrientes; balanço de energia e nitrogênio; produção, composição e perfil de ácido graxo do leite; peso e escore de condição corporal), no perfil metabólico sanguíneo, na qualidade oocitária e embrionária, e na atividade do sistema imunológico (capacidade e intensidade de fagocitose de antígenos, expressão de moléculas de adesão nos neutrófilos e porcentagem de células ativas).

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 PERÍODO DE TRANSIÇÃO E INÍCIO DE LACTAÇÃO EM VACAS LEITEIRAS

Segundo Grummer (1995) o período de transição ou periparto em vacas leiteiras é considerado o período de tempo compreendido das últimas três semanas anteriores ao parto (-21 dias) até as três primeiras semanas de lactação (+21 dias). E o início de lactação sendo os primeiros 90 dias de lactação após o parto, existindo variações entre autores, que consideram até o 100 ou 120º dias após o parto em algumas situações.

No período de transição a vaca sai de um estado gestante e não lactante para um estado não gestante e lactante consequência disso são grandes transformações e mudanças fisiológicas, consequência disso é uma demanda muito grande de nutrientes para o organismo da vaca leiteira, necessitando uma sincronia no metabolismo do animal para atender as exigências nutricionais e as mudanças (BELL, 1995). Nesse período a exigência de cálcio e energia é grande, principalmente, de para a realização do parto, produção de colostro e produção de leite. No entanto, a velocidade do aumento na produção de leite é maior do que a velocidade do aumento de consumo de alimentos e, conseqüentemente, de nutrientes pelos animais (TAMMINGA; LUTEIJN; MEIJER, 1997). Isso ocorre devido a mudanças endócrinas nas concentrações circulantes de hormônios como: insulina, hormônio de crescimento, glicocorticóides e prolactina, estradiol, progesterona e tiroxina.

Mudanças endócrinas somada a um aumento da exigência nutricional leva a uma diminuição na ingestão de matéria seca nesse período, assim os animais acabam mobilizando reservas energéticas, principalmente a gordura do tecido adiposo, levando ao aumento da taxa de lipólise e glicogênese para tentar suprir esse déficit de energia (balanço energético negativo) que não é suprida pela alimentação (BAUMAN; CURRIE, 1980).

Segundo Bell (1995) a mobilização de gordura nesta fase é facilitada em parte devido à diminuição da habilidade da insulina (resistência à insulina) em promover a lipogênese e de se opor a lipólise. Kunz et al. (1985) e Vasquez-Anon et al. (1994) já haviam demonstrado que nesse período há moderado grau de resistência à insulina no tecido adiposo e muscular, fato este confirmado por estudos mais recentes que observaram diminuição de receptores de

insulina nos tecidos adiposos e musculares (GRABER et al., 2010; ZACHUT et al., 2013), consequência disso é a mobilização do tecido adiposo e aminoácidos da musculatura. Assim, há economia na utilização de glicose (energia) por alguns tecidos corporais, principalmente tecidos periféricos (HERDT, 2000), na tentativa de suprir o aumento da exigência de glicose de vacas leiteiras no pós-parto recente (2500g/d aos 21 dias pós-parto) em relação ao final de gestação (1000 a 1100 g/d; OVERTON et al., 1998).

Essas adaptações realizadas pelo organismo do animal no período de transição e início de lactação com consequente mobilização de tecido adiposo na tentativa de suprir a demanda energética do animal faz com que haja um aumento nas concentrações de ácidos graxos não esterificados (AGNE) na corrente sanguínea (DRACKLEY, 1999). Esse aumento é decorrente da quebra de triglicerídeos em AGNE e glicerol pelo tecido adiposo, estes na circulação vão para o fígado para serem metabolizados. No fígado o glicerol é convertido em glicose através da gliconeogênese e utilizada, principalmente, pela glândula mamária, tecidos nervosos e musculatura cardíaca (DRACKLEY et al., 2001; REYNOLDS et al., 2003). Já os AGNE que estão na circulação, parte são utilizados pela glândula mamária para compor a gordura do leite, parte são utilizados como fonte de energia pelos tecidos (musculatura esquelética, principalmente) e uma maior parte vai para o fígado onde são ativados pela ação da enzima acil-CoA sintase, formando o acil-CoA graxo. O acil-CoA graxo, por sua vez, pode seguir três rotas principais no órgão: 1) ser completamente oxidado a dióxido de carbono para fornecimento de energia, 2) parcialmente oxidado para produção de corpos cetônicos que são liberados no sangue e servem como fontes de energia para outros tecidos ou 3) reesterificados a triglicerídeos e transportados como lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL). (Figura 1).

Figura 1 - Esquema do metabolismo de ácidos graxos não esterificados em vacas leiteiras

Fonte: Adaptado de Drackley (1999).

O fígado oxida os AGNE de acordo com a proporção de seu suprimento via corrente sanguínea, resultantes da mobilização de reservas corporais (EMERY; LIESMAN; HERDT, 1992). No entanto, a capacidade de reesterificação e exportação de VLDL é relativamente baixa em ruminantes (GRUMMER, 1993). Assim, o excesso de AGNE no fígado, resultantes da excessiva mobilização de reservas corporais de vacas leiteiras durante o período de transição e início da lactação, pode exceder a capacidade de metabolização desses ácidos graxos (oxidação e reesterificação), resultando no armazenamento hepático de triglicerídeos (oriundos da esterificação dos AGNE), levando os animais ao desenvolvimento de esteatose hepática (acúmulo de triglicerídeos no parênquima hepático) (DRACKLEY, 1999).

O acúmulo de triglicerídeos no parênquima hepático pode prejudicar as funções fisiológicas do fígado como, reduzir a capacidade do fígado em detoxicar amônia em ureia (STRANG; BERTICS; GRUMMER, 1998), diminuir a gliconeogênese hepática a partir do propionato (CADORNIGA-VALINO; GRUMMER; ARMENTANO, 1997), o principal precursor de glicose em ruminantes e comprometer a síntese de hormônios como IGF-1, por exemplo (OVERTON; DRACKLEY; OTTEMANN-ABBAMONTE, 1999). Dessa forma, o animal estará sujeito a alterações de desempenho, reprodutiva e de sanidade (COOKE et al.,

2007), portanto estratégias de manejo que promovam a redução de mobilização de reserva corpórea são de extrema importância nessa fase (PIRES et al., 2007; SILVESTRE et al., 2011).

4.2 NUTRIÇÃO E ALIMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS NO PERÍODO DE TRANSIÇÃO E INÍCIO DE LACTAÇÃO

O manejo nutricional e a alimentação são fatores essenciais no ciclo produtivo das vacas leiteiras e alvo de grandes estudos, pois devem atender a critérios relacionados a fisiologia e a endocrinologia das diferentes fases do ciclo de vida do animal (OLSON, 2002). Onde o período de transição, em particular, concentra muitos dos estudos na tentativa de desenvolver estratégias que maximizem a ingestão de nutrientes e consequentemente minimizem o BEN (OVERTON; WALDRON, 2004).

Uma importante estratégia de manejo que é utilizada na tentativa de suprir a exigência de nutrientes das vacas durante o período de transição e tentar maximizar o consumo no pós-parto recente é fazer a divisão do período seco em dois grupos distintos: o primeiro grupo abrange os animais que iniciam o período de repouso que compreende o momento da secagem dos animais até 21 dias antes da expectativa de parto, denominada fase 1 do período seco ou “FAR OFF”, onde preconiza-se uma dieta com aproximadamente 1,25 Mcal de energia líquida de lactação (Mcal EL_l)/kg (NRC, 2001); o segundo grupo abrange os animais desde da fase 1 até as três últimas semanas que antecedem o parto, sendo denominada fase 2 do período seco ou “CLOSE UP”, onde se preconiza-se uma dieta com aproximadamente 1,62 Mcal de energia líquida de lactação (Mcal EL_l)/kg (NRC, 2001).

Na fase 2 do período seco, onde o consumo do animal começa a reduzir quanto mais próximo ao parto, utilização de dietas contendo maiores quantidades de CNF é uma outra estratégia para tentar aumentar a densidade energética da dieta e manter as exigências do animal e adaptar os animais a dietas mais energéticas do pós-parto recente. Segundo, Vandehaar et al. (1995) o aumento da densidade energética da dieta pode resultar em maior ingestão de energia durante o peri-parto e diminuição de até 9 vezes o acúmulo de gordura no parênquima hepático (15,0 mg/g de tecido) com consequente diminuição de distúrbios metabólicos.

Outra estratégia para tentar aumentar a densidade energética da dieta no final do período seco e início de lactação na tentativa de amenizar o BEN é a inclusão de lipídeos na dieta, pois são 2,25 vezes mais energéticos que carboidratos (NRC, 2001), fazendo com que uma dieta acrescida de uma fonte de lipídeos, apresenta maior densidade energética por quilo de alimento quando comparada a dietas com apenas carboidratos como fonte de energia.

4.3 LÍPIDEOS NA ALIMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS NO PERÍODO DE TRANSIÇÃO E INÍCIO DE LACTAÇÃO

Os lipídeos são basicamente ésteres de glicerol (triglicerídeos), moléculas constituídas por glicerol (que é um álcool) mais ácidos graxos. Os ácidos graxos são compostos de cadeias com hidrocarbonetos variando de 4 a 36 átomos de carbono, podendo ser estas cadeias insaturadas ou saturadas (NELSON; COX, 2014).

As principais fontes de lipídeos para ruminantes são as forragens, sementes de oleaginosas, óleos derivados das mesmas e sais de cálcio de ácidos graxos (suplementos comerciais obtidos através da reação de ácidos graxos com sais de cálcio). As fontes de lipídeos para vacas leiteiras são constituídas principalmente por ácidos graxos de cadeia longa (AGCL), acima de 16 carbonos, onde os principais e com maior interesse são: ácido palmítico (16 carbonos, saturado, 16:0), ácido esteárico (18 carbonos, saturado, 18:0), ácido oleico (18 carbonos, monoinsaturado, 18:1), ácido linoleico (18 carbonos, duas insaturações, 18:2 n-6) e ácido linoleico (18 carbonos, três insaturações, 18:3 n-3).

Os ácidos graxos que compõem os lipídeos possuem elevado valor energético (9 kcal/g) (BERCHIELLI et al., 2011) e baixo incremento calórico, sendo o seu principal uso, na grande maioria das vezes, como fonte energética, mas também podendo ser utilizado para aumentar a eficiência do uso de energia em decorrência de menor incremento calórico; aumentar parcialmente a eficiência da produção de leite pela incorporação direta da gordura da dieta na gordura do leite; substituir os carboidratos rapidamente fermentáveis visando à otimização de consumo de forragem e a fermentação ruminal (participação de nutrientes para a secreção do leite); aumentar a flexibilidade para o preparo da ração; utilizar para modificação da composição da gordura do leite ou de tecidos para aceitação pelo consumidor (PALMQUIST; MATTOS, 2006).

Apesar dos benéficos advindos dos lipídeos sua inclusão na dieta não deve deixá-la com valores acima de 6-7% de EE, pois pode causar efeitos adversos sobre a fermentação ruminal (NRC, 2001), como a redução na digestão das fibras no rúmen pelo recobrimento das partículas alimentares por lipídeos ou pelo efeito tóxico causado aos microrganismos ruminais (JENKINS, 1993) e queda de consumo (NRC, 2001).

4.3.1 Metabolismo de lipídeos em vacas leiteiras

Os lipídeos provenientes da dieta ao chegarem no rúmen são hidrolisados (quebra da ligação entre glicerol e ácidos graxos) predominantemente pelas bactérias (HARFOOT; HAZLEWOOD, 1988), tornando os ácidos graxos livres (AGLs). Os ácidos graxos insaturados (AGIs) pela ação dos microrganismos ruminais através da biohidrogenação, são convertidos em ácidos graxos saturados (AGSs; Figura 1), porém a taxa de biohidrogenização dos AGIs no rúmen depende de muitos fatores, entre eles, da quantidade de AGs que se encontram hidrolisados, da taxa de passagem ruminal, da forma em que os AGIs encontram-se na dieta (livres ou protegidos) podendo essa taxa de biohidrogenação variar muito (BEAM et al., 2000).

Figura 2 - Etapas bioquímicas para biohidrogenação de ácido linoleico e linolênico no rúmen. Onde, A: microrganismos do grupo A; B: microrganismos do grupo B

Fonte: Davis e Brown (1970), elaborada Pennington e Davis (1975) e Adaptado de Harfoot e Hazlewood (1997).

Os AGs que atingem a mucosa intestinal são emulsificados através da bile e do suco pancreático formando micelas que posteriormente são absorvidas pelas células epiteliais do intestino. No citosol das células epiteliais do intestino os AGs são reconvertidos a triglicerídeos e empacotados com o colesterol e/ou com proteínas específicas formando diferentes agregados lipoproteicos, indo para o Complexo de Golgi da célula onde são combinados com apoproteínas específicas para formar os quilomícrons e lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL). Depois da formação de lipoproteínas no complexo de Golgi, elas prosseguem por exocitose, por meio da porção basal das células intestinais, pela lâmina própria, para os ductos linfáticos até adentrar a veia jugular indo para a circulação geral para serem utilizados (PALMQUIST; MATTOS 2006). Segundo Nelson e Cox (2014), a absorção de triglicerídeos provenientes dos quilomícrons e do VLDL séricos é mediada pela lipase lipoproteica (LPL), enzima encontrada em altos níveis nas células epiteliais das paredes de capilares dos tecidos (tecido adiposo, músculo cardíaco e no músculo esquelético, principalmente), tendo um papel chave no metabolismo de lipídeos, pois hidrolisa os triglicerídeos que estão incorporados nas lipoproteínas liberando os AGs que os formam, possibilitando que esses sejam captados pelas células do tecido e sofrer oxidação gerando

energia. E além de gerar energia os ácidos graxos advindos da dieta que chegam à circulação sanguínea podem ser, transferidos para o leite e/ou deposição na gordura corporal (lipogênese).

Para serem oxidados os AGs precisam ser transportados para dentro da matriz mitocondrial. Porém, AGs com cadeia carbônica de 12 carbonos ou menos entram na mitocôndria sem a ajuda de transportadores de membranas. Já aqueles com 14 carbonos ou mais não conseguem passar diretamente através das membranas mitocondrial; primeiro eles precisam passar por três reações enzimáticas do circuito da carnitina. Essas reações (esterificação com CoA, transesterificação com a carnitina, seguida de transporte e transesterificação de volta a CoA) são mediadas pela carnitina, e na ausência dela não é possível fazer o transporte de AGs a cima de 14 carbonos para o interior da matriz mitocondrial, sendo um passo limitante para a oxidação dos AGs. (NELSON; COX, 2014).

No processo de oxidação a cadeia de AG é rompida a cada dois átomos de carbono que se juntam a um CoA (Acetil-CoA). O Acetil-CoA entra no ciclo de Krebs, onde é completamente oxidado a CO_2 gerando energia para o tecido. Assim, os AGs tornam-se importantes fontes de energia para os tecidos animal (hepáticos, muscular, nervoso e adiposo).

4.3.2 Ácidos graxos insaturados na alimentação de vacas leiteiras

A suplementação de lipídeos para vacas no período de transição e início de lactação deixou de ser utilizada apenas como fonte de energia nas dietas, mas como fonte de AGs específicos com finalidade nutracêutica, visando melhores condições de saúde e reprodutiva dos animais (SANTOS et al., 2008). No entanto, efeitos nutracêuticos são apresentados principalmente por ácidos graxos insaturados (CALDERI-TORRES et al., 2011), melhorando a síntese de hormônios esteroidais (CERRI et al., 2009b), de agentes do sistema imune (GANDRA et al., 2016 no prelo²), desempenho produtivo e reprodutivo de vacas (CERRI et al., 2009a; SILVESTRE et al., 2011). Onde o número de insaturações, a posição e o tamanho

² GANDRA, J.R.; BARLETTA, R.V.; MINGOTI, R.D.; VERDURICO, L.C.; FREITAS JUNIOR, J.E.; OLIVEIRA, L.J.; TAKIYA, C.S.; KFOURY JUNIOR, J.R.; WILTBANK, M.C.; RENNO, F.P. Effects of whole flaxseed, raw soybeans, and calcium salts of fatty acids on measures of cellular immune function of transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 2016. No prelo.

da cadeia carbônica é o que dita o seu papel na regulação e função no metabolismo (MATTOS et al., 2000).

Dentre os ácidos graxos insaturados os da família $\omega 6$ (n-6) e $\omega 3$ (n-3) vem sendo os mais investigados por diversos autores (RABIEE et al., 2012; DIRANDEH et al., 2013; BADIEI et al., 2014; GRECO et al., 2015; RODNEY et al., 2015; GANDRA et al., 2016 no prelo³) na tentativa de descobrir como agem e desempenham suas funções nutracêuticas nos diferentes tecidos. Dentro os ácidos da família $\omega 6$ o ácido linoleico (18:2, n-6) é um que se destaca e vem sendo muito investigado por ser encontrado facilmente em algumas sementes de oleaginosas (CERRI et al., 2009a,b; GANDRA et al., 2016 no prelo⁴). No entanto, para que os AGIs possam ter essa ação benéfica no metabolismo das vacas, eles têm que chegar até o intestino delgado ainda insaturados, sem que sejam biohidrogenizados no rúmen.

Para minimizar o processo de biohidrogenização ruminal dos AGIs, empresas de de ração animal estão fazendo os sais de cálcio, tecnologia que incorporando cálcio aos AGs através de uma reação com formaldeídos que formam moléculas de ácidos graxos ligados ao cálcio. Esses têm como objetivo atravessar o rúmen sem que ocorra a liberação do AG. Porém estudos apontam que os sais de cálcio não são totalmente inertes no rúmen (PALMQUIST; MATTOS, 2006), onde sua dissociação ruminal depende do tipo de AG que forma esse sal, do grau de insaturação do AG e do pH ruminal (CHALUPA, 1991).

Pelo fato dos Ca-AGs não serem totalmente inertes no rúmen e ser um produto obtido e comercializado por indústrias, o seu valor na alimentação eleva os custos das dietas. Assim, estratégias de suplementação utilizando sementes de oleaginosas diretamente na dieta como fonte de AGIs de valor nutracêutico (MUSTAFA; SEGUIN, 2003; CHILLIARD et al., 2009; GANDRA et al., 2016 no prelo⁵) estão ganhando destaque e sendo utilizadas nas rações de vacas leiteiras. Isso vem ocorrendo, porque a maioria dos lipídeos encontrados nas sementes de oleaginosas está no germe da semente, assim para que ocorra a hidrólise dos mesmos e biohidrogenação é necessário que haja a degradação da parede celular primeiramente, fazendo com que a semente tenha uma proteção natural contra a biohidrogenação ruminal.

^{3,4,5} GANDRA, J.R.; BARLETTA, R.V.; MINGOTI, R.D.; VERDURICO, L.C.; FREITAS JUNIOR, J.E.; OLIVEIRA, L.J.; TAKIYA, C.S.; KFOURY JUNIOR, J.R.; WILTBANK, M.C.; RENNO, F.P. Effects of whole flaxseed, raw soybeans, and calcium salts of fatty acids on measures of cellular immune function of transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 2016. No prelo.

4.3.3 Grão de soja

O grão de soja é um grão rico em proteína, cultivado em todo mundo como fonte de alimento para humanos e animais, e pertence à família *Fabaceae* (leguminosa). É composto por cerca de 40% de proteína bruta, 34% de carboidratos (açúcares como glicose, frutose e sacarose, fibras e os oligosacarídeos, como rafinose e estaquiose), 20% de lipídeos, e 5% de minerais. Dos lipídeos, 51% é ácido linoleico (18:2, n-6; família ω 6), 22% ácido oleico (18:1), 6,8% ácido linolênico (18:3, n-3; família ω 3), 10% ácido palmítico (16:0) e em menores concentrações outros (NRC, 2001). Assim, destaca-se entre os alimentos proteicos de origem vegetal como fonte alternativa de proteína e energia, sendo considerada a semente de oleaginosa mais disponível no mundo, podendo ser usada na alimentação dos ruminantes na sua forma original (crua) ou processada (CORRÊA, 2007).

No quesito proteína apresenta grande quantidade de proteína degradável no rúmen (PDR), que pode ser convertida em proteína não degradada no rúmen (PNDR) por meio de tratamento térmico. E no quesito energia por apresentar alto conteúdo de AGPIs. Predominando concentrações elevadas de ácido linoleico (C18:2) (DHIMAN et al., 2005).

Altas exigências nutricionais de vacas no período de transição e início de lactação, principalmente de energia e proteína, está fazendo com que o grão de soja integral ganhe destaque na alimentação animal. Porém, atualmente sua utilização está além do fato de ser fonte proteica e energética, destacando-se por ser uma fonte de Omega 6 (ácido linoleico), assim, tenta-se explorar seu potencial nutracêutico na saúde animal quando incluso na alimentação animal (GANDRA et al., 2016 no prelo⁶).

4.4 ÁCIDOS GRAXOS ω 6 E O DESEMPENHO PRODUTIVO DE VACAS LEITEIRAS

⁶ GANDRA, J.R.; BARLETTA, R.V.; MINGOTI, R.D.; VERDURICO, L.C.; FREITAS JUNIOR, J.E.; OLIVEIRA, L.J.; TAKIYA, C.S.; KFOURY JUNIOR, J.R.; WILTBANK, M.C.; RENNO, F.P. Effects of whole flaxseed, raw soybeans, and calcium salts of fatty acids on measures of cellular immune function of transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 2016. No prelo.

4.4.1 Consumo e digestibilidade da matéria seca e nutrientes

Muitos são os trabalhos na literatura que demonstram a influência da suplementação de lipídeos na dieta de vacas leiteiras no período de transição e início de lactação sobre o consumo (CMS) e digestibilidade da matéria seca (DMS) e dos nutrientes, sendo a maioria desses com a suplementação na forma de óleo diretamente na dieta. Na última década, com objetivo de verificar o efeito dos lipídeos contendo ácidos graxos insaturados começaram a utilizar mais a suplementação com lipídeos inertes, sejam eles na forma de sementes oleaginosas ou na forma de sais de cálcio, para tentar amenizar a ação da biohidrogenização ruminal.

Assim, ao analisar CMS dois principais pontos devem ser destacados em vacas suplementadas com fontes de lipídeos: 1) aceitabilidade do suplemento do lipídeo, que está diretamente relacionado às alterações no consumo de matéria seca, pois quando o período de adaptação não é suficiente para os animais, as respostas à suplementação podem não representar a realidade; 2) tipo e nível de suplementação de gordura utilizado, pois respostas diferentes são observadas de acordo com as características químicas e físicas do lipídeo utilizado. Além disso, é preciso considerar que quando se avalia o CMS de vacas suplementadas com diferentes fontes de lipídeos, uma série de parâmetros estão envolvidos, sendo os principais a digestibilidade da fração fibrosa, o tipo de volumoso utilizado, a fonte e nível de lipídeo utilizado, e o estágio do ciclo da vaca no qual se iniciou a suplementação (NRC, 2001; STAPLES et al., 2001; ONETTI; GRUMMER, 2004).

A maioria dos estudos utilizando lipídeos na forma de óleo demonstram uma diminuição no consumo e na digestibilidade aparente de alguns nutrientes da dieta e a causa destas queda são apontadas por vários fatores, como quantidade de inclusão, o tipo (saturada ou insaturada), a relação volumoso:concentrado da dieta, o tipo de fibra que compõem a dieta (PETIT et al., 2007).

Allen (2000) resumizou experimentos onde foram observados redução do consumo de matéria seca (CMS) em vacas recebendo fontes de lipídeos e verificou que os possíveis fatores para estas reduções são alterações na motilidade do trato gastrointestinal, problemas relacionados à aceitabilidade das dietas com adição de lipídeos, alterações do perfil hormonal, alteração do perfil lipídico presente nas membranas celulares e o excesso de oxidação de gordura no tecido hepático. De acordo com NRC (2001), para dietas contendo acima de 6% de ácidos graxos na matéria seca, devido a adição de óleo de sementes e/ou de ácidos graxos

parcialmente hidrogenados pode haver uma redução no CMS, mas muitas vezes este não é suficiente para reduzir o aporte energético oferecido pelas fontes de lipídeo ao animal.

Segundo Choi e Palmquist (1996), a diminuição no consumo de matéria seca de vacas leiteiras alimentados com quantidades crescentes de lipídios na dieta, seria mediada pela colecistoquinina (CCK). A CCK é secretada por células enteroendócrinas do intestino delgado e regula a ingestão por sensores neuro-vagais ou reduzindo o trânsito da digesta. Ainda vários outros peptídeos de origem do trato gastrointestinal, como o peptídeo YY e produtos do processamento do glucagon [glucagon pancreático, glicentina, oxintomodulina, peptídeo *glucagon-like* 1 (GLP-1) ou GLP2], são potenciais mediadores da redução do CMS observado em animais alimentados com lipídeos (BRADFORD et al., 2008; ALIZADEH et al., 2012).

Grummer et al. (1995) avaliaram a suplementação de fontes comerciais de lipídeos em três fazendas, um total de 209 animais em lactação e observaram reduções no CMS, assim como Martin et al. (2008) observaram grande decréscimo no CMS e na digestibilidade de nutrientes em dietas com 5,7% de EE contendo óleo de linhaça. Porém, Ueda et al. (2003) descreveram que não houve efeito negativo no CMS e digestibilidade de nutrientes em vacas leiteiras, no nível de inclusão de 3% de óleo de semente de linhaça (dieta com 5,1% EE), e segundo Benchaar et al. (2008) num nível de até 4% (dieta com 5,4% EE).

A redução de CMS com a inclusão de lipídeos na forma de óleo na dieta pode reduzir o consumo devido a uma redução na digestão das fibras no rúmen pelo recobrimento das partículas alimentares, dificultando assim sua digestão, diminuindo a taxa de passagem e consequentemente diminuindo o consumo por preenchimento físico do rúmen (PALQUIST; JENKINS, 1980). Segundo, Jenkins (1993) este processo poderia se intensificar ao se utilizar óleos contendo ácidos graxos insaturados, pois eles seriam tóxicos principalmente as bactérias celulolíticas, as quais são as principais responsáveis pela biohidrogenação.

Porém na tentativa de utilizar sais de cálcio de óleos na dieta de vacas leiteiras tendo a expectativa deles influenciarem pouco na fermentação ruminal, autores ao avaliar o consumo dos animais alimentados com estes acharam resultados muito variados, onde poderia ocorrer uma redução no consumo. Fato este observado por Allen (2000), em ampla revisão de literatura, onde observou que de 24 experimentos utilizando os Ca-AGs como fonte de gordura, 11 apresentaram redução do consumo de matéria seca. Esses resultados, segundo este autor, podem ser atribuídos à questão da aceitabilidade desta fonte de lipídeo, levando dessa forma ao baixo consumo encontrado. Com resultado semelhante, Onetti e Grummer (2004) compilaram dados de 41 experimentos que avaliaram a suplementação de diferentes fontes e níveis de lipídeos nas rações de vacas em lactação, onde 23 experimentos analisados que

usaram os sais de cálcio de ácidos graxos de óleo de palma como fonte de gordura, observaram significativa redução no consumo de matéria seca de 0,97 kg/dia.

Freitas Júnior (2008) ao comparar diferentes fontes de lipídeos, óleo de soja, Ca-AGs e 16% de inclusão de grão de soja nas dietas de vacas holandesas com média de produção de leite de 25,0 kg/dia, observou uma diminuição no consumo de vacas suplementadas com as fontes de lipídeos, em especial os sais de cálcio foi que apresentou menor consumo.

Lessard et al. (2004) estudaram os efeitos de dietas enriquecidas com ácidos graxos polinsaturados $\omega 3$ e $\omega 6$ durante o período de transição ($n=48$), e utilizaram de sais de cálcio de óleo de palma (Megalac-R[®]), grão de soja micronizado e semente de linhaça integral. Nesse experimento o CMS nas seis primeiras semanas pós-parto foi significativamente menor para vacas alimentadas com Megalac-R[®] do que as vacas alimentadas com semente de linhaça (14,7 kg/d vs. 16,6 kg/d), e não se observou efeito para CMS de vacas alimentadas com soja micronizado.

Greco et al. (2015) ao estudarem o efeito de três diferentes relações de $\omega 6/\omega 3$ (4:1; 5:1; 6:1) utilizando Ca-AGs e dietas de 3,8% EE em vacas leiteiras no período de transição e início de lactação observaram um maior CMS nos animais do grupo de menor relação $\omega 6/\omega 3$.

Duarte et al. (2005) utilizando vacas de leite no início da lactação com média de produção de 25,0 Kg/dia, não observaram redução do CMS em dietas com e sem o grão de soja integral em vacas Jersey no início da lactação em relação a outras fontes de lipídeos. Corrêa (2007) verificou resultados semelhantes, onde também não observou redução no CMS de vacas Holandesas que receberam o grão de soja integral em relação as que receberam farelo de soja.

Naves (2010) trabalhando com vacas leiteiras no terço médio de lactação com média de produção de 30,0 kg/dia, utilizando 20% de inclusão de grão de soja cru nas rações com diferentes tipos de moagem, sendo controle (sem adição de grão de soja), grão de soja cru e integral e grão de soja moído em peneira de 2 e 4mm. Não diferenças no consumo e digestibilidade da matéria seca.

Barletta et al. (2012) avaliaram a inclusão de diferentes níveis de grão de soja cru e integral (0, 8, 16 e 24% na MS total da dieta) na dieta de vacas leiteiras no terço inicial de lactação com média de produção de 31,21 kg/dia. Observaram uma diminuição de consumo dos animais suplementados com grão de soja na proporção de inclusão de 24%, os autores atribuíram esta redução à menor aceitabilidade dos animais e pelo alto teor de extrato etéreo da dieta (7,0%).

Gandra et al. (2015) em estudos utilizando vacas no período de transição e início de lactação comparando quatro dietas: sem adição de lipídeo; uma com fonte de $\omega 3$ (semente de linhaça); e duas com fonte de $\omega 6$ (GSI e Ca-ácido linoleico), não observaram diferença de consumo nos animais no início da lactação, porém no pré-parto observaram menor consumo para os grupos alimentados com dietas contendo $\omega 6$.

Em relação a digestibilidade, como no consumo a suplementação de gordura na dieta pode influenciar a digestibilidade dos nutrientes da dieta por uma série de fatores, especialmente pela característica inerente ao suplemento e sua forma de utilização (óleo, sais de cálcio, sementes oleaginosas), como o nível e tipo de suplemento utilizado, e o tipo de volumoso utilizado durante a suplementação (FREITAS JUNIOR, 2010).

Segundo Palmquist (1988), o efeito dos AGs sobre a degradabilidade ruminal de nutrientes pode ser minimizado se a dieta contiver alta quantidade de volumoso, isso podendo ser comprovado principalmente pela capacidade da forragem em manter o funcionamento normal do rúmen. Ainda, Bateman e Jenkins (1998) demonstraram que grandes quantidades de óleo de soja em combinação com altas quantidades de forragem nas rações podem ser fornecidas sem prejuízo sobre a digestibilidade aparente total. E Schauff et al. (1992), relataram que óleos reduzem a digestibilidade aparente total de carboidratos quando se fornece silagem de milho como volumoso comparado com outros volumosos como o feno de gramíneas. Sendo que os efeitos de AGIs sobre a digestão ruminal podem ser variáveis, onde o tipo de volumoso utilizado durante a suplementação pode ser considerado fator preponderante para que isso ocorra (UEDA et al., 2003).

Ueda et al. (2003) avaliaram a inclusão de 3% de óleo de soja na matéria seca em dietas de alta e baixa quantidade de feno de pastagem sobre a digestibilidade aparente total em quatro vacas canuladas no rúmen e duodeno. Estes autores observaram que a degradabilidade da FDN aumentou nas dietas com óleo e alta relação volumoso:concentrado em relação a dietas com baixo teor de volumoso. No entanto, houve redução na digestibilidade da matéria orgânica (MO) de 15,5%, FDN em 22,7% e FDA em 30,7% para as rações com óleo e baixo teor de volumoso nas dietas.

Formas protegidas da degradação ruminal, como os sais de cálcio de ácidos de cadeia longa, e fontes de gordura que possuem proteção natural, como sementes de oleaginosas, quando utilizados na dieta demonstram apresentarem benefícios na digestibilidade de nutrientes (ALLEN, 2000; PALMQUIST; MATTOS, 2006). Grummer (2004) avaliou a digestibilidade aparente total da matéria seca e FDN em diversos estudos que utilizaram fontes de gordura e observaram aumento de 2,1% na digestibilidade da FDN em 13

comparações quando foi utilizado Ca-AGs em relação ao sebo e a gordura branca parcialmente hidrogenada.

Freitas Júnior (2008); Barletta (2010); Naves (2010) e Gandra (2012) apresentaram resultados semelhantes sobre a digestibilidade aparente total. Os estudos mostraram que o grão de soja não influencia na digestibilidade dos nutrientes, o que demonstra o potencial de utilização do grão de soja nas dietas dos animais.

4.4.2 Produção, composição e perfil de ácidos graxos do leite

A produção e a composição do leite são regidas por processos metabólicos complexos, controlados por uma variedade de hormônios, que regula a quantidade, qualidade, transformação e o uso de diferentes nutrientes pelos diferentes tecidos, principalmente na glândula mamária (BAUMAN; GRIINARI, 2003). Onde energia é um fator importante para a produção de leite, e a falta dela no metabolismo animal acaba sendo um fator limitante para a produção de leite (HARVATINE; ALLEN, 2006).

Vacas no período de transição e início de lactação precisam na maioria das vezes retirarem parte da energia utilizada para síntese e composição do leite de reservas corporais devido a insuficiente quantidade de energia advindo da dieta, onde essa mobilização fisiológica pode ser responsável por até 30% da produção de leite nos primeiros 21 dias de lactação (GRUMMER, 1995). Assim, inclusão de lipídeos na dieta de vacas leiteiras nesse período vem ganhando destaque devido ao seu alto valor energético somada a menores perdas de energia de seu metabolismo em relação a utilização de grãos comumente utilizados na dieta (STAPLES et al., 2001).

Sobre a resposta produtiva, Chilliard (1993) resumizou diversos estudos envolvendo a suplementação de lipídeos para vacas leiteiras e observou respostas que variaram de 0,31 a 0,72 Kg de leite/dia/vaca, onde esta variação depende muito da fase de lactação em que se iniciou a suplementação. Ainda, Staples et al. (2001) relataram que a resposta produtiva da utilização de fontes de lipídeos na dieta de vacas em lactação pode resultar em acréscimos na produção de leite de até 2,0 a 2,5 Kg/vaca/dia, condicionando estes resultados a adaptação dos animais as dietas contendo lipídeos e ao tempo suficiente de avaliação para responderem as dietas ricas em energia.

Em relação ao teor de gordura, proteína e lactose do leite, estudos com suplementação de lipídeos na dieta de vacas demonstram que a lactose está pouco sujeita a alterações, no entanto, o teor de gordura e proteína são as frações que estão mais sujeitas, sendo o primeiro mais influenciado (ROMO et al., 2000). A redução de proteína do leite devido a utilização de lipídeos na dieta é por vezes citada na literatura (WU et al., 1994; ROMO et al., 2000; DELBECCHI et al., 2001) e algumas hipóteses são discutidas procurando explicar qual a razão deste decréscimo.

A primeira teoria foi denominada de “deficiência de glicose” onde, teoricamente, a substituição de carboidratos rapidamente fermentáveis no rúmen por suplementos de gordura resultaria em menores quantidades de precursores para a síntese de glicose. No entanto, Canale et al. (1990) e Chow et al. (1990) teorizam que a redução da síntese de proteína do leite ocorre devido à redução da produção de proteína microbiana, que pode representar consequência da suplementação de gordura, pois o *pool* de aminoácidos no animal seria reduzido devido ao aumento da utilização de aminoácidos utilizados na gliconeogênese.

Outra teoria descreve a resistência à insulina de alguns tecidos sobre a síntese de proteína do leite. Palmquist e Moser (1981) verificaram que a taxa de glicose em vacas leiteiras foi correlacionada negativamente com os aumentos das concentrações de insulina causada pela glicose. Estes autores verificaram que altas taxas de insulina foram observadas em vacas leiteiras que receberam altas quantidades de lipídeos nas rações, e assim esses altos níveis de lipídeos poderiam causar resistência à insulina a qual pode reduzir o fluxo de aminoácidos para a glândula mamária para síntese de proteína do leite.

Uma explicação muito difundida envolve o aumento no fornecimento de energia e o suprimento de aminoácidos, onde este último não consegue atender a demanda para síntese de proteína na mesma intensidade na qual ocorre aumento do consumo de energia (CANT et al., 1993). Onetti e Grummer (2004) utilizaram diferentes fontes de lipídeos e observaram baixa concentração de N-NH₃ ruminal como consequência de dietas com alta quantidade de silagem de milho e presença de AGIs, que pode reduzir o crescimento microbiano e consequentemente o aproveitamento de aminoácidos disponíveis para a glândula mamária e para síntese de proteína. Os autores sugerem que esse menor crescimento microbiano é devido ao fato de as bactérias não utilizarem ácidos graxos como fonte de energia para crescimento e síntese de proteína microbiana.

Em alguns casos a redução no teor de proteína do leite pode ocorrer possivelmente pelo simples efeito de diluição devido ao aumento da produção de leite quando são fornecidas rações com adição de gordura (GARNSWORTHY, 2002), ou por variações nas concentrações

das frações proteicas no leite, como a concentração de caseína, ou nas variações nas concentrações de alguns hormônios que podem promover mudanças fisiológicas que afetam a síntese de proteína do leite (WU; WURBER, 1993).

Wu e Hurber (1993) revisaram dados de 49 experimentos, envolvendo 83 comparações entre rações com e sem adição de lipídeos em vacas leiteiras, e observaram que na maioria dos casos o teor de proteína foi reduzido pela adição de fontes de lipídeos nas rações. Estes autores concluíram que a redução do teor de proteína verificada nos estudos avaliados pode ser explicada em parte pelo aumento da produção de leite, sendo o grau de depressão dependente da fonte de gordura utilizada e resposta a suplementação.

Quando falamos em teor de gordura do leite primeiramente temos que pensar em toda a sua fisiologia de síntese e do perfil de ácidos graxos que a compõem para entender como a suplementação de lipídeos na dieta pode influenciar na sua síntese. Pois a gordura do leite é composta por 97-98% de triglicerídeos, sendo o restante formado por fosfolípides e esteróis. Ela é sintetizada a partir dos AGs obtidos de diversas fontes: dos lipídeos da dieta, da mobilização de triglicerídeos do tecido adiposo ou através da síntese própria, chamada de síntese *de novo*.

A síntese *de novo* é responsável pela produção de AGs de cadeia curta (C4- 10), por aproximadamente 50% dos ácidos graxos de cadeia média (C12-16), os outros 50% vem de AGs pré-formados. Os AGCL (>C18) e 50% dos AGs de cadeia média chegam a glândula mamária através da circulação sanguínea (DEMEYER; DOREAU, 1999). São oriundos dos AGNE advindos da mobilização de gordura corpórea e/ou das lipoproteínas ricas em triglicerídeos (quilomícron e lipoproteína de muito baixa densidade – VLDL) sintetizados pelos enterócitos a partir dos ácidos graxos absorvidos da dieta, em que possui na sua constituição, principalmente os AGs: palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oléico (C18:1) e em menor quantidade o ácido linoleico (18:2), ácido linoleico conjugado (CLA) e ácido linolênico (18:3). De acordo com Palmquist et al. (1993), a quantidade de lipídeo da dieta que é transferida diretamente para a gordura do leite pode ser influenciada por três fatores: biohidrogenação ruminal, absorção (digestibilidade) e deposição de tecido adiposo.

Estudos com a suplementação de óleos ricos, principalmente em ácido linoleico e ácido linolênico mostram que a biohidrogenação além de ter grande influência no perfil de ácidos graxos, tem também no teor de gordura (SANTOS; GRECO, 2010). Segundo Allen (2000) e Chilliard et al. (2007), o desaparecimento dos AGs 18:3, n-3 e 18:2, n-6 no rúmen varia em média 93 a 85%, respectivamente quando estão na forma de óleo.

Santos e Greco (2010) compilaram dados de 11 estudos com vacas em lactação canuladas onde foram avaliados o consumo e o fluxo duodenal de AGs. A ingestão de ácido linoleico variou de 70 a 200 g/dia, mas somente 10 a 50 g/dia chegaram ao duodeno. Por outro lado, até 500 g/dia de ácido esteárico foi observado no duodeno apesar da ingestão na dieta ter sido de apenas algumas gramas. Portanto, a proporção de AGPIs suplementados na forma de óleo que escapam a biohidrogenação ruminal é baixa, geralmente inferior a 20% da quantidade ingerida. Concluindo que a suplementação de vacas com AGPIs na forma de óleo, tem sua absorção intestinal restringida devido a biohidrogenação das bactérias ruminais. Os autores sugerem a suplementação de AGPIs de forma protegida para poder minimizar a ação do processo de biohidrogenação. Segundo o NRC (2001) a estimativa de hidrogenação de AGPIs varia de 60 a 90%, enquanto que a biohidrogenação de suplementos que contém AGPIs podem ser de 30 a 40% quando os AGs são fornecidos como Ca-AGs ou como sementes de oleaginosas (ONITTI; GRUMMER, 2004).

O processo de biohidrogenização do ácido linoleico proposto por Davis e Brown (1970) (Figura 1) mostra que o ácido linoleico sofre isomerização de suas ligações duplas formando isômero que é chamado de ácido linoleico conjugado (CLA), onde se achava que CLA isômero C18:2 *cis*-9,*trans*-11 fosse a única forma de isomeria formada. Com o avanço de técnicas de análises para mensurar perfis de AGs do leite, verificaram-se inúmeros isômeros, (CLA *cis*-8, *cis*-10; CLA *cis*-9, *cis*-11; CLA *cis*-10, *cis*-12 e CLA *cis*-11, *cis*-13) (HUR et al., 2006). Porém, dentro dos isômeros o C18:2 *cis*-9,*trans*-11 é o que contribui com cerca de 80% do total de CLA na gordura do leite (BOMFIM et al., 2006).

Bauman e Griinari (2003) em estudo verificaram que intermediários da biohidrogenização poderiam agir como reguladores no processo de lipogênese da glândula mamária, e verificaram que o aumento da CLA *trans*-10, *cis*-12 no fluxo duodenal e no leite é indicativo de alteração no metabolismo ruminal dos AGs e eles agiriam bloqueando a síntese *De Novo* diminuindo a formação de AGs de cadeia curta e média no leite, causando uma síndrome denominada: Síndrome da queda da gordura do leite. Essa diminuição da síntese de gordura ocorre devido a diminuição da expressão de genes de enzimas responsáveis pela síntese *De Novo* sendo a Δ^9 dessaturase uma delas BAUMGARD et al., 2002).

Dallaire et al. (2014) observou decréscimo da síntese *De Novo* em 62% e diminuição da produção de gordura do leite quando infundiu CLA diretamente no abomaso de vacas, segundo os autores o mecanismo pelo qual o CLA afeta a síntese de gordura de leite envolve dois fatores (1) uma inibição da síntese *De Novo* de AGs na glândula mamária, devido a uma menor expressão das enzimas acetil-CoA carboxilase e AG-sintetase e (2) uma diminuição da

captação de AGs pela glândula mamário e incorporação na gordura do leite, com menor expressão da lipoproteína lipase e proteína de ligação AGs (GERVAIS et al., 2009).

Lopez et al. (2007) avaliaram a inclusão do GSI na dieta de vacas Jersey com 38 dias de lactação, não verificaram diferença entre as dietas experimentais sobre a produção e composição do leite. Vargas et al. (2002) avaliaram vacas da raça Holandesa com 30 dias de lactação e com média de produção de 21kg/dia utilizando diferentes fontes de gordura, incluindo a suplementação de grão de soja em 23,5% da matéria seca total, sendo utilizado silagem de sorgo como volumoso. Estes autores não verificaram efeito do GSI sobre a produção e composição do leite em relação à dieta controle.

Pipero et al. (2000) analisando o CLA da gordura do leite de animais recebendo dieta com adição de óleo de soja, encontraram redução na concentração de C18:2 *cis*-9, *trans*-11 e um aumento nos isômeros C18:2 *trans*-10, *cis*-12 e C18:2 *trans*-7, *cis*-9.

Fuentes et al. (2007) observaram que a dieta com semente de linhaça reduziu as concentrações de ácidos graxos de cadeia média e aumentou os ácidos graxos de cadeia longa no leite comparada com uma dieta controle. A suplementação com linhaça reduziu ácidos graxos saturados e aumentou os ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados no leite. As concentrações totais de ω 3 e C 18:3 foram maiores nas vacas que receberam linhaça quando comparada com as que receberam a dieta controle e a razão de ácidos graxos ω 6: ω 3 no leite foi menor para a dieta com linhaça (4,39 vs. 9,26%).

Estudo conduzido por Barletta et al. (2012), no qual vacas leiteiras foram suplementadas com níveis crescentes de grão de soja, foi observado aumento nos teores de C18:0, também foi verificado aumento nas concentrações de C18:2 *cis*-9, *trans*-11, mesmos resultados observados por Naves (2010); Freitas Jr et al. (2010) e Venturelli et al. (2014).

Greco et al. (2015) em estudos com vacas leiteiras no período de transição e início de lactação com uma suplementação com relação crescente de ω 6: ω 3 na dieta (4:1, 5:1, 6:1) com CA-AGIs observaram queda na produção de leite e de gordura quanto maior foi a relação ω 6: ω 3 na dietas dos animais, mostrando que a relação de AGPI podem influenciar na performance e respostas dos animais.

Gandra et al. (2016 no prelo⁷) não observou alteração na produção e composição do leite quando suplementou vacas no início de lactação com diferentes dietas contendo AGPI,

⁷ GANDRA, J.R.; BARLETTA, R.V.; MINGOTI, R.D.; VERDURICO, L.C.; FREITAS JUNIOR, J.E.; OLIVEIRA, L.J.; TAKIYA, C.S.; KFOURY JUNIOR, J.R.; WILTBANK, M.C.; RENNO, F.P. Effects of whole flaxseed, raw soybeans, and calcium salts of fatty acids on measures of cellular immune function of transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 2016. No prelo.

sendo elas sem inclusão AG, com semente de linhaça, com GSI, com Ca-ácido linoleico. Porém animais que foram alimentados com uma das duas últimas dietas apresentaram aumento nos isômeros C18:2 *trans*-10, *cis*-12 no perfil de ácido graxo do leite.

4.4.3 Perfil metabólico

Variações dos metabólicos sanguíneos em vacas leiteiras no período de transição e início de lactação, permitem estimar o processo de adaptação metabólica a novas situações fisiológicas ou de alimentação. Estudos apontam resultados variados com relação aos efeitos da suplementação de lipídeos nas rações sobre o metabolismo de ruminantes. A absorção intestinal, transporte, metabolismo sistêmico, secreção e deposição de gordura no organismo são aspectos diretamente ligados ao metabolismo de lipídios e podem influenciar os parâmetros sanguíneos em animais recebendo dietas com lipídeos (CHRISTENSEN et al., 1994).

Vacas no período de transição e início de lactação que estão em balanço energético negativo há uma grande mobilização de reservas corporais, fazendo com que aumente AGNE na circulação, além dos AGs advindos da alimentação que são absorvidos no intestino e transportados na forma de quilomicrons e VLDL no sangue. Jenkins e Jenny (1992) concluíram que uma maior concentração de lipídeos no sangue é explicada pelo aumento da gordura absorvida no intestino e/ou por aquela proveniente da lipólise.

O fígado é um órgão de grande importância no metabolismo das gorduras, pois capta do sangue os AGS presentes nos quilomicrons e VLDL que estão presentes em abundância durante a absorção intestinal e os ácidos graxos da mobilização de reservas corporais. Ele pode oxidá-las totalmente e usar como forma de energia; pode oxidá-las parcialmente a corpos cetônicos (acetoacetato, β -hidroxibutirato e acetona) com menor produção de energia; ou reesterificar formando triglicerídeos, que, por sua vez, podem ser exportados para o restante do organismo na forma de VLDL (CADORNIGA-VALIÑO et al., 1997).

Em ruminantes, grande quantidade de corpos cetônicos (β -hidroxibutirato) são produzidos na parede do rúmen, durante a absorção do butirato produzido pela fermentação ruminal. Em vacas bem alimentadas, a produção ruminal é considerada a principal fonte de β -hidroxibutirato plasmático (HEITMANN et al., 1987). No entanto, durante períodos de baixa

ingestão de matéria seca ou balanço energético negativo, os corpos cetônicos plasmáticos são originados principalmente da cetogênese hepática (HEITMANN et al., 1987).

Em vacas lactantes no período de transição, a produção de corpos cetônicos hepáticos se eleva em 50%, enquanto a produção de CO₂ se mantém constante (DRACKLEY et al., 1991). Esses dados mostram que, mesmo com o aumento da cetogênese hepática, a oxidação total dos AGNE se mantém em animais em balanço energético negativo. Em experimento realizado por Cadorniga-Valiño et al. (1997), observou-se que a cetogênese hepática aumenta com o maior fornecimento de lipídeos na dieta, sugerindo que a cetogênese pode ser regulada pela disponibilidade de substrato. Portanto, quanto maior a concentração de AGNE, maior poderá ser a produção hepática e as concentrações plasmáticas de corpos cetônicos. Onde o aumento da ingestão de ácidos graxos para 1 kg/dia resulta em aumento da concentração de AGNE em 81 μM em vacas de lactação e 1 mM ou mais durante o período de transição (DRACKLEY, 1999).

Mandebu et al. (2003) compararam a suplementação de lipídeos na forma de Ca-AGs sendo que as concentrações de AGNE e β-hidroxibutirato durante as duas primeiras semanas pós-parto não sofreram efeito das dietas (Ca-palma e Ca-soja), e os níveis estavam dentro dos limites normais para espécie (DRACKLEY et al., 1998; GARCIA-BOJALIL et al., 1998), resultado semelhante foi observado por Calderas-Torres et al. (2011) porém os autores avaliaram dietas com Ca-Ácido *trans*-octadecenoico e Ca-óleo de cártamo e sem adição de lipídeo. Porém, Ballou et al. (2009) observaram que a suplementação lipídica tendeu a diminuir a concentração plasmática de AGNE, e a concentração plasmática de β-hidroxibutirato foi menor durante o pós-parto para as vacas suplementadas com lipídios (saturados ou insaturados). No entanto o grau de saturação do suplemento lipídico não teve influência sobre os metabólitos sanguíneos. Chen et al. (2015), ao suplementar vacas do período seco até início de lactação com dieta com ou sem inclusão de Ca-AGs, observou um aumento tanto no pré como no pós-parto nas concentrações de AGNE e β-hidroxibutirato plasmático.

Petit et al. (2002), avaliaram a suplementação de Ca-AGs, sementes de linhaça e soja micronizada como fonte de gordura nas rações de vacas leiteiras no início de lactação com rações contendo cerca de 8,0% de EE. Estes autores observaram maior concentração de colesterol, um metabolito sintetizado a partir de AGs, para as vacas suplementadas com Ca-AGs, e baixa concentração para sementes de linhaça. Já Gonthier et al. (2005), observaram aumento do colesterol plasmático e das concentrações de AGNE no sangue para vacas suplementadas com fonte de lipídeo em relação as vacas do grupo controle (sem

suplementação lipídica). Já, Zachut et al. (2010b) não notaram alterações nas concentrações plasmáticas de AGNE.

Bauman e Lock (2006) reportaram que quando se avalia os parâmetros sanguíneos de vacas suplementadas com gordura, pode-se afirmar que durante o período de suplementação são esperados aumentos dos níveis de colesterol total, triglicerídeos, e nas frações de colesterol HDL, LDL e VLDL. Isso ocorreria em função do aumento do nível de lipídeos circulante, sendo estes a forma a qual são transportados na circulação sanguínea. Ingraham e Kappel (1988) enfatizaram que avaliar os níveis plasmáticos de colesterol seria parâmetro a ser utilizado para avaliar a capacidade da vaca em produzir mais leite, uma vez sua concentração reflete a capacidade de mobilização de gordura corporal e ingestão de gordura da dieta para lactogênese. Porém, Fuentes et al. (2007) ao alimentarem vacas no início da lactação com semente de linhaça não observaram alterações nas concentrações de colesterol, triacilglicerol e AGNE aos 40 dias pós-parto quando comparada com o grupo controle. Resultado semelhantes ao de Petit et al. (2004) que não encontraram diferenças nas concentrações de AGNE e colesterol entre vacas que receberam dietas isolipídicas suplementadas com semente de linhaça e Ca-AGs.

Barletta (2010) e Naves (2010) observaram um aumento no colesterol total e colesterol HDL nos parâmetros sanguíneos dos animais que receberam grão de soja cru. Segundo os autores, o aumento da concentração do colesterol total e colesterol HDL no lipidograma do soro pode ser justificado devido ao maior consumo de ácidos graxos nas rações, que proporcionou aumento das respectivas frações relativas ao metabolismo de lipídeos transportadas no sangue. Entretanto, é preciso considerar que além da fase de lactação, o nível de produção também reflete mudanças no padrão do perfil metabólico em vacas em produção. Gonzales e Rocha (1998) enfatizaram que vacas de alta produção apresentam níveis sanguíneos de colesterol significativamente mais elevados comparados com vacas de baixa produção.

Além dos metabólitos relacionados ao lipidograma, a determinação da concentração de nitrogênio e ureia circulante é importante para avaliação do balanço de nitrogênio da ração fornecida, pois reflete parte do metabolismo ruminal de proteínas, além de possibilitar avaliação do balanço de proteína/energia da dieta (GONZALES; ROCHA, 1998). Drackley et al. (1992) e Elliott et al. (1993) avaliaram a suplementação de gordura em vacas Holandesas e não observaram mudanças nas concentrações de uréia no sangue dos animais. De acordo com Schuff et al. (1992a), mudanças nas concentrações de ureia e nitrogênio plasmático poderiam ser atribuídas às baixas concentrações de nitrogênio amoniacal ruminal.

4.4.4 Balanço de energia e nitrogênio

A suplementação com gordura é comumente utilizada para dietas de vacas em lactação para atender ao aumento da necessidade ingestão de energia durante o início da lactação e conseguir retornar a um balanço energético positivo o mais rápido possível. Se a vaca pode consumir a energia suficiente através da alimentação, logo, o custo em termos de energia é simplesmente o custo de transformar a energia da alimentação para o leite menos o custo de suportar as funções corporais obrigatórias da vaca. No entanto, se a vaca não consumir os nutrientes necessários, o custo energético de produção de leite deve então incluir o custo da energia de catabolizar o tecido do corpo para torná-lo disponível para a produção de leite.

O termo “balanço de energia” é comumente utilizado para descrever o estado energético de vacas leiteiras, que é o resultado do fluxo de energia; o BEN está associado com a perda de energia corpórea e o balanço de energia positivo está associado com o ganho de energia corpórea. Vacas perdem tecido corpóreo e, portanto, energia no período de transição e início de lactação, normalmente retomando o balanço positivo de energia a partir dos 40 aos 80 dias pós-parto (COFFEY et al., 2001; CALDARI-TORRES, 2011). Kendrick et al. (1999) relataram que o retorno ao balanço positivo de energia foi aos 21 dias ou 49 dias com dietas de alta ou baixa energia, respectivamente.

Zachut et al. (2010a) observaram que a suplementação com uma fonte de lipídeo na dieta (semente de linhaça) em vacas no período de transição até 100 dias de lactação não teve efeito na média de peso corpóreo no pré-parto, porém no pós-parto as vacas do grupo controle perderam mais peso corpóreo do que as vacas do grupo alimentado com fonte de lipídeo, aos 100 dias de lactação as vacas suplementadas estavam 32,2 kg em média, mais pesadas que as do grupo controle. Quando analisado o escore de condição corpóreo (ECC) observou-se que as vacas suplementadas com lipídeos começaram a ganhar ECC em média após 6 semanas do parto, enquanto que as vacas do grupo controle continuaram perdendo ECC até a oitava semana pós-parto. E o balanço de energia (BE) calculado durante os 100 dias de lactação foi 1,5 Mcal maior no grupo alimentado com semente de linhaça comparando-se com o grupo controle (2,3 e 0,8 Mcal/d respectivamente). Resultado semelhante, foi encontrado por Calderi-Torres et al. (2011), com a suplementação de Ca-cártamo onde os animais

apresentaram melhor BE com superação do BEN 7 dias antes que animais alimentados com dieta controle.

Gandra et al. (2014) ao suplementar vacas leiteiras no período de transição até 84 dias de lactação, com quatro diferentes dietas, onde três delas havia fontes diferentes de lipídeos (semente de linhaça, GSI e Ca-ácido linoleico) observou que vacas alimentadas com a dieta controle só superaram o BEN aos 63 dias, enquanto que as suplementadas com fontes de lipídeos superaram aos 45 dias. Resultados similares foram obtidos em experimento com vacas no pós-parto com dietas de 11% de semente de linhaça integral, onde as vacas suplementadas com linhaça tiveram maior balanço energético do que as da dieta sem semente (PETIT et al., 2007).

O metabolismo de nitrogênio em vacas no período de transição está relacionado com a mobilização das reservas corporais, onde a utilização de nitrogênio de origem corporal é processado através da *turn-over* de aminoácidos (VANDEHAAR et al., 1999).

No início da lactação ocorre uma maior utilização dos aminoácidos musculares principalmente os aminoácidos glicogênicos visando suprir o déficit de energia fisiológico dos animais neste período, também há utilização em maior escala dos aminoácidos essenciais para a produção de leite devida à condição homeorrética das vacas leiteiras para a produção de leite, alguns aminoácidos também podem ser utilizados no metabolismo da lactose na glândula mamária, visto a intensa metabolização de glicose pelas vacas no início da lactação (OVERTON; WALDRON, 2004). Desta forma há também um balanço de nitrogênio negativo entre os dias -7 até 14 em relação ao parto (GRUMMER, 1995). Este balanço negativo pode se estender até a sexta semana pós-parto dependendo do consumo de matéria seca, produção de leite e dieta base utilizada em vacas leiteiras no período de transição (CHIBISA et al., 2008).

Outro evento metabólico que contribui para o balanço negativo de nitrogênio em vacas leiteiras no período de transição, está relacionado com a sobrecarga de metabolização hepática de gordura neste período, com consequente aumento de excreção de nitrogênio na urina. A intensa oxidação de ácidos graxos no tecido hepático com consequente geração de corpos cetônicos, deprime a transformação de amônia em ureia, diminuindo consideravelmente o *pool* de reciclagem de ureia via saliva, aumentando a concentração de nitrogênio na urina. A excreção de nitrogênio na urina também contribui para a intensificação do balanço energético negativo neste período, pois para cada grama de N excretado via urina são gastos 7,2 Mcal de energia metabolizável (NRC, 1989).

A retenção de nitrogênio do pré-parto de vacas leiteira sempre será positivo, mesmo com o início do déficit energético já ocorrendo próximo ao parto, a retenção nesta fase fica em torno de 17,5 a 27,5 gramas/dia em dieta tradicionais de close-up com cerca de 15% de proteína bruta e 1000g de proteína metabolizável. Já no pós-parto imediato a retenção pode ficar negativa chegando a déficits de até 120 gramas/dia por volta da 1^a a 2^a semana de lactação com produção média de 38,5 kg/dia, voltando a patamares positivos por volta da 5^a a 6^a semana, juntamente com início do restabelecimento do consumo de matéria seca (CHIBISA et al., 2008).

Gozho e Mutsvangwa (2008) avaliaram a suplementação de 8,3% de óleo de canola na matéria seca total nas dietas de vacas Holandesas no início de lactação, utilizando dietas com 5,2% de extrato etéreo na matéria seca. Estes autores não verificaram efeito do óleo sobre o balanço de nitrogênio dos animais suplementados. Elliott et al. (1993) avaliaram a suplementação de sebo e óleo de milho em 2,5 e 5,0% na matéria seca total de vacas leiteiras canuladas no rúmen, e não verificaram alterações na utilização de nitrogênio.

Naves (2010) avaliando a inclusão de 20% de grão de soja na dieta, não obteve nenhum efeito no balanço de nitrogênio relacionando com o coeficiente de digestibilidade da proteína bruta. Assim como Freitas Jr (2012), ao comparar diferentes fontes de $\omega 6$ na dieta de vacas (controle, óleo de soja, Grão de soja, Sais de cálcio) não observou diferença no balanço de nitrogênio entre os tratamentos.

Barletta et al. (2012) ao avaliar diferentes porcentagens de inclusão de grão de soja integral na dieta de vacas (0, 8%, 16% e 24% com base na MS) observou uma diminuição no consumo de nitrogênio total com a inclusão do grão de soja relacionando a diminuição do consumo de matéria seca de vacas em lactação, porém o balanço de nitrogênio não alterou com as fontes de gordura, e os animais que consumiram a ração com 16% de inclusão apresentaram os melhores resultados de balanço de nitrogênio.

4.5 ÁCIDOS GRAXOS $\omega 6$ E QUALIDADE OOCITÁRIA E EMBRIONÁRIA DE VACAS LEITEIRAS

A nutrição afeta cada processo fisiológico no organismo. Assim, não é de surpreender que a nutrição também tenha implicações importantes no sistema reprodutivo. A suplementação de dietas de vacas leiteiras no período de transição e início de lactação com

lipídeos tem grande influência sobre o sistema reprodutivo, pensava-se que influenciava apenas pelo fato de diminuir o BEN das vacas, e consequentemente os efeitos deletérios dos AGNE séricos no sistema reprodutivo, principalmente na qualidade e desenvolvimento folicular (BUTLER; SMITH, 1989), porém Thatcher et al. (2003) justifica a suplementação de AGs específicos na dieta de vacas nesse período devido a funções específicas do processo reprodutivo, não relacionada a energia.

Assim, com o objetivo de estudar a função desses ácidos graxos específicos, principalmente os da família $\omega 3$ e 6, aumentaram o número de estudos na última década relacionando nutrição e reprodução.

4.5.1 Síntese de hormônios reprodutivos

4.5.1.1 Prostaglandina $F_{2\alpha}$

A síntese de prostaglandinas, principalmente a prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) ocorre em maior parte nas células epiteliais do endométrio uterino, e ela tem uma função importante nas contrações uterinas durante o parto, pós-parto e na regressão uterina. Pois quanto mais rápido o útero conseguir expulsar os mecônios resultantes do parto e involuir, mais cedo estará apto a uma nova gestação. Além disso, a $PGF_{2\alpha}$ age na luteólise do corpo lúteo no ovário. Ela é obtida a partir do ácido araquidônico que por sua vez é obtido a partir do ácido linoleico.

Estudos têm demonstrando uma forte correlação na saúde uterina no pós-parto recente com a suplementação de ácido linoleico, pois este se incorporaria primeiramente nos fosfolipídios constituintes do tecido endotelial (CERRI et al., 2009a), e alterações nas concentrações destes poderiam modular a secreção de $PGF_{2\alpha}$ no endométrio, aumentando a secreção em até 30% (CULLENS et al., 2004). Elmes et al. (2004) ao suplementar ovelhas prenhes no pré-parto com uma dieta enriquecida com ácido linoleico protegido observaram aumento nas proporções de ácido araquidônico no endométrio e no corioalantóide, e na secreção de $PGF_{2\alpha}$.

Segundo Guilbault et al. (1984), o aumento de $PGF_{2\alpha}$ durante o purpério pode ser demonstrado por aumentos drásticos na concentração do metabólito 13, 14 diidro, 15-ceto $PGF_{2\alpha}$ (PGFM) no plasma nas vacas, que é um metabólito da $PGF_{2\alpha}$. Os níveis plasmáticos de PGFM atingem um pico a concentrações >1 ng/ml no período de 1 a 4 dias após o parto e

caem progressivamente até o dia 15 do pós-parto (GUIBAULT et al., 1984), à medida que o volume uterino diminui e o tecido caruncular (principal fonte de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no útero) começa a descamar. Seals et al. (2002) demonstraram que as concentrações de PGFM no plasma jugular apresentaram-se mais elevadas nos primeiros 6 dias do pós-parto (dpp) em vacas que não desenvolveram infecções uterinas (2160 pg/ml) em comparação a vacas que desenvolveram endometrite (1450 pg/ml) entre 15 e 21 dias do pós-parto. Do mesmo modo, os níveis médios de PGFM no plasma antes do início dos tratamentos com antibióticos sistêmicos (em média, no dia 5 do pós-parto) foram menores nas vacas diagnosticadas com metrite em comparação às vacas sem metrite (SILVESTRE et al., 2009).

A tentativa de verificar a saúde uterina no pós-parto, Cullens et al. (2004) e Juchem et al. (2010) suplementaram vacas com sais de cálcio de $\omega 6$ na dieta de vacas no pré e pós-parto recente. Os primeiros encontraram uma redução na incidência de doenças (8,3% vs. 42,9%), como retenção de placenta e metrite em comparação com vacas não suplementadas, e o segundo encontrou redução na chance de metrite (8,8% vs. 15,1%) em relação a vacas não suplementadas. Dirandeh et al. (2013) também suplementaram vacas com fontes de ÁGs protegidos (Ca-óleo de Palma, semente de linhaça extrusada e grão de soja tostado) no início de lactação, observaram redução no tempo de involução uterina, menor porcentagem de vacas com endometrite clínica além de maior concentração de PGFM no início da lactação nos animais suplementados com grão de soja tostado. Porém, Silvestre et al. (2011) em uma tentativa semelhante, suplementaram mais de 500 vacas com Ca- $\omega 6$, no entanto, a incidência de retenção de placenta (10,1%), metrite (17,4%), e de descarga purulenta cervical (29%) não diferiram entre os tratamentos, mas observaram aumento na produção de PGFM do quarto ao sétimo dia pós-parto quando comparado aos animais não suplementados, ainda observaram maior concentração de ácido linoleico nos tecidos caruncular e cotiledonar placentário, justificando a maior produção de PGFM.

4.5.1.2 Progesterona

A progesterona (P_4) é um hormônio esteroide, lipossolúvel e derivada do colesterol e este é um lipídeo sintetizado a partir de AGs considerados essenciais (ácido linoleico e ácido linolênico) (WEHRMAN et al., 1991). A P_4 é sintetizada no ovário pelo corpo lúteo (CL), placenta e córtex da glândula adrenal. Além dos efeitos

hormonais, P_4 atua como precursora dos estrogênios, androgênios e esteroides do córtex da glândula adrenal (HAFEZ; HAFEZ, 2004). É considerado por alguns o hormônio mais importante nas fêmeas para o estabelecimento da gestação (SWEENSON; REECE, 1996).

Altas concentrações de progesterona circulante imediatamente após a concepção têm sido associadas ao alongamento do conceito e maiores taxas de prenhez em vacas (DISKIN; MORRIS, 2008) e ovelhas (SATTERFIELD et al., 2006). Esse melhor desempenho tem sido atribuído à redução da mortalidade embrionária na fase crítica do embrião. Pesquisas indicam que a taxa de fertilização em vacas em início de lactação é de até 90%. Entretanto, a taxa de nascimento médio é de até 55%, sendo que a maioria dessa perda ocorre entre o dia oito e o dia 16 após a inseminação (DISKIN; MORRIS, 2008). Carter et al. (2008) verificou que um aumento de cinco vezes nas concentrações de progesterona sistêmicas em vacas pós concepção inicial observou um maior aumento no tamanho do embrião nos dias 13 e 16 em relação a animais com concentrações menores. Por outro lado, um atraso no aumento pós-ovulatório de progesterona tem sido associado com a diminuição da taxa de prenhez, tanto em vacas e novilhas leiteiras (em DISKIN; MORRIS, 2008). Assim, progesterona pode influenciar a secreção uterina de nutrientes e fatores de crescimento que são essenciais para o início do desenvolvimento embrionário. De acordo com estudos, suplementação de progesterona durante o início da gestação, melhora a taxa de concepção de vacas leiteiras (MANN; LAMMING, 1999).

Com o objetivo de verificar o efeito da suplementação de $\omega 3$ e $\omega 6$ na dieta sobre a produção e/ou circulação de colesterol e progesterona em vacas leiteiras, autores (RYAN et al. 1992; STAPLES et al., 1998) observaram aumento no colesterol plasmático, no colesterol do fluido folicular e no do CL, e na progesterona sérica. Como o colesterol é um precursor da síntese de progesterona pelas células ovarianas, as lipoproteínas de alta e baixa densidade levam o colesterol para os tecidos do ovário para a esteroidogênese (GRUMMER; CARROL, 1991).

Caldari-Torres et al. (2011) examinou metabólicas, endócrinas e respostas produtivas em vacas alimentadas com AGS ou ácido linoleico. Os tratamentos dietéticos foram de 28 dias pré a 49 dias pós-parto. O suplemento rico em ácido linoleico aumentou as concentrações plasmáticas de IGF-1 e de glicose, aumentou a concentração de progesterona no plasma, bem como uma elevação numérica na insulina em comparação com as vacas que receberam o suplemento de AGS. Segundo os autores tal padrão pós-parto seria propício para estimular o melhor desenvolvimento folicular ovariano.

No entanto, estudos com vacas suplementadas com AGPI apresentam resultados variados referente a sua ação na secreção de progesterona (THATCHER; SANTOS; STAPLES, 2011). Assim, investigações mais minuciosas são necessárias, pois muitas o aumento sérico da progesterona pode ocorrer pela diminuição de sua depuração e não por um aumento da síntese (HAWKINS et al., 1995).

4.5.2 Qualidade oocitária

A foliculogênese é definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, iniciando-se com a formação do folículo primordial e culminando com o estágio de folículo maturado, também chamado de folículo *De Graaf* ou folículo dominante. Ela se dá simultaneamente à oogênese, quando o oócito se encontra entre as fases de prófase I e metáfase II. De acordo com Ireland (1987) a foliculogênese é um processo complexo que envolve a formação e crescimento de folículos primordiais até o estágio de folículos pré-ovulatórios. Este processo pode ser dividido nas fases pré-antral e antral. Na fase pré-antral, ocorre à ativação dos folículos primordiais e posterior crescimento para os estágios de folículos primários e secundários. Já a fase antral tem início com o aparecimento do antro nos folículos terciários e termina com a formação do folículo pré-ovulatório ou de *De Graaf*. De acordo com Britt (1994), o período necessário para um folículo primordial desenvolver até se tornar um folículo terciário é de 80 a 100 dias e de um folículo terciário até um folículo pré-ovulatório de 42 dias. Estudos recentes (HUTCHINSON et al., 2012; PONTER et al., 2012; RODNEY et al., 2015), em bovinos, estão correlacionando à suplementação de gordura sobre a influência no desenvolvimento de folículos antrais, porém são escassos os estudos e informações concernentes à foliculogênese na fase pré-antral.

Nesse sentido, os estudos tentam mostrar os efeitos nocivos do balanço energético negativo prolongado sobre os parâmetros reprodutivos de vacas leiteiras no período de transição e início de lactação, principalmente no pós-parto recente.

Considerando o estado de energia de animais em lactação definido como a ingestão de energia líquida do animal menos a energia líquida necessária para a manutenção e a necessária para a produção de leite. Segundo, Randel (1990) o BEN prolonga o anestro pós-parto e reduz a frequência de pulsos do hormônio LH, que é necessário para o crescimento e ovulação de folículos ovarianos no estágio de dominância nos ruminantes (SCHILLO, 1992).

Achava-se que só pelo fato de melhorar o BEN dos animais neste período poderia melhorar a secreção de LH pelos mesmos.

No entanto, Lucy et al. (1993) ao suplementar vacas com duas dietas isoenergéticas, uma com suplementação de lipídeos e outra sem, observou maior tamanho de folículos pré-ovulatórios nos animais com lipídeos. Sugerindo que o maior crescimento dos folículos foi devido a uma maior secreção de LH, nos animais que receberam lipídeos na dieta (SKALAN et al., 1994). Porém, Oldick et al. (1997) ao infundirem diretamente no abomaso de vacas AGIs observaram crescimento mais rápido e maior diâmetro dos folículos quando comparada com vacas infundidas com AGS. Mostrando que AGs específicos afetavam a secreção de LH e consequentemente o crescimento folicular. Assim, Staples et al. (2000) e Bilby et al. (2006a) observaram aumento no diâmetro do folículo dominante em vacas alimentadas com dietas com AGPIs em comparação com dietas com AGs monoinsaturados, sugerindo um efeito diferencial dos AGPIs folicular e secreção de LH.

Dirandeh et al. (2013) ao suplementar vacas de alta lactação com diferentes fontes de AGs, entre elas: saturado (Ca-óleo de palma), $\omega 3$ (semente de linhaça extrusada) e $\omega 6$ (grão de soja tostado), no início de lactação observaram nos animais que receberam $\omega 6$ menor quantidade de cistos foliculares, maior quantidade de folículos com $>10\text{mm}$ e folículos ovulatórios, ainda maior tamanho de corpo lúteo. Da mesma forma Juchem (2007), alimentou vacas multíparas com diferentes fontes de lipídeos na dieta, sebo ou Ca-AGs contendo ácido palmítico ou ácido linoleico e transoctadenóico, e não observou nenhuma diferença na proporção de vacas ciclando aos 65 dias pós-parto, porém observou maior diâmetro de folículo pré-ovulatório nas que receberam Ca-AGs- ácido transoctadenóico.

No entanto, autores sugerem que além da ação na secreção do LH, os AGPIs podem ter ação direta no folículo, pois eles compõem boa parte do fluido folicular e membrana do oócito (HOMA et al., 1992; THATCHER; SANTOS; STAPLES, 2011). Pois a quantidade de lipídeos no oócito de ruminantes é aproximadamente 20 vezes maior do que a do rato (76 vs 4 ng), e os oócitos de ruminantes são compostos de aproximadamente 50% de triacilgliceróis, 20% de fosfolípido, 20% de colesterol e 10% de ácidos graxos livres (Mc EVOY et al., 2000). Estudos demonstraram (KIM et al., 2001; ZERON et al., 2002) que o C16:0 e C18:1 foram os ácidos graxos mais abundantes na fração fosfolipídica dos oócitos de bovinos e podem funcionar como uma reserva de energia, onde os AGPIs compõem menos de 20% do total de AGs, sendo o C18:2 n-6 o mais abundante destes. Assim, Bilby et al. (2006) sugeriu que alterando o teor de ácidos graxos total da dieta pode ocorrer alteração sobre a distribuição de ácidos graxos foliculares e consequente alteração na qualidade oocitária.

Em estudo *in vitro*, Marei et al. (2009), incorporaram ao meio de maturação do oócito o ácido α -linolênico e observaram um aumento da expansão das células do *cumulus* e desenvolvimento de oócitos até a metáfase II. Ainda os autores sugeriram que em consequência disso houve aumento das taxas de clivagem no embrião que se formou na sequência com melhora no desenvolvimento do blastocisto e aumento do número de células, tanto na massa celular interna como do trofotoderma. Em contraste, Marei et al. (2010), ao suplementarem o meio de maturação do oócito bovinos com ácido linoleico observaram um prejuízo ao desenvolvimento do oócito e subsequente inibição do desenvolvimento inicial embrionário.

4.5.3 Qualidade embrionária

O período que compreende o intervalo entre a fecundação do oócito e a implantação do conceito é denominado de período de pré-implantação, estes estádios iniciais de desenvolvimento embrionário é caracterizado por clivagens sucessivas, ativação da transcrição embrionária e eventos morfogenéticos de compactação e cavitação, que culminam com a formação do blastocisto (WATSON et al., 2004). Durante esse período, ocorrem interações complexas entre o ovário, o endométrio e o embrião, que são necessárias para o estabelecimento da gestação (GOFF, 2002).

A mortalidade do embrião em estágio inicial de desenvolvimento é reconhecida como a maior causa de falha reprodutiva em ruminantes, onde maioria destas ocorrendo entre os dias oito e 16 após a fecundação (DUNNE et al., 2000). Suas causas são de diversas origens e podem ocorrer devido a problemas inerentes ao próprio embrião e/ou ao ambiente uterino (WALSH; WILLIAMS; EVANS, 2011). E poucos estudos têm investigado os efeitos da suplementação de lipídeos na qualidade e desenvolvimento do embrião em vacas leiteiras em lactação. Mas estes indicam que a suplementação dietética com AGIs podem melhorar a qualidade e desenvolvimento do embrião (SANTOS et al., 2009).

Estudos mais antigos nessa área tentavam correlacionar a nutrição com a ocorrência de problemas de sinalização conceito-maternal, pois este fato poderia favorecer o desenvolvimento assincrônico do embrião, ou mesmo o retardamento no seu crescimento, e ainda falha na produção de concentrações fisiológicas de interferon tau (hormônio produzido pelo embrião) (SPENCER et al., 2004). Mas, atualmente estudos tentam correlacionar à

composição dos AGs que compõem o oócito e o embrião (RODNEY et al., 2015), pois muitos desses AGs têm a função de nutrir o embrião durante seu desenvolvimento nos primeiros dias, e também sobre o conteúdo de fosfolípidos da membrana celular destes, que desempenham um papel essencial no desenvolvimento durante e após a fertilização. No entanto, a maioria desses estudos são fundamentados por estudos *in vitro* (MAREI; WHATES; FOULADI-NASHTA, 2010; PONTER et al., 2012). Marei et al. (2009) ao incorporarem ácido α -linolênico ao meio de maturação de oócitos, observaram melhor desenvolvimento embrionário, fato este não observado quando suplementou com ácido linoleico (MAREI; WHATES; FOULADI-NASHTA, 2010).

Em estudos onde foi realizada a suplementação com AGs e seu efeito sobre a qualidade embrionária os resultados foram variados. Fouladi-Nashta et al. (2007) alimentaram vacas em lactação com Ca-óleo de palma, os folículos foram aspirados, maturados, fecundados e cultivados *in vitro*. Observaram maior porcentagem de oócitos desenvolvidos em blastocistos nos animais alimentados com a com sais de cálcio e esses blastocistos tinham maior quantidade de células, devido ao aumento da população de células trofoectoderma.

Bilby et al. (2006a) não foram capazes de demonstrar diferentes efeitos da dieta com fonte de $\omega 6$ sobre a qualidade do embrião após a MIV e FIV com vacas em lactação no verão. Porém os autores sugerem que as respostas *in vitro* podem não necessariamente imitar as respostas *in vivo*, podendo mascarar os potenciais efeitos das fontes de AGIs sobre o desenvolvimento embrionário. Além disso, os autores relatam que vacas submetidas estresse térmico, por exemplo, podem comprometer o oócito e subsequente a qualidade do embrião, limitando assim os benefícios potenciais da ação dos AGs.

Thangavelu et al. (2007), ao alimentarem vacas superovuladas em lactação com fonte de lipídeo saturado e com fontes de lipídeos ricos em ácidos graxos insaturados, $\omega 3$ e $\omega 6$, verificaram que a taxa de fertilização e número de embriões transferíveis não diferiram; no entanto, o desenvolvimento do embrião foi melhor em vacas alimentadas com dietas contendo AGIs.

Zachut et al. (2010b) trabalharam com vacas leiteiras com média de 114 dias de lactação, onde compararam a influência de dois produtos comerciais contendo sais de cálcio, um rico em AG- $\omega 3$; outro rico em AG- $\omega 6$, e outra dieta sem adição de AGs, sobre a quantidade e qualidade oocitária e embrionária. Os autores observaram maior número de oócitos aspirados e maior taxa de clivagem dos embriões para as dietas contendo ácidos graxos em relação a controle.

Gandra (2012) ao suplementar vacas durante o período de transição e início de lactação, com quatro diferentes dietas utilizando fontes de $\omega 3$ e $\omega 6$ (controle; semente de linhaça; GSI e Ca-ácido linoleico), observou maior produção de embriões nas suplementadas com $\omega 3$.

Assim, estudos sugerem que a suplementação de vacas com ácidos graxos insaturados pode melhorar a qualidade e desenvolvimento do embrião. Porém mais estudos precisam ser realizados, principalmente, que aumentem o período de suplementação.

4.6 ÁCIDOS GRAXOS $\omega 6$ SOBRE A FUNÇÃO IMUNE DE VACAS LEITEIRAS

O sistema imune é composto basicamente por dois sistemas responsáveis, que trabalham de forma sincronizada, sequencial e complementar para prevenir doenças, chamados de sistema inato e adquirido (CARROL; FORSBERG, 2007). O sistema imune inato é formado por mecanismos imediatamente disponíveis, que combatem os primeiros estágios da infecção associada a patógenos, como bactérias, vírus, protozoários ou fungos. Através da implantação dessa resposta defensiva inicial do sistema inato, ganha-se tempo para permitir que o sistema imune adquirido desenvolva resposta dos anticorpos contra patógeno específico para mediar efeitos citotóxicos específicos para a proteção, onde o desenvolvimento de anticorpos contra patógenos específicos requer vários dias ou até semanas (TIZARD, 2014).

Os sistemas inato e adquirido não são entidades funcionais separadas e independentes. Esses dois braços comunicam-se entre si e, até certo ponto, dependem de moléculas de comunicação semelhantes. Por exemplo, a ativação de leucócitos por patógenos invasores faz com que os neutrófilos liberem interleucinas que, por sua vez, estimula o sistema adquirido (ARMADORI et al., 2015).

Os leucócitos são as células que constituem o sistema imune, responsável por proteger o organismo. Eles são divididos em dois grandes grupos: granulócitos e os mononucleares. Os granulócitos apresentam grânulos específicos em seu citoplasma e são classificados em três tipos, conforme a afinidade dos grânulos: neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Já os mononucleares em monócitos e linfócitos. Os linfócitos são divididos em linfócitos T e linfócitos B. E entre os linfócitos T, temos os Linfócitos T helper e T citotóxico, basicamente (TIZARD, 2014).

Granulócitos e monócitos constituem parte do sistema imune inato, já os demais constituem parte do sistema imune adquirido, sendo a comunicação entre os dois sistemas complexa, envolvendo o contato de células (receptores) e substâncias químicas (CALDER et al., 2002). De uma forma mais específica as células do sistema imune podem ser divididas em subpopulações levando em consideração marcadores específicos expressos na superfície celular, identificados como CD, do inglês, “cluster of differentiation”.

A CD é um conjunto de moléculas marcadoras da superfície celular e são usadas para diferenciar variados tipos de células. Moléculas CD podem agir de diferentes modos, geralmente como receptoras ou como ligantes (moléculas que ativam um receptor). Uma cascata de sinalização normalmente é iniciada, alterando o comportamento da célula. Algumas proteínas CD não têm papel na sinalização, desempenhando outras funções, como a adesão celular (ZOLA et al., 2007).

Os neutrófilos (CD138⁺) compõem a parte do sistema imune inato que atua sobre os antígenos de forma não-específica, como primeira linha de defesa contra patógenos. A migração de neutrófilos para fora dos vasos sanguíneos é um processo gradativo. Inicialmente, a captura e a adesão aos vasos são mediadas por selectinas (por exemplo, L-selectina), que mantêm a marginalização dos neutrófilos ao endotélio vascular. Após essa etapa inicial, o neutrófilo precisa ser ativado por quimioatrativos (interleucinas e leucotrienos) e a supra-regulação de integrinas para firme adesão ou ligação dos neutrófilos ao endotélio. A forte ancoragem do neutrófilo ao sítio de inflamação permite que as células deixem o sangue circulante e penetrem nos tecidos através de diapedise. Ao chegarem ao sítio de infecção, os neutrófilos podem então internalizar e eliminar muitos microorganismos através da atividade fagocítica, que consiste na formação de um fagossomo, no qual são secretadas espécies oxigênio-reativas ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e $HOCl^{\cdot}$) e enzimas hidrolíticas (THATCHER et al., 2010).

A suplementação de lipídeos na dieta pode afetar a função imunológica através da modulação da resposta imune inata, como fagocitose e explosão oxidativa dos neutrófilos e macrófagos, bem como os efeitos sobre a resposta imune adaptativa, a qual incluem a produção de citocinas e de eicosanóides, efeitos linfoproliferativas, e mudanças nas respostas humorais (TIZARD, 2014). Estes efeitos imunomoduladores são atingidos através da incorporação de ácidos graxos na membrana de células imunológicas, resultando numa alteração no perfil dos ácidos graxos na membrana destas células. Isto permite que a célula responda de forma diferente a estímulos externos (CALDARI-TORRES, 2009). Pois as células imunes apresentam um perfil de ácidos graxos de aproximadamente 20% de ácido

araquidônico (ARA; C20:4n-6), 2% de ácido eicosapentaenoico (EPA; C20:5n-3), e 0.8% de ácido docosahexaenóico (DHA; C22:6n-3) (MILES et al., 2004).

A manipulação do perfil de AGs das células através da alimentação já foi demonstrado em alguns estudos, Calder (2007) trabalhando com humanos demonstrou que a suplementação com $\omega 6$ alterou o perfil de ácidos graxos dos leucócitos, com um aumento de ARA especificamente. Num estudo realizado por Yaqoob (2000), também com seres humanos, com 2,1 g de EPA + 1,1 g de DHA/d de óleo de peixe por 12 semanas resultou em um aumento de 4 vezes o EPA em leucócitos, acompanhado por um aumento significativo de DHA e menos expressivo de ARA. Estudos com animais estão de acordo com os resultados de estudos em seres humanos. Alimentando porcos em crescimento com uma dieta contendo 5% de óleo de girassol por 40 dias resultou em maiores quantidades de ARA e menores de AGs $\omega 3$ na membrana de leucócitos quando comparados com os animais alimentados com uma dieta contendo 5% de óleo de peixe (THIES et al., 1999).

Esta mudança na composição de AGs na membrana de leucócitos tem grandes efeitos sobre a produção de eicosanóides pelas células do sistema imunológico. Os eicosanóides são moléculas inflamatórias produzidas a partir da oxigenação de vinte carbonos de ácidos graxos essenciais. O tipo de AGPI usado como precursor para a síntese de eicosanóides irá ditar a atividade biológica do produto final, sendo os eicosanóides derivados de AGs $\omega 3$ biologicamente menos ativos do que os derivados de AGs $\omega 6$ (CALDER et al., 2002). Assim o resultado da relação $\omega 6:\omega 3$ encontrada na membrana dos leucócitos é o que determina a potência da resposta que será realizada pela célula imune (CALDARI-TORRES, 2009).

Os eicosanóides podem ser divididos em quatro famílias: prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos e leucotrienos. Já está bem estabelecido que os eicosanóides são derivados do ARA, e que os AGPI $\omega 3$ podem inibir o metabolismo do ARA e proporcionar eicosanóides com menor atividade biológica (CALDER et al., 2002). E que o ácido linoléico passa por etapas de alongamento da cadeia e dessaturação, formando produtos n-6 diferenciados, como os ácidos dihomô- γ linolênico (C20:3n-6) e ARA. Do mesmo modo, o ácido α -linolênico (C18:3n-3) pode formar produtos n-3, como EPA e o DHA (BIONAZ et al., 2012).

Pesquisas sobre os efeitos nutracêuticos dos AGPIs foram realizadas com AGs $\omega 3$ e $\omega 6$, porque estes têm demonstrado efeitos contrário na produção de mediadores inflamatórios tais como o PGE₂ (TREBBLE et al., 2003), LTB₄ e LTE₄ por células inflamatórias

(LESSARD et al., 2004). Os AGs $\omega 3$ quando chegam na circulação, pela ação das células imunes eles podem ser transformados em EPA e incorporados na membrana celular, competindo com a ARA para ser metabolizado pelas enzimas ciclo-oxigenase (COX) ou lipoxigenase (LOX) (BAGGA et al., 2003). A consequência disso é a produção de prostaglandinas e leucotrienos de menor atividade biológica que aqueles derivados do ARA. Já o ácido ARA produz mediadores inflamatórios como as prostaglandinas da série 2 (PGF₂, PGE₂) e os leucotrienos da série 4 (LTB₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄) pela ação da enzima fosfolipase 2 (PLA₂) (BIONAZ et al., 2012). A ação das enzimas COX e LOX sobre EPA resulta na formação de prostaglandinas da série 3 e leucotrienos da série 5 (LTB₅) que são biologicamente menos ativos do que os mediadores inflamatórios derivados do ARA. LTB₅ são de 10 a 100 vezes menos potente como um agente quimiotático de neutrófilos do que o LTB₄ (JAMES et al., 2000), enquanto PGE₃ é menos potente do que PGE₂ em induzir a expressão do gene de COX-2 em fibroblastos e produção de IL-6 em macrófagos (BAGGA et al., 2003).

Mecanismos envolvidos na regulação da resposta imune não estão completamente entendidos, mas evidências que os ácidos graxos $\omega 6$ e $\omega 3$ influenciam a comunicação e a ativação através da síntese de prostaglandinas, fator de necrose (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ) e outros fatores como o óxido nítrico existem e estudos visam elucidar isto (RABOISSON et al., 2014).

4.6.1 Fagocitose

A fagocitose é fundamental para a resposta imune do hospedeiro. É a primeira fase na eliminação dos patógenos invasores, uma vez que envolve o aprisionamento destes. São realizadas primeiramente pelas células do sistema imune inato (por exemplo, neutrófilos, macrofagos/monócitos). Ao fagocitarem há uma destruição intracelular subsequente do patógeno gerando peptídeos que podem ser apresentadas em conjunto com MHC (complexo maior de histocompatibilidade) às células T, para iniciar a resposta imune adquirida ao patógeno (TIZARD, 2014). A fagocitose envolve a ligação do agente patogênico ou de organismos patogênicos por complemento ou anticorpo revestido a receptores na superfície do fagócito e subsequente invaginação da membrana celular em torno do patógeno em última

análise, de modo a formar um vacúolo fagocítico. No vacúolo fagocítico espécies reativas de oxigênio (ERO) que apresentam alto poder tóxico ao patógeno fagocitado são liberadas. Entre elas destacam-se a óxido nítrico (NO), anión superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (JANEWAY et al., 2005). As ERO são produzidas pelo complexo enzima NADPH-oxidase fagossoma, o qual utiliza oxigênio advindo de um processo metabólico conhecido como explosão respiratória para a produção destes produtos bactericidas (KINDT et al., 2007). Ainda, o vacúolo fagocítico é o local de digestão de patógenos com geração de peptídeos a serem apresentados às células T, para induzir a resposta imune adquirida (TIZARD, 2014).

Estudos *in vitro* tem claramente demonstrado que as alterações na composição dos fagócitos, principalmente os ácidos graxos da membrana, estão associados a uma capacidade fagocítica alterada (CALDER, 2014). Isto pode relacionar-se, em parte, a expressão alterada de receptores envolvidos na fagocitose, mas parece ser mais estreitamente relacionado com a natureza física da membrana, tal como sugerido por estudos *in vitro* com os macrófagos de murinos (CALDER et al., 2002).

Estudos com dietas que influenciam o aumento da ingestão de AGPIs $\omega 3$ e $\omega 6$ em animais de laboratório e humanos são contraditórias (CALDER, 1998). Isto é em parte devido a diferentes abordagens metodológicas e formas de investigar a fagocitose (AMADORI et al., 2015). Os estudos com suplementação com AGPI atualmente tentam verificar a extensão da atividade fagocitária, ou seja, a quantidade de material de alvo envolvido por aquelas células que estão ativas (CALDARI-TORRES, 2009).

A citometria de fluxo tornou possível comparar cuidadosamente a atividade fagocítica, a porcentagem de células que produzem ERO, porcentagem de células ativas e a intensidade que o processo ocorre através da mensuração da Intensidade de Fluorescência de cada atividade (IFF), onde em humanos essa técnica já vem sendo realizada a décadas (CALDER, 2014). Em estudos com sangue de humanos aparentemente saudáveis verificou-se que a maior parte dos neutrófilos (80% em média) e cerca de 25% (em média) de monócitos são ativos nas pessoas saudáveis (KEW et al., 2003a). Ainda que a atividade fagocítica de neutrófilos e monócitos foi negativamente correlacionado com o teor de ácido palmítico e com a proporção de saturação dos AGPIs e positivamente correlacionada com o teor de AGPIs individuais, com vários AGPIs totais, com o total de ácidos graxos $\omega 6$ e $\omega 3$ (KEW et al., 2003a). Ainda, segundo Kew et al. (2003a) a atividade fagocítica das células está relacionada com a composição de ácidos graxos de células mononucleadas no sistema imune. Em humanos

aparentemente saudáveis a ingestão de ácidos graxos $\omega 6$ e $\omega 3$ durante 6 meses aumentou a atividade fagocítica de neutrófilos em cerca de 40% e a atividade fagocítica de monócitos por cerca de 200% (KEW et al., 2003b).

Porém em vacas os estudos são recentes e vem se intensificando, Silvestre et al. (2011) trabalharam com vacas leiteiras no período de transição, no qual os animais foram suplementados de -35 a 30 dias (relação ao parto) com fontes de ácidos graxos saturados (Ca-óleo de palma) e fonte de AGs ricos em $\omega 6$ (Ca-cártamo), e de 30 a 160 dias pós parto foram suplementadas com fonte de ácidos graxos saturados (Ca-óleo de palma) e fonte de ácido graxo $\omega 3$ (Ca-óleo de peixe), os autores não observaram influência das dietas utilizadas no período de transição sobre a atividade fagocítica dos neutrófilos, somente observando efeito de tempo, onde a atividade fagocítica foi menor no parto, voltando a aumentar novamente após 4 dias pós-parto.

Gandra et al. (2016 no prelo⁸) ao suplementar vacas leiteiras no período de transição até 84 dias de lactação, com quatro diferentes dietas, onde três delas havia fontes diferentes de lipídeos (semente de linhaça, GSI e Ca-ácido linoleico) observaram maior porcentagem no pré e pós-parto de leucócitos, monócitos, linfócitos T helper ($CD4^+$), linfócitos T citotóxico ($CD8^+$) ativos, para as dietas suplementadas com fontes de AGs $\omega 3$ e $\omega 6$ em relação a dieta controle e maior porcentagem de monócitos ($CD14^+$) nos animais que receberam fontes de $\omega 6$ em relação aos que receberam $\omega 3$.

Em um estudo, Silvestre et al. (2008a,b,c) randomizaram vacas ($n = 1.582$) em duas dietas experimentais no período de transição até o dia 30 do pós-parto. As dietas consistiram de Ca-óleo de palma ou sais de Ca-óleo de cártamo, observaram maior atividade dos neutrófilos nas vacas suplementadas com óleo de cártamo. Ainda, Silvestre et al. (2008a,b,c) ao mensurar produção de citocinas dos neutrófilos, encontram menor concentração delas nas vacas alimentadas com Ca-óleo de palma, e ao mensurar os perfis de AGs dos neutrófilos observaram predominância de ácidos linoleico, esteárico, palmítico, oleico e erúico, compondo aproximadamente 72% de todos os AGs, onde as concentrações de ácido linoleico nos animais que receberam a dieta contendo óleo de cártamo foram numericamente maior (23,23 vs. 20,61%; $P=0,19$).

⁸ GANDRA, J.R.; BARLETTA, R.V.; MINGOTI, R.D.; VERDURICO, L.C.; FREITAS JUNIOR, J.E.; OLIVEIRA, L.J.; TAKIYA, C.S.; KFOURY JUNIOR, J.R.; WILTBANK, M.C.; RENNO, F.P. Effects of whole flaxseed, raw soybeans, and calcium salts of fatty acids on measures of cellular immune function of transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 2016. No prelo.

Greco et al. (2015) ao suplementarem vacas leiteiras com diferentes relações de $\omega 6:\omega 3$ (4:1, 5:1, 6:1) na dieta no período de transição e início de lactação não observaram diferença na porcentagem de leucócitos ativos e nem na sua atividade oxidativa “burst” (liberação de espécies reativas de oxigênio) após os animais serem estimulados com injeções lipopolissacarídeos (LPS).

4.6.2 Adesão celular

A adesão dos neutrófilos às células endoteliais antecede a migração de neutrófilos através das paredes dos vasos e acumulação em tecidos (diapedese) e é resultado de interações entre as moléculas de adesão em ambos os tipos de células. Um grupo importante destas moléculas é a família das integrinas de glicoproteínas adesivas (CD11/CD18 complexo) consistindo de uma cadeia β comum definida pelo antígeno CD-18 e três cadeias diferentes α especificadas como CD11a (LFA-1), CD11b (MAC-1), e CD11c (P150-95). Entre as moléculas de adesão reguladas pelas células endoteliais de superfície em resposta a citocinas e outros estímulos inflamatórios, temos a L-selectina a células de adesão vascular molécula-1 (VCAM-1) e célula de adesão intercelular molécula-1 (ICAM-1), onde ICAM-1 é expressa também em monócitos, macrófagos e linfócitos (SILVESTRE, 2008).

A L-selectina (CD62L) é uma das moléculas de adesão mais estudadas e é expressa na superfície dos leucócitos, principalmente dos neutrófilos, e é responsável no auxílio na diapedese (TIZARD, 2014). Esta molécula de adesão leucocitária atua como mediador no contato inicial de células circulantes com os vasos sanguíneos. A migração de neutrófilos sanguíneos envolve uma captura e aderência mediada pelas selectinas circulantes, seguido por uma adesão firme ou por ativação das integrinas no endotélio (SILVESTRE, 2008). A regulação da L-selectina ao parto pode tornar os neutrófilos incapazes de regressar ao sistema vascular, apesar da regulação de β -2-integrina (KIMURA et al., 1999). O agudo declínio da expressão de L-selectina observada em vacas ao parto é, em grande parte, devido ao efeito de concentrações plasmáticas aumentadas de cortisol neste período (WEBER et al., 2001), resultando em neutrofília típica.

Uma forte evidência adicional para o papel essencial de aderência de neutrófilos nos mecanismos de defesa do hospedeiro vem da compreensão da deficiência de adesão de

leucócitos em bovinos BLAD da raça holandesa (NAGAHATA, 2004). A base molecular da BLAD é uma mutação de ponto único no gene para CD18, que resulta na diminuição do recrutamento dos neutrófilos para locais de infecção. Este resultado em infecções bacterianas recorrentes, cicatrização de feridas e crescimento retardado atrofiado, está também associada a uma persistente neutrofílica.

A influência dos AGPIs na expressão e ativação das L-selectinas começou a ser estudado em humanos primeiramente. Bates et al. (1993) ao mediar a aderência de neutrófilos humanos em placas com DHA, EPA, ARA e dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPC), observaram que o ARA teve um efeito maior do que os outros suplementos e a adesão obtida por ele foi semelhante ao do TNF- α , uma conhecida citocina pró-inflamatória. Os autores, concluíram que o EPA e o DHA tiveram efeitos menores por serem intermediários entre o ARA e DPC, e que o ARA e a família de ácidos graxos $\omega 6$ induzem respostas diferenciadas sobre a adesão de neutrófilos. Segundo Silvestre et al. (2011), respostas mais amenas obtidas com a suplementação de ácidos graxos $\omega 3$ podem ser devido a diminuição na formação indireta de leucotrieno B₄, um potente indutor de quimiotaxia, de inflamação e de aderência em leucócitos, associado comum ao aumento do leucotrieno B₅, indutor fraco da inflamação e fraco agente quimiostático.

Em animais respostas, Gandra et al. (2016 no prelo⁹) ao suplementar vacas leiteiras no período de transição até 84 dias de lactação, com quatro diferentes dietas, onde três delas havia fontes diferentes de lipídeos, sendo eles: semente de linhaça; GSI e Ca-ácido linoleico. Observaram maior porcentagem das moléculas de adesão no pós-parto de CD25⁺ (α -IL-2) e CD62L⁺ (L-selectinas) nos animais que receberam fontes de $\omega 3$ e $\omega 6$ em relação aos alimentados com a dieta controle.

De um modo geral, o fornecimento de uma dieta enriquecida com ácidos graxos $\omega 6$ pode alterar os perfis de AGs dos tecidos, deixando a vaca em um “estado pró-inflamatório”. Tal estado envolve um limiar mais baixo para início de uma resposta inflamatória e aumento da sensibilidade das células na presença de estímulos. A inflamação é o primeiro passo para o início de uma resposta imune (THATCHER et al., 2010).

⁹ GANDRA, J.R.; BARLETTA, R.V.; MINGOTI, R.D.; VERDURICO, L.C.; FREITAS JUNIOR, J.E.; OLIVEIRA, L.J.; TAKIYA, C.S.; KFOURY JUNIOR, J.R.; WILTBANK, M.C.; RENNO, F.P. Effects of whole flaxseed, raw soybeans, and calcium salts of fatty acids on measures of cellular immune function of transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 2016. No prelo.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS E INSTALAÇÕES

O experimento foi conduzido nas dependências do Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite (LPBL) do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), em Pirassununga, no período de 13 de Janeiro de 2013 a 12 Novembro de 2013.

Foram incluídas no estudo 44 vacas Holandesas, porém em razão da ocorrência de enfermidades metabólicas ou infecciosas (3 abortos; 3 deslocamentos de abomaso a esquerda; 3 enfermidades podais; 4 distocias), não relacionadas às dietas experimentais 13 animais foram retirados dos grupos experimentais. Foram selecionadas 31 vacas híbridas da raça Holandesa, multíparas e gestantes, com parto previsto para 90 dias após o início da avaliação e fornecimento das dietas experimentais. As vacas foram avaliadas durante o período pré-parto, ao parto, e até o 90º dia de lactação. As vacas foram alojadas em estábulo providos de baias individuais, com cama de areia e ventiladores, sendo ordenhadas mecanicamente duas vezes ao dia.

As vacas selecionados apresentaram características semelhantes entre si, para melhor distribuição nos tratamentos avaliados. As variáveis utilizadas para a seleção dos animais foram: produção de leite na lactação anterior; peso corporal aos 95 dias pré-parto; ordem de partos; e escore de condição corporal (ECC) 95 dias antes do parto.

5.2 DIETAS EXPERIMENTAIS E ANÁLISE DE ALIMENTOS

As vacas foram distribuídas aleatoriamente e balanceadas em relação a produção leiteira na lactação anterior e ECC a quatro grupos experimentais, os quais diferiram em relação ao início do fornecimento de GSI na dieta durante o período pré-parto. A dieta era baseada na inclusão de 12% de GSI %MS e aproximadamente 5,1% de EE e os grupos experimentais começaram a receber a dieta com GSI conforme descrito a seguir:

- Grupo 0: Animais não receberam dieta contendo GSI no pré-parto (n=7);
- Grupo 30: Início do fornecimento de dieta com GSI nos 30 dias finais da gestação; (Fase II do período seco até o parto; n=6);
- Grupo 60: Início do fornecimento de dieta com GSI nos 60 dias finais da gestação; (Fase I do período seco até o parto; n=10);
- Grupo 90: Início do fornecimento de dieta com GSI nos 90 dias finais da gestação (terço final de lactação até o parto; n=8);

Após o parto todas as vacas foram alimentadas com dieta única, com inclusão de 12% de GSI %MS até 90 dias após o parto.

As dietas foram formuladas conforme as recomendações do NRC (2001) para cada fase do período pré-parto e pós-parto, sendo que para o pós-parto foi considerado o nível de produção de leite estimado durante o início da lactação, sendo esta produção baseada em registros de produção anteriores. No período de 90 dias até 60 dias antes do parto a relação volumoso:concentrado da dieta foi de 65:35, do 60 aos 30 dias antes do parto a relação volumoso:concentrado foi de 80:20, dos 30 dias antes do parto ao parto a relação volumoso:concentrado foi 70:30 e após o parto a relação volumoso:concentrado foi de 50:50. As respectivas dietas e água foram fornecidas “*ad libitum*” durante todo período experimental.

Foram realizadas análises bromatológicas dos ingredientes da dieta (Tabelas 1, 2 e 3). As análises bromatológicas foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do LPBL-VNP-FMVZ-USP, em Pirassununga, em seguida, foram formuladas as dietas experimentais. A dieta sem inclusão de GSI foi formulada para oferecer aproximadamente 3,0% de extrato etéreo (%MS), enquanto que as dietas contendo grão de soja foram formuladas para oferecer aproximadamente 5,0% de extrato etéreo (%MS) para os períodos pré e pós-parto. O volumoso utilizado no período pré e pós-parto foi à silagem de milho. (Tabelas 4 e 5).

Com 90 dias antes da data prevista do parto, as vacas selecionadas foram manejadas em estábulo com baias individuais, de acordo com as dietas experimentais. Após o parto, todos os animais foram alojados no mesmo estábulo até o final do período experimental (90 dias pós-parto). O fato dos animais serem manejados em estábulo com baias individuais permitiu o controle do consumo e a correta administração das dietas experimentais.

Tabela 1 - Composição bromatológica dos ingredientes utilizados em dietas

Nutrientes ¹	Ingredientes			
	Farelo de soja	Milho fubá	Grão de soja	Silagem de milho
Matéria seca (%MN)	88,59	87,04	91,30	29,30
Matéria orgânica (%MN)	93,78	98,40	95,14	96,14
Proteína bruta (%MS)	49,70	9,46	38,10	7,05
PIDN (%MS)	3,30	1,45	0,47	1,30
PIDA (%MS)	2,20	0,68	0,24	0,75
Extrato Etéreo (%MS)	1,76	4,47	20,10	2,97
CNF (%MS)	27,99	69,68	16,86	30,45
FDN (%MS)	14,33	14,79	20,08	55,67
FDNn (%MS)	11,03	13,34	19,61	54,37
FDA (%MS)	9,56	3,96	14,66	33,81
FDAi (%MS)	0,86	1,10	0,90	13,36
Lignina (%MS)	1,64	1,29	2,70	5,24
Cinzas (%MS)	6,22	1,60	4,86	3,86
NDT ²	77,57	86,34	100,08	63,86
EB (Mcal/kg MS)	3,72	3,86	6,47	2,78
ED (Mcal/kg MS)	3,30	3,45	6,17	2,36
EL _L (Mcal/kg MS)	2,13	2,24	4,15	1,47

¹MN = matéria natural; MS= matéria seca; ²Estimados pelas equações do NRC (2001).

Tabela 2 - Composição percentual dos concentrados experimentais

Ingredientes (%MS)	Dietas experimentais												Pós-Parto
	Final de Lactação (-90 a -60 dias)				Pré-Parto (-60 a -30 dias)				Pré-Parto (-30 dias ao Parto)				
	0 ¹	30 ²	60 ³	90 ⁴	0	30	60	90	0	30	60	90	
Milho Moído	51,49	51,49	51,49	38,86	41,05	41,05	25,50	25,50	55,67	45,40	45,40	45,40	46,78
Farelo de Soja	40,00	40,00	40,00	20,00	42,65	42,65	-	-	29,33	-	-	-	24,10
Grão de Soja	-	-	-	34,20	-	-	59,95	59,95	-	40,10	40,10	40,10	24,12
Premix Micro Lactação ⁵	6,20	6,20	6,20	5,91	-	-	-	-	-	-	-	-	4,54
Premix Micro Pré-Aniônico ⁶	-	-	-	-	-	-	-	-	8,63	8,37	8,37	8,37	-
Premix Micro Pré ⁷	-	-	-	-	7,80	7,80	7,80	7,80	-	-	-	-	-
Premix Vitaminico	-	-	-	-	0,80	0,80	0,70	0,70	-	-	-	-	-
Uréia	1,49	1,49	1,49	0,71	4,85	4,85	4,50	4,50	3,23	3,13	3,13	3,13	-
Calcáreo	-	-	-	-	-	-	-	-	3,33	3,40	3,40	3,40	0,50
Sal comum	0,46	0,46	0,46	0,49	0,95	0,95	0,95	0,95	-	-	-	-	-
Sulfato de Amônia	-	-	-	-	0,80	0,80	0,80	0,80	-	-	-	-	-

¹Grupo 0: Animais não receberam dieta contendo GSI no pré-parto; ²Grupo 30: Início do fornecimento de dieta com GSI nos 30 dias finais da gestação; ³Grupo 60: Início do fornecimento de dieta com GSI nos 60 dias finais da gestação; ⁴Grupo 90 Início do fornecimento de dieta com GSI nos 90 dias finais da gestação; ⁵Composição por kg do produto: Ca:22,0g; P:6,0g; Mg:2,0g; K:3,5g; Na:7,0g; S:2,0g; Co:15,0g; Cu:700mg; I:40mg; Fe:700mg; Mn:1600mg; Se:19mg; Zn:2500mg; F (máx.) 900mg; Vit.A:200x10³UI; Vit.E:1200IU; Vit.D:40000UI. ⁶Composição por kg do produto: Ca:12,8g; P:3,0g; Mg:2,0g; Cl:13,0g; Na:3,1g; S:9,0g; Co:8,0g; Cu:400mg; I:60mg; Fe:600mg; Mn:800mg; Se:12mg; Zn:1600mg; F (máx.) 900mg; Vit.A:120x10³UI; Vit.E:4000UI; Vit.D:50000UI. ⁷Composição por kg do produto: Ca:10,0g; P:4,2g; Mg:4,5g; K:2,0g; Na:12,3g; S:1,8g; Co:14,0g; Cu:500mg; I:28mg; Fe:1050mg; Mn:1400mg; Se:18mg; Zn:2800mg; F (máx.) 900mg; Vit.A:200x10³UI; Vit.E:1500UI; Vit.D:50000UI. ⁸Composição por kg do produto: Vit.A:8x10⁶UI; Vit.E:50000mg; Vit.D:2,3x10⁶UI.

Tabela 3 - Composição bromatológica dos concentrados experimentais

Ingredientes (%MS)	Concentrados experimentais												Pós-Parto
	Final de Lactação (-90 a -60 dias)				Pré-Parto (-60 a -30 dias)				Pré-Parto (-30 dias ao Parto)				
	0 ¹	30 ²	60 ³	90 ⁴	0	30	60	90	0	30	60	90	
Matéria seca (%MN)	88,40	88,40	88,40	89,88	88,71	88,71	91,68	91,68	89,63	91,03	91,03	91,03	89,13
Matéria orgânica (%MN)	88,18	88,18	88,18	89,53	80,39	80,39	82,13	82,13	82,28	82,82	82,82	82,82	91,58
Proteína bruta (%MS)	24,75	24,75	24,75	26,64	25,08	25,08	25,25	25,25	19,84	19,57	19,57	19,57	25,59
PIDN (%MS)	2,07	2,07	2,07	1,38	2,00	2,00	0,65	0,65	1,78	0,85	0,85	0,85	1,59
PIDA (%MS)	1,23	1,23	1,23	0,78	1,22	1,22	0,31	0,31	1,02	0,40	0,40	0,40	0,91
Extrato Etéreo (%MS)	3,01	3,01	3,01	8,96	2,59	2,59	13,19	13,19	3,01	10,09	10,09	10,09	7,37
CNF (%MS)	47,07	47,07	47,07	38,44	40,54	40,54	27,88	27,88	47,00	38,39	38,39	38,39	43,41
FDN (%MS)	13,35	13,35	13,35	15,48	12,19	12,19	15,81	15,81	12,44	14,77	14,77	14,77	15,22
FDNn (%MS)	11,28	11,28	11,28	14,10	10,18	10,18	15,16	15,16	10,66	13,92	13,92	13,92	13,63
FDA (%MS)	5,86	5,86	5,86	8,46	5,70	5,70	9,80	9,80	5,01	7,67	7,67	7,67	7,69
FDAi (%MS)	0,91	0,91	0,91	0,91	0,82	0,82	0,82	0,82	0,86	0,86	0,86	0,86	0,94
Lignina (%MS)	1,32	1,32	1,32	1,75	1,23	1,23	1,95	1,95	1,20	1,67	1,67	1,67	1,65
Cinzas (%MS)	3,31	3,31	3,31	3,53	3,31	3,31	3,32	3,32	2,72	2,68	2,68	2,68	3,42
NDT (%MS)	83,96	83,96	83,96	90,04	83,91	83,91	95,16	95,16	84,89	92,49	92,49	92,49	88,33
EB (Mcal/kg MS)	3,76	3,76	3,76	4,69	3,72	3,72	5,35	5,35	3,74	4,83	4,83	4,83	4,43
ED (Mcal/kg MS)	3,35	3,35	3,35	4,31	3,30	3,30	5,00	5,00	3,33	4,46	4,46	4,46	4,04
EL _L (Mcal/kg MS)	2,16	2,16	2,16	2,84	2,13	2,13	3,33	3,33	2,15	2,95	2,95	2,95	2,65

¹Grupo 0: Animais não receberam dieta contendo GSI no pré-parto; ²Grupo 30: Início do fornecimento de dieta com GSI nos 30 dias finais da gestação; ³Grupo 60: Início do fornecimento de dieta com GSI nos 60 dias finais da gestação; ⁴Grupo 90 Início do fornecimento de dieta com GSI nos 90 dias finais da gestação; MS= matéria seca; Estimados pelas equações do NRC (2001).

Tabela 4 - Composição percentual das dietas experimentais

Ingredientes (%MS)	Dietas experimentais												Pós-Parto
	Final de Lactação (-90 a -60 dias)				Pré-Parto (-60 a -30 dias)				Pré-Parto (-30 dias ao Parto)				
	0 ¹	30 ²	60 ³	90 ⁴	0	30	60	90	0	30	60	90	
Silagem de Milho	65,13	65,13	65,13	64,94	80,23	80,23	79,96	79,96	69,94	69,88	69,88	69,88	49,98
Milho Moído	18,02	18,02	18,02	13,60	8,21	8,21	5,10	5,10	16,70	13,62	13,62	13,62	23,39
Farelo de Soja	14,00	14,00	14,00	7,00	8,53	8,53	-	-	8,80	-	-	-	12,05
Grão de Soja	-	-	-	11,97	-	-	11,99	11,99	-	12,03	12,03	12,03	12,06
Premix Micro Lactação ⁵	2,17	2,17	2,17	2,07	-	-	-	-	-	-	-	-	2,27
Premix Micro Pré-Aniônico ⁶	-	-	-	-	-	-	-	-	2,59	2,51	2,51	2,51	-
Premix Micro Pré ⁷	-	-	-	-	1,56	1,56	1,56	1,56	-	-	-	-	-
Premix Vitaminico	-	-	-	-	0,16	0,16	0,14	0,14	-	-	-	-	-
Uréia	0,52	0,52	0,52	0,25	0,97	0,97	0,90	0,90	0,97	0,94	0,94	0,94	-
Calcáreo	-	-	-	-	-	-			1,00	1,02	1,02	1,02	0,25
Sal comum	0,17	0,17	0,17	0,17	0,19	0,19	0,19	0,19	-	-	-	-	-
Sulfato de Amônia	-	-	-	-	0,16	0,16	0,16	0,16	-	-	-	-	-

¹Grupo 0: Animais não receberam dieta contendo GSI no pré-parto; ²Grupo 30: Início do fornecimento de dieta com GSI nos 30 dias finais da gestação; ³Grupo 60: Início do fornecimento de dieta com GSI nos 60 dias finais da gestação; ⁴Grupo 90 Início do fornecimento de dieta com GSI nos 90 dias finais da gestação; ⁵Composição por kg do produto: Ca:22,0g; P:6,0g; Mg:2,0g; K:3,5g; Na:7,0g; S:2,0g; Co:15,0g; Cu:700mg; I:40mg; Fe:700mg; Mn:1600mg; Se:19mg; Zn:2500mg; F (máx.) 900mg; Vit.A:200x10³UI; Vit.E:1200IU; Vit.D:40000UI. ⁶Composição por kg do produto: Ca:12,8g; P:3,0g; Mg:2,0g; Cl:13,0g; Na:3,1g; S:9,0g; Co:8,0g; Cu:400mg; I:60mg; Fe:600mg; Mn:800mg; Se:12mg; Zn:1600mg; F (máx.) 900mg; Vit.A:120x10³UI; Vit.E:4000UI; Vit.D:50000UI. ⁷Composição por kg do produto: Ca:10,0g; P:4,2g; Mg:4,5g; K:2,0g; Na:12,3g; S:1,8g; Co:14,0g; Cu:500mg; I:28mg; Fe:1050mg; Mn:1400mg; Se:18mg; Zn:2800mg; F (máx.) 900mg; Vit.A:200x10³UI; Vit.E:1500UI; Vit.D:50000UI. ⁸Composição por kg do produto: Vit.A:8x10⁶UI; Vit.E:50000mg; Vit.D:2,3x10⁶UI.

Tabela 5 - Composição bromatológica das dietas experimentais

Ingredientes (%MS)	Dietas experimentais												Pós-Parto
	Final de Lactação (-90 a -60 dias)				Pré-Parto (-60 a -30 dias)				Pré-Parto (-30 dias ao Parto)				
	0 ¹	30 ²	60 ³	90 ⁴	0	30	60	90	0	30	60	90	
Matéria seca (%MN)	50,03	50,03	50,03	50,49	41,25	41,25	41,77	41,77	47,39	47,79	47,79	47,79	59,21
Matéria orgânica (%MN)	93,48	93,48	93,48	93,77	93,21	93,21	93,30	93,30	91,93	92,03	92,03	92,03	93,84
Proteína bruta (%MS)	13,25	13,25	13,25	13,90	10,67	10,67	10,69	10,69	10,88	10,80	10,80	10,80	16,32
PIDN (%MS)	1,57	1,57	1,57	1,27	1,44	1,44	1,17	1,17	1,44	1,16	1,16	1,16	1,44
PIDA (%MS)	0,92	0,92	0,92	0,74	0,85	0,85	0,67	0,67	0,83	0,65	0,65	0,65	0,83
Extrato Etéreo (%MS)	2,99	2,99	2,99	5,07	2,90	2,90	5,02	5,02	2,98	5,11	5,11	5,11	5,17
CNF (%MS)	36,30	36,30	36,30	31,21	32,54	32,54	29,92	29,92	35,39	32,80	32,80	32,80	36,92
FDN (%MS)	40,93	40,93	40,93	39,17	47,10	47,10	47,68	47,68	42,67	43,33	43,33	43,33	35,43
FDNn (%MS)	39,36	39,36	39,36	37,90	45,66	45,66	46,51	46,51	41,23	42,17	42,17	42,17	33,99
FDA (%MS)	24,07	24,07	24,07	23,16	28,27	28,27	28,99	28,99	25,15	25,93	25,93	25,93	20,74
FDAi (%MS)	9,02	9,02	9,02	8,89	10,88	10,88	10,85	10,85	9,60	9,60	9,60	9,60	7,15
Lignina (%MS)	3,88	3,88	3,88	4,02	4,45	4,45	4,58	4,58	4,03	4,16	4,16	4,16	3,44
Cinzas (%MS)	3,67	3,67	3,67	3,74	3,76	3,76	3,75	3,75	3,51	3,50	3,50	3,50	3,64
NDT (%MS)	71,21	71,21	71,21	74,09	68,25	68,25	70,56	70,56	70,57	72,86	72,86	72,86	76,37
EB (Mcal/kg MS)	3,76	3,76	3,76	4,69	3,72	3,72	5,35	5,35	3,74	4,83	4,83	4,83	4,43
ED (Mcal/kg MS)	3,35	3,35	3,35	4,30	3,30	3,30	4,96	4,96	3,33	4,44	4,44	4,44	4,03
EL _L (Mcal/kg MS)	2,16	2,16	2,16	2,83	2,13	2,13	3,30	3,30	2,15	2,93	2,93	2,93	2,65

¹Grupo 0: Animais não receberam dieta contendo GSI no pré-parto; ²Grupo 30: Início do fornecimento de dieta com GSI nos 30 dias finais da gestação; ³Grupo 60: Início do fornecimento de dieta com GSI nos 60 dias finais da gestação; ⁴Grupo 90 Início do fornecimento de dieta com GSI nos 90 dias finais da gestação. ⁵MN = matéria natural; MS= matéria seca; Estimados pelas equações do NRC (2001).

As vacas foram arraçoadas de acordo com o consumo de matéria seca no dia anterior, de forma a ser mantido o percentual de sobras das dietas, diariamente, entre 5 e 10% do fornecido para não haver limitação de consumo. Após o preparo da mistura no cocho, as amostras dos alimentos fornecidos foram coletadas diariamente e armazenadas a -20° C.

Semanalmente as amostras coletadas diariamente foram misturadas e foi retirada amostra composta referente a um período de uma semana. Posteriormente, foram realizadas análises bromatológicas nas amostras armazenadas seguindo os procedimentos analíticos: a matéria seca (MS; 930.15; AOAC, 2006); o teor de cinza foi obtido pela calcinação em forno mufla a 600°C por quatro horas (MM, 942.05; AOAC, 2006); a fibra em detergente neutro (FDN) foi determinada pelo método de Van Soest (1991) utilizando-se α -amilase termoestável sem adição de sulfito de sódio de acordo com Mertens (2002), em Sistema Ankon®; a fibra em detergente ácido foi determinado de acordo com AOAC (FDA; 973.18; AOAC, 2006) o teor de proteína bruta pela decomposição das proteínas e outros componentes nitrogenados na presença de H₂SO₄ concentrado a quente multiplicando o teor de nitrogênio total por 6,25, segundo o método Semi-micro Kjeldahl (PB; N x 6,25; 984.13; AOAC, 2006); o extrato etéreo segundo AOAC (EE; 920.39; AOAC, 2006) em Sistema Ankon®; a energia bruta (EB) foi determinada pela oxidação completa de amostras em bomba calorimétrica adiabática - tipo Parr (SILVA; QUEIROZ, 2002). Nas amostras do alimento fornecido e nas sobras também foram avaliados o nitrogênio insolúvel em detergente neutro e nitrogênio insolúvel em detergente ácido, de acordo com as metodologias descritas por AOAC (1990). Lignina foi determinada de acordo com Robertson e Van Soest (1981).

5.3 DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL

Para a determinação da digestibilidade aparente total dos nutrientes foram avaliados diferentes períodos, com concomitante coleta de fezes. No período pré-parto foram coletadas amostras de fezes 56 e 21 dias antes da data do parto, e, no período pós-parto, foram coletadas amostras de fezes aos, 21, 56 e 84 dias pós-parto para avaliação da digestibilidade aparente dos nutrientes. Amostras de fezes foram coletadas durante dois dias alternados, sendo realizadas coletas após as ordenhas da manhã e da tarde.

As amostras de silagem, sobras e fezes foram pré-secas em estufa com ventilação forçada (60°C/72 horas), e, em conjunto com as demais amostras de ingredientes, foram processadas em moinho de facas com peneiras de porosidade 2 mm. Para avaliação dos teores dos componentes indigestíveis, as amostras processadas foram acondicionadas em sacos de tecido não-tecido (TNT-100g/m²), com dimensões de 4 x 5 cm. As alíquotas foram acondicionadas em todos os sacos, segundo a relação de 20 mg de matéria seca por centímetro quadrado de superfície (NOCEK, 1988).

Para a incubação das amostras, duas vacas foram adaptadas durante 7 dias com ração a base de farelo de soja e milho moído, e receberam silagem de milho como volumoso. Posteriormente ao período de adaptação dos animais, as amostras foram incubadas no rúmen por período de 288 horas, segundo adaptação de técnica descrita por Casali et al. (2008). Após a retirada do rúmen os sacos foram lavados com água corrente até o total clareamento desta, e imediatamente foram conduzidos à estufa de ventilação forçada (60°/72 horas). Após este período, os sacos foram submetidos à secagem em estufa não ventilada (105°/45 minutos), sendo retirados, acondicionados em dessecador (20 sacos/dessecador), e pesados, obtendo-se a matéria seca indigestível. Posteriormente, os sacos foram submetidos ao tratamento com detergente ácido (MERTENS, 2002) por uma hora, em equipamento analisador de fibra tipo ANKON®. Após este período foram lavados com água quente e acetona, sendo secos e pesados conforme procedimento anterior. Ao final deste tratamento, foi obtida a fibra em detergente ácido indigestível.

5.4 BALANÇO DE ENERGIA

Para obtenção do consumo de energia bruta e realização do cálculo da eficiência de energia consumida, as amostras de silagem, ingredientes dos concentrados foram analisadas quanto ao seu teor de energia bruta em bomba calorimétrica, de acordo com Harvatine e Allen (2006a). O consumo de energia digestível (CED) foi obtido por meio do coeficiente de digestibilidade das rações experimentais e do consumo de energia bruta, de acordo com os valores de energia obtidos para os ingredientes e a silagem de milho (HARVATINE; ALLEN, 2006a).

O consumo de energia líquida (CEL), os valores de energia líquida de produção (EL_p), energia líquida de ganho (EL_g), energia líquida de gestação (EL_G), energia líquida de manutenção (EL_m) e mudança de peso de corpo vazio (MPCV) foram calculados de acordo com as equações do NRC (2001), a seguir: $CEL \text{ (Mcal/dia)} = 0,703 \times EM \text{ (consumo)} - 0,19 + \{[(0,097 \times EM \text{ (consumo)} + 0,19)/97] \times [EE - 3]\}$; $EM \text{ (consumo)} = 1,01 \times (ED \text{ (consumo)} - 0,45) + 0,0046 \times (EE - 3)$ onde: EM = energia metabolizável; EE = extrato etéreo; ED = energia digestível. $EL_g = 2,7 \times MPCV \times 0,65$. $EL_G = 0,00318 \times (240 + \text{dias para o parto}) - 0,0352 \times (\text{peso do bezerro ao nascimento}/45) / 0,218$. $EL_m = 0,08 \times PC^{0,75}$.

Os valores de energia metabolizável (EM) foram obtidos pela seguinte fórmula: $EM \text{ (Mcal/kg)} = [1,01 \times \{(\%CNF/100) \times 4,2 + (\%fDN/100) \times 4,2 + (\%PB/100) \times 5,6 + (\%AG/100) \times 9,4 - 0,3\} - 0,45] + 0,0046 \times (EE - 3,0)$.

Para o cálculo de energia digestível (ED) foi utilizada a seguinte fórmula: $ED \text{ (mcal/dia)} = 9,4 \times DAG \times (EE/100)$, onde: DAG = digestibilidade dos ácidos graxos.

Os valores de energia líquida de produção (EL_p) foram calculados segundo a fórmula: $EL_p \text{ (Mcal/dia)} = \text{produção de leite (kg)} \times (0,0929 \times G\% + 0,0563 \times PV\% + 0,0395 \times \text{lactose}\%)$ onde: G%=teor de gordura no leite; PV=teor de proteína verdadeira do leite.

A mudança de peso de corpo vazio (MPCV) foi calculada a partir do peso vivo (PV) onde: $PCV = 0,817 \times PV$. A energia líquida de ganho foi calculada através da fórmula: $EL_g = 1,42 \times em - 0,174 \times em + 0,0122 \times em \times 1,65$.

A eficiência de utilização de energia foi calculada de acordo com Harvatine e Allen (2006a) da seguinte forma: eficiência produção de leite = $EL \text{ (consumo)} - EL \text{ (ganho PV)} - EL \text{ (leite)}$; eficiência lactação = $EL \text{ produção de leite} + EL \text{ ganho de PV} / \text{consumo de ED}$.

5.5 BALANÇO DE NITROGÊNIO

Amostras *spot* de urina foram obtidas semanalmente nos períodos pré e pós-parto. Quatro horas após a alimentação matinal, durante micção estimulada por massagem na vulva. A urina foi filtrada e alíquotas de 20 ml foram retiradas e diluídas imediatamente em 80 mL de ácido sulfúrico a 0,036N para evitar destruição bacteriana

dos derivados de purinas e precipitação do ácido úrico. Foram posteriormente acondicionadas em garrafas plásticas de capacidade de 1l e armazenadas em freezer à -20°C, para posterior análises.

As concentrações de creatinina foram determinadas por meio de kits comerciais (Laborlab[®]), utilizando reação enzimática calorimétrica cinética em aparelho SBA-200 CELM. Para a realização dessa análise, 100 µL de urina foram diluídos em 4900 µL de água deionizada. Os resultados obtidos foram calculados pela seguinte fórmula: Creatinina (mg/dl) = creatinina (mg/dl) * 0,020 * 50 (BIGGS; COPPER, 1961).

O volume urinário diário total foi estimado dividindo-se as excreções urinárias diárias de creatinina pelos valores observados de concentração de creatinina na urina das amostras *spot*, segundo Oliveira et al. (2001). A excreção urinária diária de creatinina foi estimada a partir da proposição de 24,05 mg/kg de peso vivo (PV) (CHIZZOTTI, 2004).

Dessa forma, com a excreção média diária de creatinina e a concentração de creatinina (mg/dl) na amostra *spot* de urina, foi estimado o volume total diário de urina, em litros por vaca/dia, para o cálculo do balanço de nitrogênio.

O consumo de nitrogênio foi determinado por meio do consumo de proteína bruta retirando-se o valor de conversão de nitrogênio 6,25, obtendo-se a quantidade em gramas de nitrogênio consumida. O mesmo cálculo foi realizado com os valores de proteína bruta das fezes obtendo-se a excreção total de nitrogênio em g/kg MS.

O nitrogênio total das amostras de urina e leite foram determinados de acordo com as metodologias descritas pelo AOAC, 2000 (PB; N x 6,25; 984.13) segundo o método semi-micro Kjeldahl, onde a quantidade em gramas de nitrogênio para cada 100 ml de urina ou leite foi obtido dividindo-se o valor de proteína bruta das amostras pelo fator 6,25 para as amostras de urina e do fator 6,38 para as amostras de leite.

O balanço de nitrogênio foi obtido subtraindo do total de nitrogênio em gramas consumido com os valores de nitrogênio na urina, fezes e leite, obtendo-se os valores de nitrogênio retido em gramas e em porcentagem do nitrogênio total.

5.6 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE

A produção de leite foi medida diariamente, com amostras de leite coletadas uma vez por semana, compreendendo amostras proporcionais das ordenhas realizadas diariamente de manhã e a tarde para analisar a composição do leite. A produção de leite foi corrigida para 3,5% de gordura para posterior avaliação, segundo fórmula descrita por Sklan et al. (1994).

As amostras coletadas foram acondicionadas em frascos plásticos, mantidos entre 2 e 6°C, e encaminhadas para o Laboratório de Tecnologia de Produtos de Origem Animal do VNP-FMVZ-USP, em Pirassununga. Foram avaliados os teores de proteína bruta, gordura e lactose segundo a metodologia descrita pela International Dairy Federation (1996).

5.7 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE

As amostras para análise do perfil de ácidos graxos do leite foram obtidas semanalmente ao longo das 12 semanas de lactação, e para análise foram agrupadas da semana 1 a 4; 5 a 8; 9 a 13, totalizando 3 amostras por vaca ao longo das 13 semanas de lactação. Para o processo de extração, as amostras foram centrifugadas a 17.800 x g por 30 minutos a 4 °C e próximo a 19.300 x g por 20 minutos a 4 °C, de acordo com Feng et al. (2004). A gordura separada (300-400 mg) foi metilada e os ésteres metílicos foram formados de acordo com Kramer et al. (1997). Dois padrões internos C18:0 e C19:0 foram utilizados para corrigir as perdas durante o processo de metilação.

A extração da gordura dos alimentos foi realizada de acordo com o método de Folch et al. (1957) e de metilação realizada de acordo com Kramer (1997). Os lipídeos foram extraídos por homogeneização da amostra com uma solução de clorofórmio e metanol 2:1. Em seguida os lipídeos foram isolados após a adição de solução de NaCl a 1,5%.

Os ácidos graxos foram quantificados por cromatografia gasosa (GC Shimatzu 2010, com injeção automática), usando coluna capilar SP-2560 (100 m × 0,25 mm de diâmetro com 0,02 mm de espessura, Supelco, Bellefonte, PA). A temperatura inicial

foi de 70 °C por 4 minutos (13°C/minuto) até chegar a 175°C, mantendo por 27 minutos. Depois, um novo aumento de 4°C/minuto, foi iniciado até 215°C, mantendo durante 31 minutos. Hidrogênio (H₂) foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 40 cm/s. Durante o processo de identificação foram utilizados quatro padrões: standard C4-C24 de ácidos graxos (Supelco ® TM 37), ácido vacênico C18:1 *trans*-11 (V038-1g, Sigma®), C18:2 CLA *trans*-10, *cis*-12 (UC-61M 100mg), e C18:2 *cis*-9, *trans*-11 (UC-60M 100mg), (NU-CHEK-PREP EUA ®) para identificação dos ácidos graxos que são formados durante a biohidrogenação de ácidos graxos insaturados.

5.8 AVALIAÇÃO DO ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL E PESO CORPORAL

O escore de condição corporal (ECC) e o peso corporal foram avaliados ao longo de todo o período experimental. As mensurações do ECC foram realizadas semanalmente, por um técnico treinado, segundo metodologia proposta por Wildman et al. (1982) e desenvolvida por Edmonson et al. (1989). Os animais foram pesados semanalmente, logo após a ordenha da manhã, e no dia do parto (nas primeiras 24 horas pós-parto). Foram avaliadas as mudanças de peso durante o período pré-parto, ao parto e em todo período pós-parto.

5.9 METABÓLITOS PLASMÁTICOS

Foram realizadas coletas de sangue na artéria ou veia coccígea sempre às 8:00 hs, anteriormente ao fornecimento das dietas na manhã, para dosagens de metabólitos. As amostras de sangue foram coletadas semanalmente nos períodos pré e pós-parto. Amostras de sangue foram coletadas também no dia do parto (nas primeiras 24 horas).

As amostras foram coletadas em tubos vacuolizados (vacutainer) de 10 ml para dosagem de metabólitos (glicose, ácidos graxos não esterificados, β -hidroxibutirato, colesterol total e triglicerídeos). Imediatamente após coleta os tubos foram refrigerados até a centrifugação em centrifuga refrigerada, à 3000 x g durante 15 minutos e a 5°C,

para a separação do plasma. O plasma obtido foi transferido para tubetes plásticos, identificados e armazenados a -20°C, até o procedimento das análises laboratoriais.

As análises laboratoriais dos metabólitos plasmáticos foram realizadas por meio de kits comerciais, que utilizam o método enzimico colorimétrico de ponto final (glicose, β -hidroxibutirato, colesterol total e triglicérides) que foram analisados em aparelho automático para bioquímica sanguínea sistema de bioquímica automático SBA-200, CELM). As análises dos ácidos graxos não esterificados foram feitas em aparelho leitor de microplacas (ELISA). As análises foram realizadas no LPBL-VNP-FMVZ-USP.

5.10 QUALIDADE OOCITÁRIA E EMBRIONÁRIA

O procedimento de aspiração folicular ovariana (AFO) foi realizado em quatro períodos, o primeiro a 21 ± 3 dias de lactação, segundo 42 ± 7 dias de lactação, terceiro 63 ± 7 dias de lactação e o último por volta de 84 ± 7 dias de lactação, visando à otimização do número de vacas a serem aspiradas em um único dia. As variáveis mensuradas na AFO foram o número total de oócitos aspirados, número de oócitos viáveis, dentre os viáveis os de alta qualidade. Na avaliação da qualidade embrionária foram avaliados o número e a porcentagem de embriões clivados e viáveis, sendo que todos os embriões viáveis foram submetidos ao cultivo, maturação, fertilização *in vitro*. As aspirações foliculares foram realizadas pela empresa IN VITRO (Rod. SP 340 - KM 166, Mogi Mirim - SP), realizadas por médicos veterinário experientes, treinados e aptos que realizam este tipo de procedimento de aspiração com frequência diária.

As sessões de AFO foram realizadas com aparelho portátil de ultra-som, equipado com transdutor endocavitário, micro-convexo, multifrequencial, adaptado a uma guia de biopsia WTA Ltda (Cravinhos/SP, Brasil) para aspiração folicular e conectado a agulha V-OPAA-1855 (Cook Austrália, Queensland, Austrália) descartável de 18G e linha de aspiração VBOAS 18l (Cook Austrália, Queensland, Austrália) de teflon de 1,7 mm de diâmetro interno e 80 cm de comprimento, conectadas a um recipiente para coleta dos oócitos (tubos cônicos de centrífuga de 50 ml da Corning Life Science Incorporated – Massachusetts/EUA). Este sistema de aspiração foi acoplado à bomba de vácuo portátil V-MAR 5000 (Cook Austrália, Queensland, Austrália),

calibrada e regulada com pressão negativa de 68 MMHG (12 a 15 ml de água/minuto; KRUP et al., 1994).

A montagem do transdutor foi feita segundo instruções do fabricante e a agulha inserida no mandril de forma asséptica para evitar contaminação. Na montagem dos equipamentos envolvidos na OPU, foi mantida rigorosa assepsia, principalmente com as partes que entravam em contato direto com o material aspirado ou com as mucosas das doadoras.

O meio de aspiração utilizado para lubrificação e lavagem do sistema de OPU e para o recebimento dos oócitos no tubo de coleta foi preparado com 1,0% de solução salina fosfatada (DPBS – Dmpbs Flush, Nutricell, SP/Brasil), acrescido de 5000 UI de heparina sódica (5,0 ui/ml, Liquemine®, Roche Brasil, SP/Brasil) e 10,0 ml de soro fetal bovino (SFB – Nutricell, SP/Brasil), mantidos a aproximadamente 37°C.

Após a contenção física da vaca em brete apropriado, foi realizada lentamente anestesia epidural baixa entre a última vértebra coccígena e a primeira vértebra caudal, com 2,0 a 3,0 ml de cloridrato de lidocaína 2% (LIDOVET® BRAVET, RJ/BRASIL), sem vasoconstritor (KRUIP et al., 1994). Esta dosagem variou de acordo com o tamanho, raça, idade, sensibilidade individual e estado geral de cada vaca.

Após a perda dos reflexos caudais, a cauda da vaca foi amarrada e se procedeu a remoção manual de fezes da ampola retal e higienização mecânica da região perineal, com água. A vulva e o vestíbulo vaginal também foram cuidadosamente higienizados, tomando-se o cuidado de não jogar água dentro da vagina.

Após anestesia e higienização da doadora, o braço esquerdo do operador foi mantido posicionado no reto do animal evitando assim a entrada de ar na ampola retal, o que dificulta a realização da AFO. Visando a padronização da técnica e devido à dificuldade de acesso, o ovário esquerdo foi o primeiro a ser aspirado. O ovário foi palpado, inspecionado e isolado de outros tecidos (vasos sanguíneos, porções intestinais, tecido adiposo) para evitar sua perfuração acidental e, em seguida, o transdutor, acoplado a guia de biópsia e agulha, foi introduzido na vagina até alcançar o fundo de saco vaginal no lado correspondente ao ovário que foi acessado. Por meio de manipulação transretal, o ovário foi apresentado ao transdutor na face abdominal da parede da vagina, de forma que os folículos a serem aspirados fiquem no percurso da agulha, indicado na tela do ultra-som pela linha de biópsia ou linha de punção (*punction line*).

Antes do início da AFO, foi feito um mapeamento do ovário a fim de se planejar a aspiração, evitando perfurações desnecessárias, otimizando o procedimento e preservando os ovários da doadora. Seguiu a aspiração transpassando a agulha através da parede do fundo de saco vaginal ao mesmo tempo em que foi acionada a pressão negativa de vácuo por um pedal e os folículos foram aspirados (NIBART et al., 1995). Desta forma, foram aspirados todos os folículos visíveis (com diâmetro $\geq 1,0$ mm) e acessíveis de cada ovário.

Ao término da AFO de cada animal o tubo contendo o líquido aspirado foi trocado, identificado com a ordem da aspiração e número da doadora e enviado para o técnico do laboratório-campo, para lavagem do conteúdo, procura, seleção e envase dos oócitos aspirados.

O tubo com o conteúdo aspirado foi despejado em filtro de coleta de embriões WTA (Watanabe Tecnologia Aplicada Ltda, Cravinhos, SP/Brasil). O conteúdo contendo o fluido aspirado presente no filtro de coleta de embriões foi lavado até se obter um líquido translúcido com cerca de 1.0 cm de altura e com um sedimento contendo os oócitos recuperados. Este conteúdo foi vertido em placas de petri para observação em esteriomicroscópio (Neovet Ind. e Com. e Serviços Ltda, Uberaba, MG/Brasil) e realização da procura, lavagem, classificação e seleção dos ovócitos.

Os critérios considerados para a avaliação dos ovócitos foram a presença, o número de camadas e o grau de expansão das células do *cumulus*, bem como o aspecto do citoplasma quanto à cor, homogeneidade e integridade. Desta maneira, os oócitos recuperados foram classificados de acordo com sua morfologia, mensurando-se a quantidade de camadas e compactação das células do *cumulus* e a homogeneidade do ooplasma, em sete categorias, semelhante ao descrito por Lonergan et al. (1992).

Foram considerados como viáveis e, conseqüentemente, aproveitados para FIV somente os oócitos classificados como graus I, II e III, sendo os de alta qualidade a soma do grau I e II e de baixa qualidade o de grau III, enquanto os demais, que não apresentaram aspecto de granulações citoplasmáticas homogêneo, foram descartados. No entanto, foram somados àqueles para compor o número total de oócitos.

Após a classificação, os oócitos foram lavados em solução de TCM199 GIBCO® Invitrogen Corporatio, Califórnia/EUA, suplementada com 10% de SFB. Em seguida, foram efetuados a contagem por categoria e o envase dos oócitos para transporte em Criotubos (Corning Life Science Incorporated, Massachusetts/EUA) com a mesma solução de lavagem, acrescido de HEPES Nutricell (Campinas, SP/Brasil), em banho-

maria a 37°C. O tempo médio de transporte foi de 1,5 horas, totalizando média de 5,0 horas desde o início da aspiração da primeira vaca até a chegada dos oócitos viáveis ao laboratório de fertilização *in vitro* (FIV).

A fase de produção *in vitro* foi totalmente executada em laboratório da empresa IN VITRO, onde os oócitos aspirados foram submetidos à maturação, fecundação e cultivo *in vitro*, num período total de oito dias.

Após transporte controlado, os oócitos foram transferidos para as placas de maturação *in vitro* (MIV), agrupados e maturados em microgotas de 100,0 µl de meio de maturação tcm199 suplementado com 10% de SFB, piruvato (22 µg/ml), gentamicina, (50 µg/ml), 5,0 µg/ml de FSH FOLTROPIN® (Bioniche Animal Health, Belleville, Ontário, Canadá), 50,0 µg/ml de LH PROFASI® (Serono, SP/Brasil) e 1 µg de estradiol/ml, sendo cada microgota referente a um animal.

As microgotas de MIV foram cobertas com óleo mineral sigma (Aldrich, São Paulo, SP/Brasil) e os oócitos permaneceram incubados durante 22 a 24 horas a 38,5°C, em atmosfera de 5% de CO₂ em ar e com máxima umidade (WATANABE et al., 1998).

Uma vez maturados, os oócitos foram submetidos à FIV, em microgotas de 100 µg de meio talp suplementado com heparina (10 µg/ml), piruvato (22 µg/ml), gentamicina (50 µg/ml), albumina sérica bovina (6 mg/ml), solução de PHE (2 µm de penicilamina, 1 µm de hipotaurina e 0,25 µm de epinefrina) e recobertas com óleo mineral. O sêmen utilizado em todo o experimento foi do mesmo reprodutor (raça Holandesa) e mesma partida. As palhetas contendo o sêmen diluído foram descongeladas em banho-maria a 35°C durante 30 segundos e o seu conteúdo foi centrifugado por meio da técnica de gradiente de percoll (45 e 90%) para obtenção dos espermatozóides móveis e remoção do diluidor e do plasma seminal. A concentração foi ajustada para 2,0x10⁶ espermatozóides/ml e os gametas permaneceram incubados nas microgotas, durante um período de 18 a 20 horas a 38,5°C, em atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

Após os procedimentos de MIV e FIV, os possíveis zigotos foram lavados e transferidos para microgotas com 50 µl de meio Cr₂ modificado e suplementado com 10% SFB, 30 mg BSA/ml, acrescido de aminoácidos essenciais e não essenciais (WATANABE et al., 1998), onde permaneceram em desenvolvimento embrionário por sete dias, em incubadora a 38,5°C, com 5% de CO₂ em ar e umidade máxima, até atingirem os estágios de mórula (MO) e blastocisto (BL). Decorridas 48 horas de CIV,

foi avaliada a taxa de clivagem e, em seguida os embriões viáveis foram congelados em nitrogênio líquido a -196°C.

Os parâmetros mensurados foram: Número de oócitos recuperados; Número de oócitos viáveis (soma de oócitos Grau I, II e III); Percentual de oócitos viáveis (relação do nº de oócitos viáveis/recuperados) ; Número de oócitos de alta qualidade (soma dos oócitos grau I e II); Percentual de oócito de alta qualidade (relação do nº de oócitos de alta qualidade/recuperados); Número de embriões clivados; Percentual de embriões clivados (relação nº de embriões clivados/nº de oócitos viáveis); Número de blastocisto; Percentual do total de blastocistos (relação nº de blastocistos/nº oócitos recuperados); Percentual de blastocistos cultivados (relação nº de blastocistos/nº oócitos viáveis); Percentual de blastocistos clivados (relação nº de blastocistos/nº de embriões clivados); Número de blastocistos de alta qualidade; Percentual de blastocistos de alta qualidade (relação nº blastocistos de alta qualidade/ nº blastocistos); Percentual total de blastocistos de alta qualidade (relação nº blastocistos de alta qualidade/ nº oócitos recuperados); Percentual de blastocistos de alta qualidade cultivados (relação nº blastocistos de alta qualidade/ nº oócitos viáveis); Percentual de blastocistos clivados (relação nº blastocistos de alta qualidade/ nº embriões clivados).

5.11 FAGOCITOSE E ADESÃO CELULAR

Foram realizadas coletas de sangue na artéria ou veia coccígea semanalmente ao longo de todo o período experimental. As amostras foram coletadas em tubos vacuolizados (vacutainer) de 10 ml contendo solução anticoagulante (heparina) por punção da artéria ou veia coccígea. As amostras de sangue foram transportadas ao laboratório em isopor com gelo. As análises foram agrupadas nos seguintes tempos -56, -28, -14, -7 dias em relação a previsão de parto, parto (+ 24 horas), 7, 14, 28 e 56 dias pós-parto.

No Laboratório de Imunodiagnóstico do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (LI-VCM-FMVZ-USP), a atividade funcional dos leucócitos sanguíneos foi analisada por meio da mensuração do metabolismo oxidativo basal e estimulado e da fagocitose- aferindo-se a internalização de bactérias marcadas com iodeto de propídeo

(*Staphylococcus aureus* –SaPI e *Escherichia coli*- EcPI) pela técnica de citometria de fluxo, conforme as técnicas empregadas por Kampem et al. (2004); Kampem Tollersrud e Lund (2004) e Azedo (2007).

5.11.1 Metabolismo oxidativo

O metabolismo oxidativo foi avaliado aferindo-se a indiretamente a produção intracelular de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), mensurando-se a oxidação intracelular de 2,7-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) em diclorofluoresceína (DCFH) conforme descrito por Kobzik, Godleski e Brain (1990) e Hirabayashiuchi, Tamiuchi e Kobayshi (2006). Em tubos de polipropileno próprios para citometria de fluxo, incubou-se 100 µl de sangue total com 200 µL de DCFH-DA¹⁷ (0,3 mM) em 1.2% solução PBS¹⁸ para a prova basal e com 200 µL de DCFH-DA¹⁹ (0,3 mM) em 1.2% solução PBS e 100 µL de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) a concentração de 25 x 10⁶ bactérias/mL para a prova estimulada a 37° C por 30 minutos em banho maria. Posteriormente interrompeu-se a reação com 2 mL de solução gelada de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (3 mM) e procedeu-se duas lises osmóticas das hemácias com solução salina a 0,2% e a 1,6%, realizando 3 centrifugações após cada etapa (250 g x 8 minutos a 4°C) para a posterior marcação das moléculas de superfície CD14 e CH 138. Após lavagem com PBS, ressuspendeu-se o botão celular com 400 µl de PBS com 10% BSA e realizou-se a leitura em citômetro de fluxo.

5.11.2 Fagocitose

Para a realização do ensaio da fagocitose, foi necessária a conjugação de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (O98:H28) a iodeto de propídio²⁰ (PI), conforme Hasui, Hirabayashi e Yohnosuke (1989) modificado por Souza (2010). Em tubos de polipropileno próprios para citometria de fluxo, incubou-se 100 µl de sangue total com µL de *Staphylococcus aureus* conjugado a iodeto de

propídio (Sa-PI) ou com 100 μL de *Escherichia coli* conjugado a iodeto de propídio (Ec-PI) a concentração de 25×10^6 bactérias/mL a 37°C por 30 minutos em banho maria. Posteriormente interrompeu-se a reação com 2 mL de solução gelada de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (3 mM) e procedeu-se duas lises osmóticas das hemácias com solução salina a 0,2% e a 1,6%, realizando centrifugações após cada etapa (250 g x 8 minutos a 4°C) para a posterior marcação das moléculas de superfície CD14 e CH 138. Após lavagem com PBS, ressuspendeu-se o botão celular com 400 μL de PBS com 10% BSA e realizou-se a leitura em citômetro de fluxo.

5.11.3 Avaliação da expressão da proteína CD14 e CH 138 em leucócitos sanguíneos

Após as lises osmóticas citadas, nas provas de metabolismo oxidativo e fagocitose, identificou-se os leucócitos sanguíneos como neutrófilos, por meio da expressão da molécula de superfície CH138 (TIZARD 2009), e como monócitos, por meio da expressão da molécula de superfície CD14 (TARAKTSOGLU et al., 2011; MACHUGH et al., 2012). Para tal, adicionou-se 0,25 μL do anticorpo monoclonal *mouse IgG1 anti-bovine CD14*²¹ e 0,25 μL do anticorpo monoclonal *mouse IgM anti-bovine CH138*²² a suspensão celular, incubando os tubos por 30 minutos a temperatura ambiente. Passado o período de incubação, procedeu-se a centrifugação e lavagem dos tubos com 1000 μL de PBS gelado (250 g x 8 minutos a 4°C), adicionando-se 0,25 μL do anticorpo monoclonal secundário *goat anti-mouse IgG1*²³ conjugado ao fluorocromo (FITC) *isotiocianato de fluoresceína* e 0,25 μL do anticorpo monoclonal secundário *goat anti-mouse IgM*²⁴ conjugado ao fluorocromo *Allophycocyanin* (APC) por 30 minutos a temperatura ambiente, protegidas da luminosidade. Após centrifugação e lavagem dos tubos com 1000 μL de PBS gelado (250 g x 8 minutos a 4°C), as células foram ressuspensas em 400 μL de PBS contendo 10% BSA e analisadas em citômetro de fluxo.

5.11.4 Análise em citometria de fluxo

Os ensaios de fagocitose, metabolismo oxidativo e imunofenotipagem foram analisados por citometria de fluxo em citômetro conectado a um computador com o programa CELLQUEST® (Becton Dickinson Immunocytometry Systems™). Foram analisados 20 mil eventos para os leucócitos sanguíneos, analisadas em *gates* de granulócitos e mononucleares baseado no citograma de granulosidade (SCC – *side scatter*) e tamanho (FSC – *forward scatter*), avaliando-se a porcentagem de células marcadas e a intensidade média de fluorescência por célula em software próprio²⁵ de acordo com Bass et al, (1983); Kobzik, Goedleski e Brain, (1990).

5.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foi utilizado delineamento inteiramente ao acaso, com os animais distribuídos aleatoriamente, de acordo com os grupos experimentais (0, 30, 60 e 90). As variáveis consumo e digestibilidade de matéria seca e de nutrientes, produção, composição e perfil de ácidos graxos do leite, escore de condição corporal e mudança de condição corporal, peso corporal e mudança de peso corporal, metabolitos plasmáticos, balanço de energia e nitrogênio, análises da função imune (fagocitose e adesão celular) foram analisadas pelo procedimento PROC MIXED do SAS 9.4 (SAS, 2012), utilizando seguinte modelo:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + S_j + T_i(S_j) + a(T_i) + e_{ij}$$

Onde: μ = média avaliada, T_i = efeito fixo de tratamento ($i=0; -30; -60; -90$); S_j = efeito fixo de semana ($j=-8$ a $+12$); $T_i(S_j)$ = interação semana*tratamento; $a(T_i)$ = efeito aleatório de animal dentro de tratamento; e_{ij} = erro aleatório. O modelo acima foi utilizado para as análises do pré e pós parto, sendo a variável tempo no pré parto as semanas -8, -7, -6, -5, -4, -3 -2, -1 semanas em relação ao parto, e no pós parto as semanas 1 a 12 em relação ao parto.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e regressão polinomial pelo comando PROC MIXED do SAS, versão 9.4 (SAS, 2012), adotando-se nível de significância de 5%.

Na análise do peso, mudança de peso corporal, a medida realizada aos 60 dias pré-parto foi utilizada como covariáveis no modelo, em nível de 5% de probabilidade, nos períodos pré e pós-parto, respectivamente.

As análises de qualidade oocitária e embrionária foram analisadas de acordo com o PROC MIXED do SAS 9.4 (SAS, 2012) utilizando o seguinte modelo:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + A_j + D_i(A_j) + e_{ij}$$

Onde: μ = média avaliada, T_i = efeito fixo de tratamento ($i = 0; 30; 60; 90$); A_j = efeito fixo de tempo (dias da aspiração folicular; $j = 21; 42; 63; 84$); $T_i(A_j)$ = interação aspiração folicular*tratamento; $a(T_i)$ = efeito aleatório de animal dentro de tratamamento; e_{ij} = erro aleatório. O modelo acima será utilizado para as análises nos dias das aspirações foliculares, 21 ± 3 dias 42 ± 7 dias, 63 ± 7 dias e 84 ± 7 dias de lactação.

As variáveis reprodutivas foram analisadas por regressão polinomial pelo comando PROC MIXED do SAS, versão 9.4 (SAS, 2012), adotando-se nível de significância de 5%.

6 RESULTADOS

6.1 CONSUMO DE MATÉRIA SECA E NUTRIENTES

No período pré-parto foi observado ($P < 0,05$) efeito de dieta para consumo de extrato etéreo (CEE). Foi observado efeito ($P < 0,05$) de semana para todas as variáveis mensuradas tanto no pré como no pós-parto. Ainda, no período pré-parto foi observado efeito ($P < 0,05$) de interação e linear crescente para CEE. (Tabela 6; Figura 5)

Tabela 6 - Médias ($\pm$ EPM) do consumo de matéria e nutrientes no período pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais

Item	Dietas experimentais ¹				Probabilidades ²				
	0	30	60	90	Dieta	Semana	INT	L	Q
<i>Consumo Kg/dia</i>									
Matéria seca									
PréP	12,6 $\pm$ 0,96	12,0 $\pm$ 0,95	11,3 $\pm$ 0,73	11,3 $\pm$ 0,82	0,748	<0,001	0,187	0,310	0,910
PósP	18,5 $\pm$ 1,49	19,3 $\pm$ 1,48	18,6 $\pm$ 1,15	18,4 $\pm$ 1,29	0,967	<0,001	0,189	0,901	0,707
Matéria orgânica									
PréP	11,6 $\pm$ 0,89	11,0 $\pm$ 0,88	10,4 $\pm$ 0,68	10,4 $\pm$ 0,76	0,770	<0,001	0,181	0,332	0,902
PósP	17,3 $\pm$ 1,39	18,1 $\pm$ 1,39	17,4 $\pm$ 1,08	17,3 $\pm$ 1,20	0,967	<0,001	0,188	0,897	0,705
Proteína bruta									
PréP	1,4 $\pm$ 0,12	1,3 $\pm$ 0,11	1,2 $\pm$ 0,10	1,3 $\pm$ 0,10	0,886	<0,001	0,060	0,637	0,698
PósP	3,2 $\pm$ 0,26	3,4 $\pm$ 0,26	3,2 $\pm$ 0,20	3,2 $\pm$ 0,22	0,966	<0,001	0,162	0,934	0,761
Extrato etéreo									
PréP	0,41 ^a $\pm$ 0,05	0,54 ^{ab} $\pm$ 0,06	0,69 ^b $\pm$ 0,04	0,68 ^b $\pm$ 0,04	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,130
PósP	1,1 $\pm$ 0,09	1,1 $\pm$ 0,09	1,1 $\pm$ 0,07	1,1 $\pm$ 0,07	0,934	<0,001	0,149	0,957	0,604
Fibra em detergente neutro									
PréP	5,3 $\pm$ 0,44	5,3 $\pm$ 0,43	4,9 $\pm$ 0,33	5,0 $\pm$ 0,38	0,826	<0,001	0,165	0,460	0,920
PósP	6,0 $\pm$ 0,49	6,4 $\pm$ 0,48	6,1 $\pm$ 0,37	6,1 $\pm$ 0,42	0,934	<0,001	0,227	0,997	0,591
Carboidrato não fibroso									
PréP	4,3 $\pm$ 0,33	4,0 $\pm$ 0,33	3,6 $\pm$ 0,26	3,5 $\pm$ 0,29	0,219	<0,001	0,132	0,072	0,567
PósP	7,0 $\pm$ 0,56	7,2 $\pm$ 0,56	7,0 $\pm$ 0,43	6,9 $\pm$ 0,49	0,980	<0,001	0,179	0,783	0,799
Nutrientes digestíveis totais									
PréP	9,0 $\pm$ 0,74	8,9 $\pm$ 0,73	8,6 $\pm$ 0,57	8,5 $\pm$ 0,64	0,931	<0,001	0,068	0,531	0,910
PósP	14,8 $\pm$ 1,17	15,3 $\pm$ 1,17	14,8 $\pm$ 0,90	14,7 $\pm$ 1,02	0,976	<0,001	0,142	0,860	0,777
<i>Consumo %PC</i>									
Matéria seca									
PréP	1,7 $\pm$ 0,14	1,7 $\pm$ 0,14	1,6 $\pm$ 0,10	1,7 $\pm$ 0,12	0,904	<0,001	0,124	0,550	0,907
PósP	3,0 $\pm$ 0,18	3,3 $\pm$ 0,18	3,0 $\pm$ 0,14	3,1 $\pm$ 0,15	0,500	<0,001	0,085	0,836	0,606
Fibra em detergente neutro									
PréP	0,7 $\pm$ 0,06	0,8 $\pm$ 0,05	0,7 $\pm$ 0,05	0,7 $\pm$ 0,05	0,916	<0,001	0,068	0,794	0,937
PósP	1,0 $\pm$ 0,06	1,1 $\pm$ 0,06	1,0 $\pm$ 0,05	1,0 $\pm$ 0,05	0,410	<0,001	0,078	0,684	0,459

¹Grupo 0: Animais não receberam dieta contendo GSI no pré-parto; ²Grupo 30: Início do fornecimento de dieta com GSI nos 30 dias finais da gestação; ³Grupo 60: Início do fornecimento de dieta com GSI nos 60 dias finais da gestação; ⁴Grupo 90 Início do fornecimento de dieta com GSI nos 90 dias finais da gestação. ²Efeito de dieta; Efeito de Semana; Interação entre dieta x semana (INT); Efeito Linear (L); Efeito quadrático (Q).

O efeito de semana para as variáveis mensuradas de consumo de matéria seca e nutrientes já eram esperados, pois animais no período de transição e início de lactação,

devido as mudanças fisiológicas que antecedem o parto, durante o parto e pós-parto, somado ao aumento do tamanho do feto no terço final de gestação e maior preenchimento do espaço da cavidade abdominal, proporcionam uma queda gradativa no consumo do animal quanto mais próximo ao parto e um aumento no consumo gradativo no início da lactação na tentativa de suprir a demanda energética e de nutrientes exigida para produção de leite, principalmente (BELL, 1995).

O efeito de semana no consumo de matéria seca durante o período experimental nos diferentes grupos experimentais pode ser melhor visualizado nas figuras 3 e 4.

Figura 3 - Consumo de matéria seca (kg/dia) nos períodos pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais

Figura 4 - Consumo de matéria seca em porcentagem peso vivo (%PV) nos períodos pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais

Ao analisar o CEE no pré-parto, o maior consumo das vacas dos grupos 60 e 90 (0,69 e 0,68 kg/dia, respectivamente), o menor nas do grupo 0 (0,41 kg/dia) e intermediário para as do grupo 30 (0,54 kg/dia) está relacionado unicamente ao início da suplementação com a dieta contendo grão de soja. O controle de consumo dos animais nesse experimento começou a ser realizado a partir dos 60 dias anteriores a expectativa de parto, assim as vacas dos grupos 60 e 90 já estavam recebendo a dieta contendo GSI (aproximadamente 67,0% de EE maior que a dieta sem GSI), logo ao comparar com os grupos 30 e 0 que começaram a receber a dieta com GSI com 30 dias antes da previsão de parto e no dia do parto, respectivamente, era esperado um maior consumo médio de EE nos grupos que começaram a ser suplementado primeiro (grupos 90 e 60), e ainda efeito de interação como poder ser melhor observado na figura 5.

Figura 5 - Consumo de extrato etéreo (EE; kg/dia) nos períodos pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais. INT.: Semanas -4, -3, -2 e -1 (0^a vs. 30^b vs. 60^b vs. 90^b; P<0,05)

Estudos demonstram divergências em relação ao consumo de matéria seca e nutrientes quando vacas são alimentadas com dietas contendo AGSs e/ou AGPIs, onde autores (HAYIRLI et al., 2011; BADIEI et al., 2014) encontraram diminuição no consumo de MS no pré-parto e outros (CHILLIARD et al., 2009; GRECO et al., 2015; GANDRA et al., 2016 no prelo¹⁰) nenhuma alteração. E quando há uma queda no CMS e/ou nutrientes pode ser devido a palatabilidade, quantidade e forma da dieta (NRC, 2001; STAPLES et al., 2001; ONETTI; GRUMMER, 2004;), a capacidade dos AGs em estimular a liberação de peptídeos do intestino que levam a um *feedback* negativo no consumo (BRADFORD et al., 2008; ALIZADEH et al., 2012; BADIEI et al., 2014), a um aumento potencial na oxidação hepática (MASHEK et al., 2002), ambos os quais têm sido associados à saciedade (ALLEN et al., 2009). Porém no presente estudo como não houve queda de consumo de matéria seca e nutrientes no pré-parto. E a suplementação prolongada com dietas contendo GSI no pré-parto não alterou (P>0,05) o consumo de matéria seca e nutrientes nos diferentes grupos no pós-parto.

Rabiee et al. (2012) em meta-análise utilizaram 59 artigos e 86 comparações sobre suplementação de gorduras para vacas leiteiras em lactação e observaram uma diminuição de $0,78 \pm 1,20$ kg/dia no CMS quando estas continham Ca-AGs e diminuição de $0,33 \pm 1,61$ kg/dia no CMS quando estas continham sementes de

¹⁰ GANDRA, J.R.; BARLETTA, R.V.; MINGOTI, R.D.; VERDURICO, L.C.; FREITAS JUNIOR, J.E.; OLIVEIRA, L.J.; TAKIYA, C.S.; KFOURY JUNIOR, J.R.; WILTBANK, M.C.; RENNO, F.P. Effects of whole flaxseed, raw soybeans, and calcium salts of fatty acids on measures of cellular immune function of transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 2016. No prelo.

oleaginosas quando comparadas as dietas controle sem suplementação de gordura. Ainda em meta-análise realizada por Rodney et al. (2015), mostraram que a maioria das fontes suplementares de ácidos graxos causam uma diminuição no CMS em vacas em lactação em média de 880g/vaca/dia independente da fonte utilizada e os autores através de regressão multivariada demonstra que o fator determinante para o controle do CMS não está inteiramente relacionado com os níveis de ácidos graxos nas dietas, mas sim com o tempo e o período de suplementação das fontes de ácidos graxos independentemente do grau de instauração destas fontes. Porém os autores não demonstraram se há algum efeito no tempo de suplementação no período que antecede o parto sobre o consumo no início da lactação, fato este não observado no presente estudo, ainda no presente estudo as vacas no pós-parto receberam a mesma dieta independente do grupo experimental, assim caso houve alguma diminuição CMS foi proporcional em todos grupos.

6.2 DIGESTIBILIDADE DA MATÉRIA SECA E NUTRIENTES

No período pré-parto observou-se efeito ($P < 0,05$) de semana para o coeficiente de digestibilidade de proteína bruta (CDPB). Já no período pós-parto observou-se efeito ($P < 0,05$) de semana para todas as variáveis mensuradas (Figuras 6, 7, 8, 9, 10 e 11). Tanto no pré como no pós-parto não houve efeito ($P > 0,05$) de interação, linear e/ou quadrático para as variáveis mensuradas.

Tabela 7 - Médias ($\pm$ EPM) da digestibilidade aparente total da matéria seca e nutrientes no período pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais

Item	Dietas experimentais ¹				Probabilidades ²				
	0	30	60	90	Dieta	Tempo	INT	L	Q
<i>Coefficiente de Digestibilidade (%)</i>									
Matéria seca									
PréP	71,5 $\pm$ 1,29	70,9 $\pm$ 1,26	73,2 $\pm$ 0,97	73,7 $\pm$ 1,09	0,165	0,205	0,203	0,059	0,582
PósP	67,1 $\pm$ 2,16	66,4 $\pm$ 2,17	67,3 $\pm$ 1,66	67,6 $\pm$ 1,86	0,667	<0,001	0,892	0,557	0,607
Matéria orgânica									
PréP	75,1 $\pm$ 1,33	74,1 $\pm$ 1,28	75,9 $\pm$ 1,00	75,6 $\pm$ 1,11	0,701	0,306	0,227	0,520	0,766
PósP	70,6 $\pm$ 2,16	68,9 $\pm$ 2,17	69,6 $\pm$ 1,66	69,4 $\pm$ 1,86	0,772	<0,001	0,785	0,684	0,562
Proteína bruta									
PréP	69,2 $\pm$ 1,52	69,6 $\pm$ 1,43	69,6 $\pm$ 1,10	70,2 $\pm$ 1,24	0,122	0,002	0,802	0,123	0,512
PósP	71,0 $\pm$ 1,86	70,8 $\pm$ 1,87	70,4 $\pm$ 1,43	70,2 $\pm$ 1,60	0,735	0,002	0,507	0,394	0,544
Extrato etéreo									
PréP	87,4 $\pm$ 1,95	87,6 $\pm$ 1,97	87,0 $\pm$ 1,47	88,1 $\pm$ 1,64	0,967	0,351	0,556	0,866	0,799
PósP	82,7 $\pm$ 1,94	81,1 $\pm$ 1,94	82,2 $\pm$ 1,49	85,1 $\pm$ 1,67	0,422	<0,001	0,288	0,316	0,207
Fibra em detergente neutro									
PréP	63,3 $\pm$ 1,82	61,3 $\pm$ 1,76	63,5 $\pm$ 1,37	62,1 $\pm$ 1,52	0,738	0,079	0,124	0,723	0,766
PósP	48,3 $\pm$ 2,58	48,2 $\pm$ 2,58	49,4 $\pm$ 1,98	48,7 $\pm$ 2,21	0,729	0,002	0,741	0,660	0,456
Carboidrato não fibroso									
PréP	81,3 $\pm$ 1,22	82,6 $\pm$ 1,14	82,2 $\pm$ 0,90	83,3 $\pm$ 1,00	0,586	0,915	0,583	0,221	0,615
PósP	78,1 $\pm$ 2,42	77,3 $\pm$ 2,03	78,5 $\pm$ 1,96	77,6 $\pm$ 1,96	0,245	<0,001	0,852	0,632	0,625

¹Grupo 0: Animais não receberam dieta contendo GSI no pré-parto; ²Grupo 30: Início do fornecimento de dieta com GSI nos 30 dias finais da gestação; ³Grupo 60: Início do fornecimento de dieta com GSI nos 60 dias finais da gestação; ⁴Grupo 90 Início do fornecimento de dieta com GSI nos 90 dias finais da gestação. ²Efeito de dieta; Efeito de Semana; Interação entre dieta x semana (INT); Efeito Linear (L); Efeito quadrático (Q).

A suplementação com lipídeos pode influenciar a digestibilidade da dieta por uma série de fatores (NRC, 2001). A forma utilizada (sais de cálcio, sementes de oleaginosas, óleo), o nível de inclusão, o volumoso e a relação volumoso:concentrado utilizados podem influenciar na digestibilidade dos nutrientes (ONETTI; GRUMMER, 2004). No entanto, no presente estudo a suplementação prolongada com dietas contendo GSI no pré-parto não alterou ($P>0,05$) a digestibilidade da matéria seca e nutrientes nos diferentes grupos tanto no pré como no pós-parto.

Segundo Palmquist (1988), o efeito dos AGs sobre a degradabilidade ruminal de nutrientes pode ser minimizada se a dieta contiver alta quantidade de volumoso, pois segundo o autor altas quantidades de fibra fazem com que o rúmen mantenha seu funcionamento normal, não interferindo na fermentação ruminal. Provavelmente no pré-parto do presente estudo ocorreu isso, onde as dietas apresentavam um relação

volumoso:concentrado de 80:20 (do dia -60 a -30 da expectativa de parto) e 70:30 (do dia -30 ao dia do parto), assim mesmo os grupos que apresentavam inclusão de GSI não apresentaram alteração na digestibilidade aparente total da matéria seca e nutrientes.

Palmquist e Mattos (2006) em estudo verificaram que dietas contendo gorduras protegidas (Ca-AGs e sementes de oleaginosas) apresentaram melhor digestibilidade de nutrientes que aquelas contendo gordura na forma não protegida, fato este que reforça a hipótese deste estudo que a inclusão de GSI não prejudica a digestibilidade dos nutrientes.

Apesar da dieta pós-parto ser única para todos os grupos experimentais os valores de digestibilidade encontrados nos diferentes grupos não diferiram ($P>0,05$) e são semelhantes a outros estudos que utilizaram GSI na alimentação de vacas leiteiras (FREITAS JUNIOR; 2008; NAVES et al., 2010; BARLETTA et al., 2012; CALOMENI et al., 2015; VENTURELLI et al., 2015).

Ainda, o efeito ($P<0,05$) de tempo nos pós-parto para o coeficiente de digestibilidade da matéria seca e nutrientes era esperado. A vaca ao parir há um aumento gradual no consumo de matéria seca (Figuras 3 e 4) na tentativa de suprir a demanda energética para a produção de leite. O aumento de ingestão de CMS faz com que aumente a taxa de passagem da digesta no rúmen, consequentemente há uma queda na digestibilidade da matéria seca e nutrientes devido ao menor tempo que o alimento fica no rúmen para ser digerido (HAVARTINE; ALLEN, 2006). (Figuras 6, 7, 8, 9, 10 e 11).

Figura 6 - Coeficiente de digestibilidade da matéria seca nos períodos pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais

Figura 7 - Coeficiente de digestibilidade da proteína bruta nos períodos pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais

Figura 8 - Coeficiente de digestibilidade do extrato etéreo nos períodos pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais

Figura 9 - Coeficiente de digestibilidade do FDN nos períodos pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais

6.3 BALANÇO DE ENERGIA

Observou-se efeito ($P<0,05$) de semana para todas as variáveis mensuradas tanto no pré como no pós-parto, com exceção da Energia líquida de ganho (Mcal/dia) no pré-parto. Ainda para as demais variáveis mensuradas não houve efeito ($P>0,05$) de dieta, interação, linear ou quadrático (Tabela 8).

Tabela 8 - Média ($\pm$ EPM) do balanço de energia de acordo com os grupos experimentais

Item	Dietas experimentais ¹				Probabilidades ²				
	0	30	60	90	Dieta	Semana	Int	L	Q
<i>Consumo de Energia (Mcal/dia)</i>									
Energia bruta									
PréP	48,7 $\pm$ 3,91	47,7 $\pm$ 3,88	46,0 $\pm$ 3,00	45,8 $\pm$ 3,36	0,927	<0,001	0,064	0,528	0,904
PósP	78,9 $\pm$ 6,28	81,9 $\pm$ 6,27	78,9 $\pm$ 4,86	78,6 $\pm$ 5,43	0,978	<0,001	0,164	0,877	0,778
Energia digestível									
PréP	39,0 $\pm$ 3,13	38,2 $\pm$ 3,10	36,8 $\pm$ 2,40	36,6 $\pm$ 2,69	0,927	<0,001	0,061	0,523	0,908
PósP	63,1 $\pm$ 5,03	65,5 $\pm$ 5,01	63,1 $\pm$ 3,89	62,8 $\pm$ 4,34	0,978	<0,001	0,164	0,877	0,778
Energia Metabolizável									
PréP	33,8 $\pm$ 2,72	33,1 $\pm$ 2,70	32,1 $\pm$ 2,09	31,9 $\pm$ 2,33	0,945	<0,001	0,063	0,561	0,912
PósP	55,4 $\pm$ 4,40	57,3 $\pm$ 4,39	55,3 $\pm$ 3,40	55,0 $\pm$ 3,80	0,978	<0,001	0,157	0,872	0,786
Energia líquida de Lactação									
PréP	21,4 $\pm$ 1,72	21,0 $\pm$ 1,72	20,4 $\pm$ 1,33	20,3 $\pm$ 1,48	0,957	<0,001	0,067	0,594	0,913
PósP	35,4 $\pm$ 2,80	36,6 $\pm$ 2,80	35,2 $\pm$ 2,17	35,2 $\pm$ 2,43	0,979	<0,001	0,152	0,867	0,793
<i>Produção de Energia (Mcal/dia)</i>									
Energia líquida de lactação									
PósP	20,7 $\pm$ 1,78	24,1 $\pm$ 1,78	20,9 $\pm$ 1,38	22,3 $\pm$ 1,54	0,488	<0,001	0,080	0,825	0,546
Energia líquida de ganho									
PréP	1,2 $\pm$ 0,23	1,7 $\pm$ 0,19	1,2 $\pm$ 0,16	1,1 $\pm$ 0,17	0,095	0,280	0,265	0,345	0,129
PósP	-2,0 $\pm$ 0,36	-1,8 $\pm$ 0,34	-1,2 $\pm$ 0,26	-1,5 $\pm$ 0,29	0,246	<0,001	0,545	0,139	0,415
Energia líquida de manutenção									
PréP	11,3 $\pm$ 0,54	10,9 $\pm$ 0,54	10,7 $\pm$ 0,42	10,6 $\pm$ 0,47	0,806	<0,001	0,511	0,341	0,837
PósP	10,0 $\pm$ 0,47	9,5 $\pm$ 0,47	9,9 $\pm$ 0,36	9,5 $\pm$ 0,40	0,809	<0,001	0,951	0,649	0,862
Energia líquida de gestação									
PréP	4,0 $\pm$ 0,04	4,0 $\pm$ 0,04	3,9 $\pm$ 0,03	4,0 $\pm$ 0,03	0,693	<0,001	0,069	0,313	0,625
<i>Balanço de Energia (Mcal/dia)</i>									
Balanço									
PréP	7,4 $\pm$ 1,63	7,9 $\pm$ 1,61	6,9 $\pm$ 1,24	6,9 $\pm$ 1,39	0,962	<0,001	0,078	0,722	0,873
PósP	2,7 $\pm$ 2,02	0,9 $\pm$ 1,99	3,3 $\pm$ 1,55	1,8 $\pm$ 1,73	0,783	<0,001	0,173	0,963	0,917
<i>Eficiência</i>									
EL _L /CED									
PósP	0,35 $\pm$ 0,02	0,40 $\pm$ 0,02	0,34 $\pm$ 0,02	0,37 $\pm$ 0,02	0,271	<0,001	0,058	0,939	0,537
EL _L +EL _G /CED									
PósP	0,29 $\pm$ 0,02	0,32 $\pm$ 0,02	0,31 $\pm$ 0,02	0,32 $\pm$ 0,02	0,710	<0,001	0,139	0,436	0,711

¹Grupo 0: Animais não receberam dieta contendo GSI no pré-parto; ²Grupo 30: Início do fornecimento de dieta com GSI nos 30 dias finais da gestação; ³Grupo 60: Início do fornecimento de dieta com GSI nos 60 dias finais da gestação; ⁴Grupo 90 Início do fornecimento de dieta com GSI nos 90 dias finais da

gestação. ²Efeito de dieta; Efeito de Semana; Interação entre dieta x semana (Int); Efeito Linear (L); Efeito quadrático (Q).

A inclusão de gordura na dieta é uma estratégia para minimizar o balanço energético negativo e aumentar a densidade energética da dieta para vacas no período de transição e início de lactação (STAPLES et al., 1998). Porém neste estudo a suplementação prolongada no pré-parto não alterou o consumo, produção, balanço e eficiência na utilização de energia no pré-parto e também não interferiu os mesmos no pós-parto.

No pré-parto apesar dos grupos que começaram a receber primeiro a dieta contendo GSI (grupos 90, 60 e 30, respectivamente) apresentarem maior densidade energética na dieta em relação ao que começou a receber somente no parto (25% a mais de EB, aproximadamente), não apresentaram diferença no balanço de energia entre eles e nem em relação ao grupo de que começou a receber no dia do parto (Grupo 0). Para entender porque isso ocorreu, ao observarmos o CMS dos diferentes grupos experimentais no pré-parto (Tabela 5), não ocorreu nenhuma diferença ($P>0,05$) entre os grupos, porém numericamente houve uma diminuição no CMS quanto maior foi o tempo de suplementação com GSI no pré-parto. Essa diminuição foi de aproximadamente 12% (1,3 kg/dia de MS, entre o grupo 0 e 90). Portanto, esperava-se que animais alimentados por mais tempo com dietas com GSI apresentassem maior consumo, balanço e eficiência de energia no pré-parto, porém devido a essa diferença numérica ($P>0,05$) de CMS e consequentemente de energia, é plausível entender porque isso não ocorreu.

Segundo Staples et al. (1998), a suplementação de gordura no período de transição e início de lactação pode deprimir o balanço de energia em vacas leiteiras. Fato este observado por Moallem et al. (2007) onde encontraram efeito negativo no balanço de energia em vacas alimentadas com Ca-AGIs no pré e pós-parto. Porém, autores (AMARAL, 2008; JUCHEM et al., 2008; GANDRA et al., 2015) ao alimentarem vacas leiteiras com e sem $\omega 6$ na dieta no pré-parto (30 dias antes da expectativa de parto) e início de lactação, não observaram diferença no consumo e balanço de energia entre os grupos experimentais. Mas, Greco et al. (2015) ao comparar três níveis de inclusão de $\omega 6$ (1,4, 1,5 e 1,6 %MS de ácido linoleico) na dieta de vacas leiteiras no pré e pós-parto (-30d a 100d de lactação) observou melhor balanço de energia em vacas alimentadas com a maior inclusão de ácido linoleico. No presente estudo a quantidade de ácido linoleico na dieta ficou aproximadamente 1,5% da MS.

Ainda, ao avaliar o gráfico do balanço de energia (Figura 10) durante o tempo experimental é notório que o maior tempo de suplementação de vacas no pré-parto neste estudo não influenciou o balanço de energia dos diferentes grupos experimentais, tanto no pré como no pós-parto. Onde os animais dos diferentes grupos já se encontravam em balanço positivo com aproximadamente 5 semanas de lactação.

Balanco positivo energético em torno de 40 dias pós-parto também foi observado por outros autores (CALDARI-TORRES et al., 2011; GANDRA, 2012; GRECO, 2014) quando alimentaram vacas com dietas contendo algum tipo de ácido graxo insaturado ($\omega 3$ e/ou $\omega 6$).

Figura 10 - Balanço de energia, nos períodos pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais

6.4 BALANÇO DE NITROGÊNIO

Observou-se efeito ($P < 0,05$) de semana para todas as variáveis mensuradas tanto no pré como no pós-parto, com exceção no pré-parto da excreção de nitrogênio fecal (ENF; g/dia), porcentagem de excreção de nitrogênio fecal (ENF; %NT) e porcentagem de excreção de urina (ENU; %NT). Ainda para as demais variáveis mensuradas não houve efeito ($P > 0,05$) de dieta, interação, linear ou quadrático (Tabela 9).

Tabela 9 - Média ($\pm$ EPM) do balanço de nitrogênio de acordo com os grupos experimentais

Item	Dietas experimentais ¹				Probabilidades ²				
	0	30	60	90	Dieta	Semana	INT	L	Q
<i>Consumo de nitrogênio (g/dia)</i>									
Nitrogênio total									
PréP	223,2 $\pm$ 19,3	210,7 $\pm$ 18,8	197,2 $\pm$ 14,5	205,0 $\pm$ 16,2	0,885	<0,001	0,063	0,643	0,691
PósP	513,2 $\pm$ 41,6	537,2 $\pm$ 41,5	513,1 $\pm$ 32,1	518,2 $\pm$ 35,9	0,862	<0,001	0,178	0,850	0,767
<i>Excreção de nitrogênio (g/dia)</i>									
Fezes									
PréP	71,1 $\pm$ 5,0	69,0 $\pm$ 4,5	61,5 $\pm$ 3,5	62,0 $\pm$ 3,9	0,301	<0,001	0,697	0,092	0,762
PósP	157,1 $\pm$ 16,5	163,3 $\pm$ 12,6	163,2 $\pm$ 12,8	162,9 $\pm$ 14,3	0,366	<0,001	0,458	0,630	0,617
Urina									
PréP	121,8 $\pm$ 13,5	119,3 $\pm$ 13,3	115,8 $\pm$ 10,4	123,3 $\pm$ 11,7	0,801	0,066	0,356	0,737	0,667
PósP	148,0 $\pm$ 10,7	150,8 $\pm$ 10,7	157,6 $\pm$ 9,0	155,8 $\pm$ 9,2	0,445	<0,001	0,824	0,554	0,784
Leite									
PósP	143,6 $\pm$ 9,8	147,8 $\pm$ 9,8	137,1 $\pm$ 7,5	141,2 $\pm$ 8,4	0,361	<0,001	0,352	0,669	0,753
<i>Balanço de nitrogênio (g/dia)</i>									
Nitrogênio absorvido									
PréP	147,0 $\pm$ 13,7	141,3 $\pm$ 13,0	138,8 $\pm$ 10,7	147,8 $\pm$ 10,3	0,859	<0,001	0,092	0,444	0,735
PósP	354,0 $\pm$ 28,3	366,0 $\pm$ 28,1	348,8 $\pm$ 21,8	355,0 $\pm$ 24,4	0,775	<0,001	0,191	0,773	0,829
Nitrogênio retido									
PréP	28,7 $\pm$ 8,2	21,1 $\pm$ 7,7	27,6 $\pm$ 6,1	24,1 $\pm$ 6,8	0,840	<0,001	0,110	0,768	0,737
PósP	67,1 $\pm$ 18,4	63,2 $\pm$ 18,4	66,8 $\pm$ 14,0	61,2 $\pm$ 15,9	0,204	<0,001	0,563	0,714	0,892
<i>Excreção de nitrogênio (% nitrogênio total)</i>									
Fezes									
PréP	31,0 $\pm$ 1,1	30,9 $\pm$ 1,0	30,4 $\pm$ 0,8	30,0 $\pm$ 0,9	0,860	0,372	0,475	0,236	0,610
PósP	30,6 $\pm$ 1,7	30,7 $\pm$ 1,8	31,6 $\pm$ 1,3	30,8 $\pm$ 1,5	0,223	0,035	0,423	0,765	0,697
Urina									
PréP	55,4 $\pm$ 3,7	59,4 $\pm$ 3,4	57,5 $\pm$ 2,7	60,3 $\pm$ 2,9	0,670	0,164	0,110	0,257	0,842
PósP	30,9 $\pm$ 3,0	31,2 $\pm$ 2,8	33,2 $\pm$ 2,2	35,3 $\pm$ 2,5	0,637	<0,001	0,325	0,230	0,705
Leite									
PósP	29,1 $\pm$ 1,3	29,5 $\pm$ 1,3	28,2 $\pm$ 1,0	27,9 $\pm$ 1,1	0,494	<0,001	0,852	0,385	0,782
<i>Balanço de Nitrogênio (% nitrogênio total)</i>									
Nitrogênio absorvido									
PréP	66,6 $\pm$ 1,5	66,3 $\pm$ 1,3	68,3 $\pm$ 1,1	69,4 $\pm$ 1,2	0,159	0,003	0,531	0,063	0,626
PósP	70,7 $\pm$ 2,1	68,7 $\pm$ 2,1	68,4 $\pm$ 1,6	69,2 $\pm$ 1,8	0,623	0,049	0,623	0,589	0,455
Nitrogênio retido									
PréP	12,5 $\pm$ 4,4	7,5 $\pm$ 4,2	11,7 $\pm$ 3,3	9,7 $\pm$ 3,6	0,631	0,006	0,212	0,586	0,837
PósP	10,4 $\pm$ 3,5	8,4 $\pm$ 3,4	9,2 $\pm$ 2,6	7,3 $\pm$ 2,9	0,823	0,020	0,756	0,554	0,842
Eficiência (<i>N leite/N consumido</i>)									
PósP	0,27 $\pm$ 0,02	0,30 $\pm$ 0,02	0,28 $\pm$ 0,01	0,28 $\pm$ 0,01	0,498	<0,001	0,772	0,883	0,376

¹Grupo 0: Animais não receberam dieta contendo GSI no pré-parto; ²Grupo 30: Início do fornecimento de dieta com GSI nos 30 dias finais da gestação; ³Grupo 60: Início do fornecimento de dieta com GSI nos 60 dias finais da gestação; ⁴Grupo 90 Início do fornecimento de dieta com GSI nos 90 dias finais da gestação. ²Efeito de dieta; Efeito de Semana; Interação entre dieta x semana (INT); Efeito Linear (L); Efeito quadrático (Q).

O efeito ($P<0,05$) de semana já era esperado, principalmente no pós-parto devido ao aumento de CMS e consequentemente aumento de ingestão de nitrogênio. Ainda,

alterações na excreção, balanço, absorção e retenção de nitrogênio no início da lactação ocorre também devido a uma maior mobilização de aminoácidos musculares, visando suprir o déficit de nutrientes dos animais neste período e maior utilização dos aminoácidos essenciais para a produção de leite devido a condição homeorrética das vacas leiteiras para a produção de leite (OVERTON; WALDRON, 2004).

Outro evento metabólico que pode contribuir para alterar o balanço de nitrogênio em vacas leiteiras no decorrer do período de transição e início de lactação é a sobrecarga hepática nestes períodos, principalmente decorrente da metabolização de gordura e formação de corpos cetônicos, diminuindo a transformação de amônia em ureia no ciclo da ureia, consequente diminuição da reciclagem de ureia via saliva, aumentando assim a concentração de nitrogênio na urina (CHIBISA et al., 2008) (Figura 11).

Figura 11 - Excreção de nitrogênio urinário, nos períodos pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais

Também como era esperado a suplementação prolongada com GSI no pré-parto não alterou o consumo, excreção, balanço, absorção e retenção de nitrogênio no pré-parto e também não interferiu os mesmos no pós-parto. O nitrogênio absorvido (g/dia) nos diferentes grupos experimentais no pré-parto manteve-se em média de 144,8 g/dia, está quantidade de nitrogênio absorvido equivale aproximadamente a 9,05% de PB absorvida diariamente, sendo que as dietas foram balanceadas para 10,7% de PB, cerca de 1,65% estão excedendo a exigência diária para vacas leiteiras no pré-parto. Estes

resultados estão próximos aos relatados por outros autores (GRUMMER, 1995; PETIT, 2002; GANDRA, 2012), onde constataram perdas inferiores a 2,0% de PB na urina e fezes ao longo do pré-parto.

O nitrogênio absorvido nos diferentes grupos durante o período pode ser melhor avaliado na Figura 12, onde é possível verificar menor absorção durante o período de transição e consequente aumento no pós-parto semelhante ao gráfico de consumo de nitrogênio (Figura 13).

Figura 12 - Nitrogênio absorvido, nos períodos pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais

Figura 13 - Consumo de nitrogênio, nos períodos pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais

A ausência de diferença no balanço de nitrogênio tanto no pré como no pós-parto entre os grupos experimentais é plausível, pois os grupos experimentais não apresentaram diferença no consumo (Tabela 6) e digestibilidade (Tabela 7) de proteína e o fato de que também não houve diferença nas concentrações de nitrogênio uréico no leite e no soro entre os grupos experimentais, e sendo as rações utilizadas neste estudo isoprotéicas, tanto no pré como no pós-parto (Tabela 5) justificam este resultado.

Gandra (2012), observou apenas aumento na excreção de nitrogênio fecal (g/dia) no período pré-parto de vacas que tiveram inclusão de lipídeos na dieta (Ca-AGIs ou GSI ou semente de linhaça) em relação ao grupo sem inclusão e para as outras variáveis mensuradas (consumo de nitrogênio, balanço de nitrogênio) não observou diferença.

Poucos são os estudos que mensuraram o efeito da alimentação prolongada com alguma fonte de AGPI ou mesmo outro tipo de gordura sobre balanço de nitrogênio. A maioria dos estudos investigam outros parâmetros, tornando-se difícil uma comparação de dados.

6.5 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE

Observou-se efeito ($P<0,05$) de semana para todas os parâmetros mensurados (produção de leite, produção e teor de gordura, lactose e proteína), a exceção PLC. Ainda, não foi observado efeito ($P>0,05$) de dieta, interação entre dieta e semana, efeito linear e quadrático para nenhum dos parâmetros mensurados. (Tabela 10)

Tabela 10 - Média ($\pm$ EPM) da produção e composição do leite de acordo com os grupos experimentais

Item	Dietas experimentais ¹				Probabilidades ²				
	0	30	60	90	Dieta	Semana	INT	L	Q
<i>Kg/ dia</i>									
PL	29,6 $\pm$ 0,88	30,6 $\pm$ 0,78	29,4 $\pm$ 0,75	30,1 $\pm$ 0,72	0,434	<0,001	0,208	0,684	0,326
PLC	33,6 $\pm$ 0,89	33,7 $\pm$ 0,90	33,3 $\pm$ 0,81	34,2 $\pm$ 0,89	0,597	0,235	0,110	0,791	0,593
Gordura	1,21 $\pm$ 0,05	1,23 $\pm$ 0,04	1,24 $\pm$ 0,04	1,23 $\pm$ 0,04	0,693	0,002	0,068	0,676	0,884
Proteína	0,91 $\pm$ 0,04	0,92 $\pm$ 0,04	0,89 $\pm$ 0,03	0,92 $\pm$ 0,03	0,358	<0,001	0,416	0,694	0,260
Lactose	1,35 $\pm$ 0,05	1,41 $\pm$ 0,05	1,34 $\pm$ 0,04	1,40 $\pm$ 0,04	0,363	<0,001	0,216	0,713	0,258
<i>Teor (%)</i>									
Gordura	4,14 $\pm$ 0,07	4,09 $\pm$ 0,07	4,11 $\pm$ 0,06	4,20 $\pm$ 0,06	0,260	0,001	0,297	0,411	0,281
Proteína	3,07 $\pm$ 0,05	3,09 $\pm$ 0,05	3,09 $\pm$ 0,04	3,10 $\pm$ 0,04	0,969	<0,001	0,506	0,416	0,738
Lactose	4,61 $\pm$ 0,04	4,63 $\pm$ 0,04	4,63 $\pm$ 0,03	4,66 $\pm$ 0,04	0,936	<0,001	0,474	0,538	0,598

¹Grupo 0: Animais não receberam dieta contendo GSI no pré-parto; ²Grupo 30: Início do fornecimento de dieta com GSI nos 30 dias finais da gestação; ³Grupo 60: Início do fornecimento de dieta com GSI nos 60 dias finais da gestação; ⁴Grupo 90 Início do fornecimento de dieta com GSI nos 90 dias finais da gestação. ²Efeito de dieta; Efeito de Semana; Interação entre dieta x semana (INT); Efeito Linear (L); Efeito quadrático (Q).

Na literatura é retratado o aumento do teor de gordura com a suplementação de grão de soja cru e integral em vaca em lactação. Onde, Barletta et al. (2012) suplementaram vacas leiteiras no terço inicial de lactação, com média de 31,0 kg de leite/dia com concentrações crescentes de GSI 0, 8, 16 e 24% na MS total da dieta e observaram maior teor de gordura para o nível de 16% de inclusão (2,96; 3,00; 3,30 e 3,06 %, respectivamente). De maneira semelhante Venturelli et al. (2015) suplementaram vacas no final de lactação com média de produção de 23,0 kg/dia com concentrações crescentes de GSI 0, 9, 18 e 27% na MS total da dieta e observaram efeito linear crescente com a inclusão (3,59, 3,95, 4,07 e 4,20 %, respectivamente).

Os valores percentuais apresentados pelos animais neste estudo nos grupos 0, 30, 60 e 90 (4,14; 4,09; 4,11; 4,20, respectivamente) quando comparado a outros estudos, mostra que não ocorreu síndrome da queda da gordura do leite. Este fato pode estar relacionado com a proteção que a matriz proteica exerce sobre a porção lipídica do grão

de soja, liberando lentamente a gordura no rúmen, minimizando os efeitos negativos da biohidrogenização incompleta sobre o teor de gordura do leite (CHILLIARD et al., 2009). Depressão da gordura do leite é relatado na literatura em vacas alimentadas com sais de cálcio contendo $\omega 6$ (GRECO et al., 2015), linhaça (MUSTAFA; SEGUIN, 2003; DIRANDEH et al., 2013), e linhaça extrudada (CHILLIARD et al., 2009), quando alimentados no pós-parto e comparados a animais com dieta sem adição dos mesmos. Diferentemente do presente estudo, onde no pós-parto todos os animais receberam a mesma dieta.

Segundo Staples et al. (2001), a resposta produtiva da utilização de fontes de lipídeos na dieta de vacas em lactação pode resultar em acréscimos na produção de leite de 2,0 a 2,5 kg/vaca/dia, quando estas são suficientemente adaptadas as dietas contendo lipídeos. Porém no presente estudo, o maior tempo de alimentação dos animais no pré-parto não influenciou em nenhum parâmetro de produção e composição do leite dos diferentes grupos experimentais (Figuras 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21).

Figura 14 - Produção de leite, no pós-parto de acordo com os grupos experimentais

Figura 15 - Produção de leite corrigida, no pós-parto de acordo com os grupos experimentais

Figura 16 - Teor de gordura, no pós-parto de acordo com os grupos experimentais

Figura 17 - Produção de gordura, no pós-parto de acordo com os grupos experimentais

Figura 18 - Teor de proteína, no pós-parto de acordo com os grupos experimentais

Figura 19 - Produção de proteína, no pós-parto de acordo com os grupos experimentais

Figura 20 - Produção de lactose, no pós-parto de acordo com os grupos experimentais

Figura 21 - Produção de lactose, no pós-parto de acordo com os grupos experimentais

Resultados semelhantes foram relatados para vacas suplementadas com semente de linhaça inteira, soja micronizada, ou sais de cálcio de óleo de palma nas últimas 6

semanas de gestação e início de lactação (PETIT; BENCHAAAR, 2007). No entanto, Hayirli et al. (2011) relataram que as respostas de lactação para animais no pré-parto com diferentes fontes de ácidos graxos, com o mesmo tempo de suplementação foram variáveis, com a maior produção de leite para vacas alimentadas com linola, uma fonte de AG n-6, em comparação com aqueles alimentados com sementes de canola ou linhaça em 8% da dieta. Sugerindo que as vezes não é o tempo de suplementação, mas sim a tipo de gordura que pode influenciar na lactação.

Porém, Baldiei et al. (2014) semelhante ao presente estudo, estudaram o tempo de suplementação dos animais no pré-parto e a consequente influencia na lactação subsequente, porém utilizaram Ca-AGIs contendo $\omega 3$ e não verificaram nenhuma alteração nos resultados de produção e composição do leite, apenas tendência ($P=0,07$) para teor de gordura do leite (%), com os menores valores nos animais que receberam a dieta contendo Ca-AGIs durante todo o período seco (-60 dias até o parto).

Hayirli et al. (2011) relataram que vacas no pré-parto que tiveram restrição de lipídeo na dieta apresentaram menor percentual de gordura do leite ($P < 0,05$) na lactação posterior comparadas com aquelas alimentadas por ingestão *ad libitum* de lipídeos. Sugerindo que a restrição no pré-parto de gordura pode influenciar na porcentagem de gordura na lactação subsequente.

Segundo, Grummer (1995) vacas que são suplementadas no pré-parto com fontes de lipídios podem ser mais adaptadas a não sofrerem esteatose hepática (acúmulo de triglicérides no fígado) e assim conseguirem metabolizar ácidos graxos (oxidar e/ou sintetizar VLDL) com mais eficiência do que aquelas que não receberam suplementação prévia de lipídios. Fato que não ocorreu no presente estudo, onde animais que tiveram um maior tempo de suplementação no pré-parto apresentaram valores semelhante da porcentagem de gordura no leite durante o início de lactação.

Ao analisar o teor de gordura ao longo do período de lactação, observou-se redução no teor de gordura no leite conforme aumentou o DEL para todos os grupos até a 12^a semana de lactação (Figura 16). O teor de gordura do leite tende a ser mais elevado nas primeiras semanas de lactação diminuindo e ficando estável durante o terço médio da lactação e aumentado novamente no terço final da lactação (CHILLIARD et al., 2007).

Para teor e produção de proteína nos diferentes tratamentos, foi observado valores mínimos de 3,05% e 0,87 kg/dia, respectivamente. Valores estes próximos aos encontrado por outros estudos onde não observaram diminuição de síntese no teor e

produção de proteína utilizando vacas no período de transição e início de lactação (GANDRA, 2012; BALDIEI et al., 2014), assim como estudos de vacas apenas no terço inicial de lactação (BARLETA, 2011; FREITAS Jr., 2012) e final de lactação (VENTURELLI et al., 2015). Estes resultados contrariam os achados de Onetti e Grummer (2004) que propôs que o uso de suplementos contendo fontes de lipídeos pode diminuir os teores de proteína, devido a substituição de carboidratos disponíveis no rúmen por lipídeo, onde a gordura teria efeito tóxico sobre os microorganismos do rúmen, causando redução no crescimento microbiano e efeito sobre o transporte de aminoácidos na glândula mamária. Assim, o conteúdo de proteína do leite poderia diminuir por causa da deficiência de um ou mais aminoácidos.

Apesar dos valores mínimos de teor de proteína e produção de proteína (3,05% e 0,87 kg/dia) mostrarem que o a suplementação com grão de soja não causa queda dos mesmos no leite, foi observado uma forte redução em todos os grupos experimentais até a 3ª semana de lactação e após a 4ª semana foi observada uma equivalência nos teores de proteína até a 12ª semana para todos grupos experimentais (Figura 18).

Analisando o teor de lactose e produção de lactose nos diferentes tratamentos, parecido ao que foram observados com os parâmetros de proteína, os valores mínimos observados (4,65% e 1,30 kg/dia, respectivamente) são próximos ou até maiores aos encontrados por outros estudos onde não teve diminuição na síntese dos mesmos. (BARLETA, 2011; FREITAS Jr., 2012; BALDIERI et al., 2014; VENTURELLI et al., 2015; GANDRA et al., 2016 no prelo¹¹). Assim como nos parâmetros de proteína, os parâmetros de lactose também podem estar sendo afetados por uma melhor adaptação da flora ruminal ao tempo de suplementação de lipídeos. Estudos mostram que a suplementação de animais com dietas contendo lipídios pode levar a uma diminuição da fermentação microbiana, como consequência diminuição da produção de ácido acético (PALMQUIST; CONRAD, 1978; STERN et al., 1985; SHAUFF et al., 1992; HAVERTINE; ALLEN, 2006b), ácido propiônico (BARLETTA, 2010) e ácido butírico (NAVES, 2010) ruminal. Provavelmente no presente estudo essas alterações de fermentação não ocorreram, pois, não houve diminuição no teor e produção de lactose,

¹¹ GANDRA, J.R.; BARLETTA, R.V.; MINGOTI, R.D.; VERDURICO, L.C.; FREITAS JUNIOR, J.E.; OLIVEIRA, L.J.; TAKIYA, C.S.; KFOURY JUNIOR, J.R.; WILTBANK, M.C.; RENNO, F.P. Effects of whole flaxseed, raw soybeans, and calcium salts of fatty acids on measures of cellular immune function of transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 2016. No prelo.

assim como o tempo de alimentação com GSI no pré-parto não influenciou nenhuma alteração nesses parâmetros.

Ao analisar o teor de lactose no decorrer do DEL, assim como ocorrido com os teores de proteína, ocorreu redução em todos os grupos experimentais até a 3ª semana de lactação e após a 4ª semana foi observada uma equivalência nos teores de lactose até a 12ª semana para todos grupos experimentais (Figura 20). Porém, a produção total (Kg/dia), tanto de lactose como a proteína do leite, aumentou com o aumento dos dias em lactação. (Figuras 19 e 21).

A diminuição no teor de proteína e lactose do leite ocorreu pelo simples efeito de diluição devido ao aumento da produção de leite (GARNSWORTHY, 2002). Podemos observar este fato melhor ao analisar a produção leiteira (Figura 14)

6.6. PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE

Observou-se efeito ($P < 0,05$) de semana para todas os parâmetros mensurados, a exceção dos ácidos graxos: C4:0; C17:0; C18:1 ω 9; C18:2 ω 9 ω 11; C20:0; C20:4 ω 5, ω 8, ω 11, ω 14; C22:0; relação de C:18 Insat/C18:0 Sat. Ainda, observou-se efeito ($P < 0,05$) de dieta para C16:1 ω 7, CLA ω 9 ω 11, total de C18:0 insaturado, total de AGs saturados e total de outros AGs não específicos (Tabela 11).

Tabela 11 - Média ($\pm$ EPM) do perfil de ácidos graxos do leite de acordo com os grupos experimentais

Item	Dietas experimentais ¹				Probabilidades ²				
	0	30	60	90	Dieta	Semana	INT	L	Q
	g/100g total AG								
C4:0	1,03 $\pm$ 0,04	1,09 $\pm$ 0,04	1,09 $\pm$ 0,03	1,05 $\pm$ 0,03	0,507	0,476	0,617	0,693	0,155
C6:0	1,24 $\pm$ 0,05	1,30 $\pm$ 0,06	1,36 $\pm$ 0,04	1,36 $\pm$ 0,04	0,349	<0,001	0,743	0,088	0,615
C8:0	0,87 $\pm$ 0,05	0,89 $\pm$ 0,05	0,93 $\pm$ 0,04	0,96 $\pm$ 0,05	0,551	<0,001	0,436	0,156	0,979
C10:0	2,10 $\pm$ 0,11	2,11 $\pm$ 0,12	2,22 $\pm$ 0,09	2,26 $\pm$ 0,10	0,603	<0,001	0,662	0,197	0,881
C11:0	0,06 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,01	0,824	<0,001	0,589	0,871	0,948
C12:0	2,44 $\pm$ 0,18	2,47 $\pm$ 0,20	2,62 $\pm$ 0,15	2,67 $\pm$ 0,17	0,769	<0,001	0,300	0,311	0,957
C13:0	0,16 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,01	0,884	<0,001	0,531	0,774	0,653
C14:0	8,58 $\pm$ 0,46	8,83 $\pm$ 0,50	9,49 $\pm$ 0,39	9,41 $\pm$ 0,43	0,405	<0,001	0,522	0,130	0,716
C14:1	0,61 $\pm$ 0,05	0,63 $\pm$ 0,06	0,54 $\pm$ 0,04	0,65 $\pm$ 0,05	0,378	<0,001	0,173	0,887	0,378
C15:0	0,88 $\pm$ 0,06	0,88 $\pm$ 0,06	0,99 $\pm$ 0,05	0,88 $\pm$ 0,05	0,319	<0,001	0,608	0,658	0,300
C16:0	29,64 $\pm$ 1,12	29,03 $\pm$ 1,20	30,08 $\pm$ 0,94	31,50 $\pm$ 1,05	0,278	<0,001	0,480	0,057	0,640
C16:1, c	1,36 $\pm$ 0,10	1,19 $\pm$ 0,11	0,97 $\pm$ 0,08	1,14 $\pm$ 0,09	0,043	<0,001	0,124	0,048	0,088
C17:0	0,55 $\pm$ 0,01	0,56 $\pm$ 0,01	0,56 $\pm$ 0,01	0,54 $\pm$ 0,01	0,465	0,537	0,332	0,574	0,139
C17:1	0,20 $\pm$ 0,03	0,19 $\pm$ 0,03	0,12 $\pm$ 0,03	0,12 $\pm$ 0,03	0,131	0,005	0,208	0,062	0,842
C18:0	13,93 $\pm$ 0,75	14,05 $\pm$ 0,81	14,76 $\pm$ 0,62	14,33 $\pm$ 0,70	0,833	<0,001	0,079	0,565	0,708
C18:1r 9	0,21 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,01	0,284	0,713	0,335	0,254	0,152
C18:1r11	0,63 $\pm$ 0,05	0,68 $\pm$ 0,05	0,57 $\pm$ 0,04	0,53 $\pm$ 0,04	0,168	<0,001	0,578	0,069	0,350
C18:1c9	28,25 $\pm$ 1,20	26,74 $\pm$ 1,28	24,81 $\pm$ 0,99	24,71 $\pm$ 1,11	0,112	<0,001	0,458	0,022	0,547
C18:2c9,c12	3,13 $\pm$ 0,14	3,44 $\pm$ 0,15	3,14 $\pm$ 0,12	2,87 $\pm$ 0,13	0,091	0,034	0,660	0,091	0,047
C18:3c9,c12,c15	0,26 $\pm$ 0,02	0,29 $\pm$ 0,02	0,27 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,01	0,227	0,019	0,445	0,312	0,079
CLAc9,t11	0,29 $\pm$ 0,02	0,34 $\pm$ 0,02	0,27 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,02	0,001	0,470	0,640	0,002	0,012
C20:0	0,13 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,01	0,566	0,912	0,104	0,468	0,818
C20:1c11	0,03 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01	0,050	<0,001	0,523	0,104	0,640
C20:3c8,c11,c14	0,08 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,01	0,479	<0,001	0,515	0,337	0,244
C20:4c5,c8,c11,c14	0,14 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,01	0,130	0,896	0,977	0,239	0,087
C22:0	0,02 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,01	0,430	0,781	0,422	0,609	0,604
Total									
<C16	28,64 $\pm$ 1,12	29,04 $\pm$ 1,21	30,08 $\pm$ 0,94	31,50 $\pm$ 1,05	0,270	<0,001	0,480	0,057	0,640
C16	30,05 $\pm$ 1,18	30,23 $\pm$ 1,27	31,27 $\pm$ 0,98	32,64 $\pm$ 1,10	0,374	<0,001	0,316	0,095	0,604
>C16	47,92 $\pm$ 1,72	47,02 $\pm$ 1,84	45,28 $\pm$ 1,42	44,25 $\pm$ 1,60	0,405	<0,001	0,505	0,095	0,968
C18									
Insaturado	32,79 $\pm$ 1,28	31,77 $\pm$ 1,37	29,40 $\pm$ 1,07	28,83 $\pm$ 1,19	0,009	<0,001	0,454	0,015	0,845
Saturado	13,93 $\pm$ 0,75	14,05 $\pm$ 0,81	14,76 $\pm$ 0,62	14,32 $\pm$ 0,70	0,833	<0,001	0,079	0,565	0,708
Insat/Sat	2,30 $\pm$ 0,11	2,30 $\pm$ 0,12	2,05 $\pm$ 0,09	2,04 $\pm$ 0,10	0,155	0,822	0,201	0,095	0,978
Total									
Outros	4,06 $\pm$ 0,14	4,28 $\pm$ 0,15	3,95 $\pm$ 0,12	3,68 $\pm$ 0,13	0,044	0,151	0,534	0,025	0,084
Sat	60,65 $\pm$ 1,41	61,66 $\pm$ 1,50	64,79 $\pm$ 1,17	65,33 $\pm$ 1,30	0,050	<0,001	0,382	0,008	0,865
Mono	31,41 $\pm$ 1,28	29,71 $\pm$ 1,37	27,28 $\pm$ 1,06	27,38 $\pm$ 1,18	0,066	<0,001	0,391	0,013	0,469
Poli	3,91 $\pm$ 0,19	4,35 $\pm$ 0,20	3,97 $\pm$ 0,16	3,60 $\pm$ 0,18	0,070	0,017	0,636	0,117	0,034
Insat	35,28 $\pm$ 1,32	34,06 $\pm$ 1,41	31,25 $\pm$ 1,09	30,98 $\pm$ 1,22	0,056	<0,001	0,420	0,009	0,711
Sat/Insat	1,79 $\pm$ 0,12	1,86 $\pm$ 0,13	2,12 $\pm$ 0,10	2,16 $\pm$ 0,11	0,080	<0,001	0,654	0,014	0,912

¹Grupo 0: Animais não receberam dieta contendo GSI no pré-parto; ²Grupo 30: Início do fornecimento de dieta com GSI nos 30 dias finais da gestação; ³Grupo 60: Início do fornecimento de dieta com GSI nos 60 dias finais da gestação; ⁴Grupo 90 Início do fornecimento de dieta com GSI nos 90 dias finais da gestação. ²Efeito de dieta; Efeito de Semana; Interação entre dieta x semana (INT); Efeito Linear (L); Efeito quadrático (Q).

Observou-se efeito ($P<0,05$) linear decrescente para as concentrações de AGs C16:1c, C18:1c9, Total de C18:0 insaturado, total de AGs saturados, monoinsaturados, insaturados, relação do total de AGs sat./insat. e total de outros AGs não específicos.

Ainda, observou-se efeito ($P<0,05$) quadrático para as concentrações de AGs C18:2 c 9, c 12; C18:2 c 9 t 11; e total de AGPIs (Tabela 11).

No presente estudo, os animais após o parto receberam a mesma dieta (com 12% de inclusão de GSI) porém, observaram-se diferenças entre os grupos experimentais no perfil de AGs que compõem o leite, principalmente nos insaturados com 18 carbonos e nas suas relações, mostrando que a alimentação prolongada com dietas contendo GSI no pré-parto, pode influenciar no perfil de AGs do leite no início da lactação.

Ao analisar os grupos de animais que receberam dietas contendo GSI por mais tempo no pré-parto (grupos 90 e 60, principalmente) eles apresentaram valores inferiores ($P<0,05$) em média nas concentrações de C18:1 c 9, C18:2 c 9, c 12, CLA c 9, t 11, total de AGs monoinsaturados, insaturados e polinsaturados em relação aos outros que não recebeu GSI ou que recebeu por menos tempo no pré-parto (grupo 0 e 30, respectivamente) (Figuras 22, 23, 24, 25, 26 e 27).

Figura 22 - Concentração de C18:1 cis -9 no período pós-parto de acordo com os grupos experimentais

Figura 23 - Concentração de C18:2 *cis*-9, *cis*-12 no período pós-parto de acordo com os grupos experimentais

Figura 24 - Concentração de CLA *cis*-9, *trans*-11 no período pós-parto de acordo com os grupos experimentais

Figura 25 - Concentração do total de ácidos graxos monoinsaturados no período pós-parto de acordo com os grupos experimentais

Figura 26 - Concentração do total de ácidos graxos polinsaturados no período pós-parto de acordo com os grupos experimentais

Figura 27 - Concentração do total de ácidos graxos insaturados no período pós-parto de acordo com os grupos experimentais

Esta diferença entre esses grupos provavelmente está relacionada a eficiência do processo de biohidrogenação (Figura 2), onde os grupos de animais que foram suplementados por mais tempo no pré-parto (grupos 60 e 90) apresentaram maior eficiência na biohidrogenação que aqueles suplementado por menos tempo (Grupo 30) ou por aquele que não foi suplementado (Grupo 0). Segundo Palmquist & Mattos (2006), a adaptação da microbiota ruminal aos efeitos indesejáveis que os lipídeos insaturados possam trazer a fermentação podem estar relacionados ao tempo de suplementação. Provavelmente o que esteja ocorrendo no presente estudo. Assim, o maior tempo de suplementação ajude a microbiota ruminal a ser mais eficiente no processo de biohidrogenação.

O produto final da biohidrogenação dos AGIs com 18 carbonos é o AG esteárico (C18:0), ao analisar os resultados de sua concentração, pode-se observar que houve tendência ($P=0,079$) para efeito linear crescente, onde os grupos 60 e 90 apresentaram as maiores concentrações em relação aos demais, reforçando ainda mais as evidências de uma melhor eficiência na biohidrogenação da microbiota ruminal nos grupos que foram suplementados por mais tempo com GSI no pré-parto.

Ao analisar o teor de gordura (Tabela 10; Figura 16), não foi observado queda da gordura do leite, porém ao analisar o perfil de ácidos graxos (Tabela 11) dos AGs advindos da síntese *De novo* da glândula mamaria (menor que C16:0 e aproximadamente 50% dos C16:0) podemos observar tendência para efeito linear crescente para o total de ácidos graxos menores que C16:0 ($P=0,057$) e para o total de C16:0 ($P=0,095$), onde os grupos que foram suplementados por mais tempo no pré-

parto com GSI (grupo 60 e 90) apresentaram maiores concentrações em relação aos demais. Sugerindo que apesar de não ter existido queda no teor de gordura do leite, as maiores ($P < 0,05$) concentrações de intermediários da biohidrogenação (C18:1c9 e CLAc9,t11, por exemplo) nos grupos 0 e 30 podem estar diminuindo a eficiência da síntese *De novo* e consequentemente diminuindo a concentração de ácidos graxos de cadeia curta. Fato semelhante observado por Bauman e Griinari (2003) em estudo com adição de ácido linoleico na dieta de vacas observaram que intermediários da biohidrogenização (alguns tipos de CLAs, principalmente o *trans*10, *cis*12) poderiam agir como reguladores no processo de lipogênese da glândula mamária, bloqueando a síntese *De Novo* diminuindo assim a formação de AGs de cadeia curta e média no leite.

Ainda, fica mais evidente a possibilidade de ter ocorrido diminuição da eficiência da síntese *De novo* nos grupos 0 e 30 ao analisar o total de ácidos graxos saturados (Tabela 11), onde houve efeito ($P < 0,05$) linear crescente, demonstrando que os grupos 60 e 90 apresentaram as maiores concentrações (64,79 e 65,33%, respectivamente) em relação aos grupos 0 e 30 (60,65 e 61,66%, respectivamente), sugerindo que o menor tempo de suplementação com GSI e a não suplementação no pré-parto diminui a formação do total de ácidos graxos saturados, onde até 70% podem ser derivados na síntese *De novo* (BAUMAN; GRIINARI, 2003; PETERSON et al., 2003). Segundo o NRC (2001), a biohidrogenação dos AGPIs na forma de óleo varia de 60 a 90%, enquanto que na forma de Ca-AGs e sementes de oleaginosas é em torno de 30-40%. No presente estudo, apesar dos AGPIs presentes no GSI sofrerem menos ação da biohidrogenação pela microbiota ruminal (30-40%), esta foi suficiente para alterar o perfil de ácido graxo nos grupos estudados em decorrente do tempo de alimentação.

Gandra et al. (2016 no prelo¹²) ao fornecer dieta contendo GSI do pré-parto até a fase inicial de lactação (-30 a 90 dias pós-parto), assim como o presente estudo não observou síndrome da queda da gordura do leite. Ainda, apresentou maiores concentrações de C18:0 insaturados (36,23%) e menores de <C16:0 (13,72%). Porém, Greco (2014) ao fornecer dieta contendo Ca- ω 6 observaram queda da gordura do leite e

¹² GANDRA, J.R.; BARLETTA, R.V.; MINGOTI, R.D.; VERDURICO, L.C.; FREITAS JUNIOR, J.E.; OLIVEIRA, L.J.; TAKIYA, C.S.; KFOURY JUNIOR, J.R.; WILTBANK, M.C.; RENNO, F.P. Effects of whole flaxseed, raw soybeans, and calcium salts of fatty acids on measures of cellular immune function of transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 2016. No prelo.

aumento nas concentrações dos ácidos graxos intermediários da biohidrogenação (CLAs), sugerindo a ação deles na possível diminuição da produção de gordura.

6.7 PESO E ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL

Observou-se efeito ($P < 0,05$) de semana para o peso corporal (PC), escore de condição corporal (ECC) e movimentação de peso corporal (MPC) tanto no pré como no pós-parto. Ainda, para as demais variáveis mensuradas não houve efeito ($P > 0,05$) de dieta, interação, linear ou quadrático (Tabela 12).

Os resultados obtidos para o pré e pós-parto estão de acordo com o CMS (Tabela 6, Figura 3), BE (Tabela 8, Figura 10) e as concentrações de ácidos graxos não esterificados (AGNE) (Tabela 13 e Figura 33).

Tabela 12 - Média ($\pm$ EPM) do peso corporal (PC), escore de condição corporal (ECC) e mudança de peso corporal (MPC) no período pré e pós-parto de acordo os grupos experimentais

Item	Dietas experimentais ¹				Probabilidades ²				
	0	30	60	90	Dieta	Semana	INT	L	Q
Peso corporal (kg)									
PréP	738,3 $\pm$ 45,9	698,2 $\pm$ 45,9	694,0 $\pm$ 35,6	676,5 $\pm$ 39,8	0,783	<0,001	0,555	0,330	0,791
PósP	626,4 $\pm$ 38,7	583,5 $\pm$ 38,7	619,2 $\pm$ 30,0	589,1 $\pm$ 33,5	0,785	<0,001	0,591	0,639	0,785
Escore de condição corporal									
PréP	3,6 $\pm$ 0,15	3,5 $\pm$ 0,15	3,5 $\pm$ 0,12	3,6 $\pm$ 0,13	0,822	0,012	0,800	0,784	0,531
PósP	3,4 $\pm$ 0,15	3,2 $\pm$ 0,15	3,4 $\pm$ 0,11	3,3 $\pm$ 0,12	0,752	0,004	0,672	0,933	0,549
Mudança de peso corporal (kg)									
PréP	5,0 $\pm$ 0,99	6,7 $\pm$ 1,07	5,3 $\pm$ 0,76	5,2 $\pm$ 0,85	0,663	0,129	0,234	0,819	0,362
PósP	-9,8 $\pm$ 1,74	-8,2 $\pm$ 1,75	-5,9 $\pm$ 1,34	-6,9 $\pm$ 1,51	0,343	<0,001	0,776	0,148	0,402

¹Grupo 0: Animais não receberam dieta contendo GSI no pré-parto; ²Grupo 30: Início do fornecimento de dieta com GSI nos 30 dias finais da gestação; ³Grupo 60: Início do fornecimento de dieta com GSI nos 60 dias finais da gestação; ⁴Grupo 90 Início do fornecimento de dieta com GSI nos 90 dias finais da gestação. ²Efeito de dieta; Efeito de Semana; Interação entre dieta x semana (INT); Efeito Linear (L); Efeito quadrático (Q).

Mudanças no PC e ECC estão intimamente ligadas com as concentrações de AGNE, que por sua vez é um indicador preciso de mobilização de tecido adiposo, que juntos com o CMS no pré-parto contribuem para a intensidade do BE negativo ou positivo. Em diversos estudos (PETI et al., 2007; MOALLEM et al., 2007; ZACHUT et

al., 2010; HAYIRLI et al., 2011; GRECO, 2014; GANDRA et al., 2016 no prelo¹³), que avaliaram a suplementação de fontes de ácidos graxos ($\omega 6$ e/ou $\omega 3$) em vacas no período de transição e início de lactação também não observaram diferenças no PC, ECC e MPC entre os tratamentos.

Badiei et al. (2014) semelhante ao presente estudo, estudou o efeito suplementação prolongada de dietas contendo ácido graxos no pré-parto, porém utilizou Ca-AGIs contendo $\omega 3$, e não observou alterações no PC, ECC e MPC entre os grupos experimentais. Esses estudos supracitados sugerem assim como o presente estudo que a suplementação prolongada de ácido graxo no pré-parto não altera o PC, ECC e MPC.

Avaliando o PC (Figura 28) e MPC (Figura 29) ao longo de todo o período experimental, foi observado um discreto ganho de peso entre as semanas -9 a -2 em relação ao parto em todos os grupos experimentais. Na semana anterior ao parto foi observada também discreta perda de peso, que está relacionada com aumento nas concentrações de AGNE (Tabela 12 e Figura 33) e consequente mobilização de reservas corporais (OVERTON; WALDRON, 2004; GANDRA, 2012; BADIEI et al., 2014; GRECO, 2014). No momento do parto (+24 horas) foi observada uma abrupta perda de peso em média de (68 kg/animal), proveniente do peso do bezerro e dos anexos fetais (RENNÓ et al., 2006).

¹³ GANDRA, J.R.; BARLETTA, R.V.; MINGOTI, R.D.; VERDURICO, L.C.; FREITAS JUNIOR, J.E.; OLIVEIRA, L.J.; TAKIYA, C.S.; KFOURY JUNIOR, J.R.; WILTBANK, M.C.; RENNO, F.P. Effects of whole flaxseed, raw soybeans, and calcium salts of fatty acids on measures of cellular immune function of transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 2016. No prelo.

Figura 28 - Peso corpóreo nos períodos pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais

Figura 29 - Mudança de peso corpóreo nos períodos pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais

Da semana posterior ao parto até a 5 semana experimental foi observado redução de PC para todos os grupos experimentais, e um aumento suave no PC a partir da 6ª semana (Figura 28). Este comportamento está de acordo com os resultados obtidos por Rennó et al. (2006), quando avaliaram vacas multíparas, de alta produção com $ECC \geq 3,25$.

Em relação à MPC ao longo do período de lactação, foi observado igualdade na movimentação corpórea para todos os grupos avaliados, e não foi observado efeito a BE (Tabela 8), PL (Tabela 10), CMS (Tabela 6) e concentração de AGNE (Tabela 13), pode-se inferir que a MPC foi um parâmetro confiável para predição de mobilização de tecido adiposo em vacas no período de transição.

Todos os grupos experimentais apresentaram movimentação positiva na 5ª semana de lactação, intensificando ainda mais que a suplementação prolongada de GSI no pré-parto não interferiu no MPC dos diferentes grupos experimentais (Figura 29). Vale ressaltar ainda que a variação máxima de ECC ao longo do período experimental não ultrapassou 1 unidade de ECC, valor recomendado por Overton e Waldron, (2004) para diminuição de riscos de desordens metabólicas, perdas produtivas e atrasos reprodutivos ao longo do período de lactação, o que mostra que suplementação prolongada de GSI no pré-parto não interferiu nas condições nutricionais adequadas para vacas leiteiras no período de transição.

6.8 PARÂMETROS SANGUÍNEOS

Observou-se efeito ($P < 0,05$) de tempo para todos os parâmetros com exceção de HDL, AGNE, GGT no pré-parto, ureia no pós-parto, glicose e GGT em ambos. Ainda, observou-se efeito ($P < 0,05$) de dieta para colesterol total e HDL no pré-parto e para GGT no pré e pós-parto. (Tabela 13)

Houve efeito linear crescente ($P < 0,05$) para colesterol total, LDL no pré-parto e linear decrescente ($P < 0,05$) para GGT pré e pós-parto. Ainda, efeito quadrático ($P < 0,05$) foi encontrado para HDL no pré-parto e AST no pós-parto (Tabela 13).

Tabela 13 - Média ($\pm$ EPM) dos metabólitos plasmáticos pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais

Item	Dietas Experimentais ¹				Probabilidade ²				
	0	30	60	90	Diet	Time	INT	L	Q
<i>mg/dL</i>									
Glicose									
PréP	57,0 $\pm$ 4,7	55,4 $\pm$ 5,1	59,9 $\pm$ 3,9	50,0 $\pm$ 4,4	0,427	0,480	0,062	0,427	0,371
PósP	53,6 $\pm$ 4,6	53,4 $\pm$ 4,9	57,1 $\pm$ 3,8	52,2 $\pm$ 4,3	0,844	0,124	0,135	0,970	0,607
Triglicerídeos									
PréP	41,4 $\pm$ 5,3	38,5 $\pm$ 5,7	41,1 $\pm$ 4,4	39,6 $\pm$ 4,9	0,652	<,001	0,758	0,375	0,476
PósP	22,1 $\pm$ 2,4	21,4 $\pm$ 2,6	23,8 $\pm$ 2,0	23,7 $\pm$ 2,2	0,854	0,003	0,323	0,496	0,900
Colesterol Total									
PréP	72,8 ^a $\pm$ 6,8	92,4 ^b $\pm$ 7,3	87,9 ^b $\pm$ 5,6	101,9 ^b $\pm$ 6,4	0,033	0,023	0,565	0,009	0,671
PósP	87,3 $\pm$ 8,5	99,4 $\pm$ 9,2	100,7 $\pm$ 7,1	104,9 $\pm$ 8,0	0,496	<,001	0,826	0,156	0,643
HDL ³									
PréP	38,4 ^a $\pm$ 3,3	53,4 ^b $\pm$ 3,5	51,8 ^b $\pm$ 2,7	53,2 ^b $\pm$ 3,0	0,008	0,062	0,154	0,006	0,042
PósP	49,2 $\pm$ 4,8	59,5 $\pm$ 5,1	57,1 $\pm$ 4,0	56,2 $\pm$ 4,5	0,482	<,001	0,941	0,353	0,249
LDL ⁴									
PréP	22,3 ^a $\pm$ 5,7	28,8 ^{ab} $\pm$ 6,1	27,9 ^{ab} $\pm$ 4,7	39,9 ^b $\pm$ 5,3	0,167	<,001	0,874	0,046	0,622
PósP	32,2 $\pm$ 5,4	38,4 $\pm$ 5,8	37,7 $\pm$ 4,5	39,8 $\pm$ 5,0	0,763	<,001	0,513	0,355	0,705
VLDL ⁵									
PréP	9,4 $\pm$ 0,8	7,7 $\pm$ 0,9	8,2 $\pm$ 0,7	7,9 $\pm$ 0,8	0,530	0,002	0,522	0,309	0,401
PósP	4,4 $\pm$ 0,4	4,3 $\pm$ 0,5	4,7 $\pm$ 0,4	4,7 $\pm$ 0,4	0,854	0,003	0,323	0,496	0,900
Proteína Total									
PréP	7,8 $\pm$ 0,2	7,8 $\pm$ 0,2	8,2 $\pm$ 0,2	8,2 $\pm$ 0,2	0,520	<,001	0,719	0,174	0,948
PósP	7,5 $\pm$ 0,3	7,5 $\pm$ 0,3	8,2 $\pm$ 0,3	8,1 $\pm$ 0,3	0,236	<,001	0,828	0,107	0,932
Urea									
PréP	40,3 $\pm$ 3,8	43,5 $\pm$ 4,2	35,1 $\pm$ 3,2	40,3 $\pm$ 3,6	0,428	0,013	0,330	0,624	0,795
PósP	44,0 $\pm$ 3,4	43,0 $\pm$ 3,7	37,8 $\pm$ 2,8	40,3 $\pm$ 3,2	0,514	0,714	0,599	0,278	0,608
<i>mmol/L</i>									
AGNE ⁶									
PréP	0,33 $\pm$ 0,01	0,28 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,01	0,29 $\pm$ 0,01	0,176	0,073	0,127	0,201	0,081
PósP	0,51 $\pm$ 0,04	0,43 $\pm$ 0,04	0,40 $\pm$ 0,03	0,42 $\pm$ 0,03	0,260	<,001	0,057	0,120	0,199
BHBA ⁷									
PréP	0,62 $\pm$ 0,04	0,62 $\pm$ 0,04	0,62 $\pm$ 0,03	0,69 $\pm$ 0,04	0,490	0,028	0,139	0,307	0,303
PósP	0,71 $\pm$ 0,04	0,62 $\pm$ 0,04	0,66 $\pm$ 0,03	0,63 $\pm$ 0,04	0,484	0,039	0,300	0,329	0,483
<i>UI/L</i>									
AST ⁸									
PréP	72,7 ^a $\pm$ 6,0	54,2 ^b $\pm$ 6,5	58,9 ^b $\pm$ 5,0	61,4 ^{ab} $\pm$ 5,6	0,058	0,030	0,640	0,376	0,033
PósP	90,3 ^a $\pm$ 7,6	76,3 ^b $\pm$ 8,2	74,4 ^b $\pm$ 6,3	73,1 ^{ab} $\pm$ 7,0	0,063	0,001	0,650	0,990	0,038
GGT ⁹									
PréP	33,2 ^a $\pm$ 3,3	30,5 ^a $\pm$ 3,6	23,6 ^b $\pm$ 2,8	25,0 ^b $\pm$ 3,1	0,033	0,249	0,739	0,018	0,894
PósP	35,2 ^a $\pm$ 2,9	32,9 ^a $\pm$ 3,1	27,6 ^b $\pm$ 2,4	27,1 ^b $\pm$ 2,7	0,016	0,212	0,818	0,009	0,456

¹Grupo 0: Animais não receberam dieta contendo GSI no pré-parto; ²Grupo 30: Início do fornecimento de dieta com GSI nos 30 dias finais da gestação; ³Grupo 60: Início do fornecimento de dieta com GSI nos 60 dias finais da gestação; ⁴Grupo 90: Início do fornecimento de dieta com GSI nos 90 dias finais da gestação. ²Efeito de dieta; Efeito de Semana; Interação entre dieta x semana (INT); Efeito Linear (L); Efeito quadrático (Q); ³HDL: Lipoproteínas de alta densidade; ⁴LDL: Lipoproteínas de baixa densidade; ⁵VLDL: Lipoproteínas de muito baixa densidade; ⁶AGNE: Ácidos graxos não esterificados; ⁷BHBA: β -hidroxibutirato.

As maiores concentrações de colesterol total, HDL e LDL no pré-parto nos grupos que começaram a ser alimentados primeiro com GSI já era esperada, pois a concentração de colesterol tem alta correlação com a quantidade de ácido graxo da alimentação (BAUMAN; LOCK, 2006) (Figuras 30, 31, 32). O aumento dessas concentrações está diretamente correlacionado com o CEE dos diferentes grupos experimentais no pré-parto (Tabela 6 e Figura 8).

Figura 30 - Concentrações séricas de colesterol total no pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais

Figura 31 - Concentrações séricas de HDL no pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais

Figura 32 - Concentrações séricas de LDL no pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais

Naves (2010) e Barletta et al., (2012) também observaram aumento no colesterol e HDL em vacas que receberam GSI na dieta, segundo os autores esse aumento estava diretamente correlacionado ao maior consumo de ácidos graxos provenientes do GSI contido nas rações experimentais e a quantidade de inclusão do mesmo na dieta.

Os ácidos graxos da alimentação são absorvidos e transportados na circulação para os diferentes tecidos nas diferentes frações de colesterol (HDL, LDL, VLDL) e quilomicrons (CHRISTENSEN et al., 1994). Fato este demonstrado nas concentrações destes nos grupos experimentais no pós-parto do presente estudo, onde todos os grupos a partir do parto quando receberam a mesma dieta, não apresentaram diferença ($P>0,05$) no colesterol total e nas frações do colesterol (HDL, LDL e VLDL). Sugerindo que o maior tempo de alimentação com GSI no pré-parto não influenciou nas concentrações de colesterol e suas frações no pós-parto.

Baldiei et al. (2014) em estudo semelhante a este, porém suplementou os animais com uma fonte de gordura protegida contendo $\omega 3$, também não observou alteração nos parâmetros sanguíneos (colesterol, HDL, LDL, VLDL, AGNE e BHB) no pós-parto decorrente do tempo prolongado de fornecimento da gordura no pré-parto. Ainda, autores (PETIT et al. 2004; CULLENS, 2005; GRECO, 2014) não encontraram diferenças nas concentrações de AGNE e colesterol em vacas no pós-parto recente alimentadas com dietas isolipídicas independente da fonte. Sugerindo que a maior interferência nos parâmetros sanguíneos seria entre dietas com inclusão ou não de lipídeos.

Ao analisar a concentração de AGNE tanto no pré como no pós-parto não houve diferença ($P>0,05$) entre os grupos experimentais. Porém observou-se aumento gradativo para todos os grupos experimentais até o momento do parto, com aumento abrupto a partir do dia -7 ao momento do parto. A concentração média de AGNE no momento do parto foi de 0,532 e mmol/L (Figura 33).

Figura 33 - Concentrações séricas de ácidos graxos não esterificados no pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais

Porém, ao analisar a concentração de β -hidroxibutirato (BHBA) tanto no pré como no pós-parto não houve diferença entre os grupos experimentais. Porém observou-se aumento gradativo para todos os grupos experimentais até o momento do parto, com aumento abrupto a partir do dia -7 até o dia +7 em relação ao parto. A concentração média de BHBA no momento do pico foi de 0,782 mmol/L (Figura 34).

Figura 34 - Concentrações séricas de β -hidroxibutirato no pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais

Bertics et al. (1992) relatou que o CMS é inversamente proporcional à concentração de AGNE e BHBA no plasma. Os dados do presente estudo concordam com esta observação visto ao comparar com os dados de CMS (Tabela 6 e Figura 3). Ainda, concentrações de AGNE são indicativos de mobilização de gordura (ROBERTS et al., 1981). Assim, a falta de uma diferença significativa nas concentrações de AGNE e BHBA a partir do estudo corrente pode sugerir que a perda do peso corpóreo de vacas foi semelhante em todos os grupos (Figura 29). Fato este também encontrado por Mandebu et al. (2003) que compararam a suplementação de gorduras em forma de sais de cálcio onde as concentrações de AGNE e β -hidroxibutirato durante as duas primeiras semanas pós-parto não sofreram efeito das dietas (Ca-óleo de palma e Ca-óleo de soja), e os níveis também estavam dentro dos limites normais para espécie (DRACKELY et al., 1998; GARCIA-BOJALIL et al., 1998).

Em estudo realizado por Ospina et al. (2010), avaliando mais de 1300 animais no período de transição em fazendas do Nordeste dos EUA, os autores estabeleceram limiares críticos nas concentrações de AGNE e BHBA, com relação a riscos de doenças metabólicas no pós-parto (deslocamento de abomaso, cetose clínica, metrite e retenção de placenta). Os valores críticos estabelecidos foram de $\geq 0,3$ mmol/L para AGNE no pré-parto (- 14 a -2 dias em relação ao parto), de $\geq 0,6$ mmol/L para AGNE e $\geq 0,96$

mmol/L para BHBA no pós-parto (+ 3 a +14 dias em relação ao parto). Tendo em vista as concentrações e o comportamento de AGNE e BHBA observados no pré e pós-parto neste estudo, pode-se inferir que a alimentação prolongada com GSI em vacas leiteiras no pré-parto parece contribuir para a diminuição dos riscos de doenças metabólicas no pós-parto.

Um fato interessante neste estudo foi a diminuição das concentrações séricas de GGT e AST no pré e pós-parto grupos que foram suplementados por mais tempo com GSI (Figuras 35 e 36). O aumento combinado das concentrações de AST e GGT está associado a lesões nos hepatócitos (TENNANT, 1997).

Figura 35 - Concentrações séricas de AST no pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais

Figura 36 - Concentrações séricas de GGT no pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais

Lesões hepáticas pode ocorrer principalmente nos animais no período de transição, devido à alta mobilização corpórea de tecido adiposo para tentar suprir a alta exigência energética nesta fase. Assim, excesso de AGNE em nível hepático, pode exceder a capacidade de metabolização desses ácidos graxos (oxidação e reesterificação), resultando no armazenamento hepático de triglicerídeos (oriundos da esterificação dos AGNE), levando os animais ao desenvolvimento de esteatose hepática (acúmulo de triglicerídeos no parênquima hepático) (DRACKLEY, 1999). Assim, o acúmulo de triglicerídeos no parênquima hepático pode prejudicar as funções fisiológicas do fígado como, reduzir, por exemplo, a capacidade do fígado em detoxicar amônia em ureia (STRANG; BERTICS; GRUMMER, 1998).

Portanto, o presente estudo, animais que começaram a ser suplementados num período mais longo da expectativa de parto (90 dias; 60 dias; 30 dias, respectivamente) pressupõem apresentarem uma melhor saúde hepática, estando mais adaptados as mudanças fisiológicas do período de transição, apresentando menores lesões aos hepatócitos.

6.9 QUALIDADE OOCITÁRIA E EMBRIONÁRIA

Observou-se efeito ($P<0,05$) de aspiração para o número de embriões clivados (Tabela 14; Figuras 37). Ainda, para as demais variáveis mensuradas não houve efeito ($P>0,05$) de dieta, interação, linear ou quadrático (Tabela 14).

Tabela 14 - Médias ($\pm$ EPM) da qualidade oocitária e embrionária em função dos grupos experimentais

Item	Diets experimentais ¹				Probabilidades ²				
	0	30	60	90	Dieta	Asp.	INT	L	Q
<i>Oocitos aspirados</i>									
Recuperados (n)	9,32 $\pm$ 1,75	7,07 $\pm$ 1,88	11,3 $\pm$ 1,34	8,76 $\pm$ 1,54	0,319	0,075	0,797	0,732	0,929
Viáveis (n)	6,30 $\pm$ 1,41	4,49 $\pm$ 1,51	7,82 $\pm$ 1,08	5,64 $\pm$ 1,25	0,319	0,152	0,704	0,820	0,894
Viáveis (%)	58,5 $\pm$ 4,93	61,5 $\pm$ 5,59	62,9 $\pm$ 3,72	58,9 $\pm$ 4,48	0,867	0,624	0,622	0,903	0,465
Alta Qual. (n)	1,52 $\pm$ 0,45	1,78 $\pm$ 0,50	2,52 $\pm$ 0,34	1,53 $\pm$ 0,41	0,178	0,352	0,947	0,686	0,144
Alta Qual. (%)	15,6 $\pm$ 3,06	24,3 $\pm$ 3,54	20,1 $\pm$ 2,29	15,5 $\pm$ 2,80	0,172	0,594	0,845	0,729	0,057
<i>Embriões</i>									
Clivados (n)	3,95 $\pm$ 1,19	1,38 $\pm$ 1,30	4,22 $\pm$ 0,91	3,11 $\pm$ 1,04	0,341	0,036	0,752	0,854	0,522
Clivados (%)	54,9 $\pm$ 8,82	30,2 $\pm$ 9,65	53,7 $\pm$ 6,75	44,6 $\pm$ 7,90	0,206	0,213	0,765	0,839	0,356
Blast. (n)	1,04 $\pm$ 0,41	0,43 $\pm$ 0,30	0,65 $\pm$ 0,31	0,77 $\pm$ 0,36	0,770	0,478	0,573	0,742	0,344
Blast. Total (%)	10,3 $\pm$ 3,41	6,0 $\pm$ 3,72	4,7 $\pm$ 2,53	6,8 $\pm$ 2,96	0,627	0,631	0,595	0,413	0,324
Blast. Cult. (%)	16,8 $\pm$ 5,60	10,4 $\pm$ 6,03	6,0 $\pm$ 4,21	10,7 $\pm$ 4,88	0,501	0,610	0,492	0,341	0,293
Blast. Cliv. (%)	13,8 $\pm$ 6,00	23,8 $\pm$ 3,35	7,1 $\pm$ 4,56	6,9 $\pm$ 5,35	0,113	0,811	0,658	0,086	0,268
Alta Qual. Blast. (n)	0,83 $\pm$ 0,32	0,28 $\pm$ 0,33	0,45 $\pm$ 0,24	0,56 $\pm$ 0,28	0,678	0,660	0,343	0,634	0,278
Alta Qual. Blast (%)	41,7 $\pm$ 10,6	17,2 $\pm$ 11,4	26,5 $\pm$ 8,00	13,7 $\pm$ 9,38	0,243	0,896	0,299	0,106	0,558
Alta Qual. Blast.Total (%)	9,0 $\pm$ 2,58	3,6 $\pm$ 2,90	3,4 $\pm$ 1,92	5,0 $\pm$ 2,21	0,356	0,436	0,315	0,257	0,162
Alta Qual. Blast.Cult. (%)	17,2 $\pm$ 4,54	5,3 $\pm$ 5,08	4,3 $\pm$ 3,41	7,6 $\pm$ 3,90	0,162	0,321	0,383	0,131	0,086
Alta Qual. Blast.Clivados (%)	20,1 $\pm$ 5,43	10,2 $\pm$ 6,13	7,6 $\pm$ 4,08	8,2 $\pm$ 4,73	0,296	0,616	0,280	0,103	0,316

¹Grupo 0: Animais não receberam dieta contendo GSI no pré-parto; ²Grupo 30: Início do fornecimento de dieta com GSI nos 30 dias finais da gestação; ³Grupo 60: Início do fornecimento de dieta com GSI nos 60 dias finais da gestação; ⁴Grupo 90 Início do fornecimento de dieta com GSI nos 90 dias finais da gestação. ²Efeito de dieta; Efeito de aspiração (Asp.); Interação entre dieta x semana (INT); Efeito Linear (L); Efeito quadrático (Q).

Ao analisar os efeitos dos AGPIs descrito na literatura no desenvolvimento e qualidade embrionária. No presente estudo, esperava-se que a alimentação prolongada com GSI no pré-parto iria alterar a qualidade e/ou quantidade dos oócitos e embriões das vacas alimentados por mais tempo, porém não foi o que ocorreu. Sabe-se que em vacas leiteiras a taxa de AGs no fluido folicular tem grande correlação com a quantidade e tipo de AGs presentes na dieta e sendo passíveis de alterações (CHILPDS

et al., 2008; FOULADI-NASHTA et al., 2009). Estas alterações podem influenciar o grau de expansão das células do *cumulus* e a maturação nuclear no oócitos, os quais são críticos para o desenvolvimento do oócito após a fertilização (MAREI et al., 2010).

Marei et al., (2009) ao realizar maturação de oócitos *in vitro* (MIV) verificou que a taxa de maturação, produção e qualidade dos blastocistos maturados em meios que continham ácido α -linolênico aumentou em relação aqueles com AGSs. Porém na presença do ácido linoleico os oócitos apresentaram pior maturação e desenvolvimento inicial embrionário. Enquanto que na presença de ácido oleico (monoinsaturado) não houve comprometimento da competência para o desenvolvimento (WU et al., 2010; AARDEMA et al., 2011).

Muitos estudos mostram a eficiência da suplementação de ácidos linoleico e linolênico em vacas leiteiras no aumento do número de folículos (ROBINSON et al., 2002; BILBY et al., 2006b; CERRI et al., 2009a; ZACHUT et al., 2010a), tamanho (AMBROSE et al., 2006; BILBY et al., 2006b; SANTOS et al., 2008; DIRANDEH et al., 2013), qualidade (FOULADI-NASHTA et al., 2009), número e qualidade de embriões (CERRI et al., 2009a; FOULADI-NASHTA et al., 2009; MAREI et al., 2009; ZACHUT et al., 2010), porém estes estudos foram em sua maioria realizados comparando dietas com inclusão de algum tipo de AGPIs com dietas sem AGPIs ou com AGSs. Experimento que utilizou a suplementação com GSI iniciando 30 dias antes do parto até 90 dias pós-parto e mensurou as mesmas variáveis que este estudo foi Gandra (2012 no prelo¹⁴), onde observou resultados inferiores à média do grupo de animais que foram suplementados por mais tempo com GSI no período pré-parto (60 e 90 dias) para o total de oócitos viáveis (3,89 vs. 6,73, respectivamente), número de embriões clivados (2,72 vs. 3,66, respectivamente) e número de blastocistos (0,52 vs. 0,71, respectivamente) e médias similares para o total de oócitos recuperados (10,62 vs. 10,01, respectivamente).

Poucos são os estudos que comparam o tempo de alimentação no pré-parto com dietas contendo algum tipo de AGPI e sua influência nos parâmetros reprodutivos no pós-parto. Dentre eles destaca-se Baldiei et al. (2014) que ao estudarem o tempo de fornecimento de dieta contendo Ca-ácido linolênico no pré-parto e sua influência nos

¹⁴ GANDRA, J.R.; BARLETTA, R.V.; MINGOTI, R.D.; VERDURICO, L.C.; FREITAS JUNIOR, J.E.; OLIVEIRA, L.J.; TAKIYA, C.S.; KFOURY JUNIOR, J.R.; WILTBANK, M.C.; RENNO, F.P. Effects of whole flaxseed, raw soybeans, and calcium salts of fatty acids on measures of cellular immune function of transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 2016. No prelo.

parâmetros reprodutivos no pós-parto e não observaram diferença no número e tamanho de folículos.

Segundo Carroll et al. (1990) o colesterol é o precursor de todos os esteróides e o aumento da disponibilidade de substrato pode aumentar a síntese de esteróides folicular e melhorar a qualidade oocitária. Ao analisarmos as concentrações de colesterol total no pré-parto (Tabela 13) dos diferentes grupos, podemos observar um aumento linear crescente das concentrações nos grupos que começaram a receber GSI na dieta primeiro no pré-parto. Porém nada influenciou na qualidade folicular e embrionária como sugerido por Carroll et al. (1990).

Figura 37 - Embriões clivados no período de lactação de acordo com os grupos experimentais

Segundo, Mayra (2013) ainda é necessário muitos estudos a respeito da fisiologia do desenvolvimento oocitário e embrionário, pois atualmente sabe-se que a formação de fluido folicular e nutrição do oócito ocorre através de um gradiente de concentração. Sendo o ácido hialurônico, produzida pelas células *cumulus oophorus*, a principal molécula responsável pelo arrastando de fluidos dos capilares para o folículo (RODGERS; IRVING- RODGERS, 2010), e a regulação de sua síntese é regulado diretamente pelo FSH e por fatores parácrinos secretados pelo oócito

(D'ALESSANDRIS et al., 2001), sendo as vias de sinalização intracelular moduladas pelas prostaglandinas (derivadas dos AGPIs), cicloxigenase 2 (COX2) e pentraxina 3 (PTX-3) (PARK et al., 2004; ASHKENAZI et al., 2005) onde entender o mecanismo como tudo isso ocorre seria essencial para entender como a suplementação com AGPI pode realmente interferir.

Assim, além do ácido linoleico poder interferir na sinalização intracelular através da síntese das prostaglandinas, pode incorporar-se à membrana do ovócito ou mesmo pode modular respostas celulares pela ligação direta a receptores de membrana (PETIT; TWAGIRAMUNGUI, 2006) que são importantes moléculas sinalizadores a mensageiros intracelulares. Estes mecanismos de ação realçam o possível impacto dos lipídios sobre gametas e embriões. Contudo, Marei et al. (2010) com o objetivo de verificarem a ação direta e impacto da suplementação de AGPIs sobre o desenvolvimento oocitário e embrionário, realizaram MIV com diferentes concentrações de ácido linoleico durante um período de 24 horas em oócitos bovinos. Observaram que quanto maior a dose de ácido linoleico no meio de cultivo menor foi a expansão das células do *cumulus oophorus*. Sugerindo mais estudos a respeito.

Portanto, com o resultado do presente estudo e de outros na literatura mais estudos são necessários para verificar a ação mais detalhadas dos AGPIs sobre o desenvolvimento oocitário e embrionário.

6.10 CÉLULAS LEUCOCITÁRIAS

No presente estudo foi identificado os CD138⁺ (designa a população de neutrófilos), CD 14⁺ (designa a população de monócitos), CD3⁺ (designa a população de linfócitos), CD4⁺ (designa a população de linfócito T helper), CD8⁺ (designa a população de linfócitos T citotóxico) e CD62L⁺ (L-selectinas, expressa em neutrófilos ativos para realização de diapedese para locais de infecção).

Na avaliação dos resultados, observou-se efeito ($P < 0,05$) de semana para porcentagem de CD138⁺ no pós-parto, CD3⁺ no pré-parto e CD8⁺ no pré e pós-parto. Ainda, observou-se efeito ($P < 0,05$) de dieta para a porcentagem CD8⁺ no pós-parto (Tabela 15).

Houve efeito ($P<0,05$) de interação e linear crescente para porcentagem de $CD3^+$ no pós-parto, onde animais suplementados com GSI no pré-parto (grupo 30, 60 e 90) apresentaram os maiores valores em relação ao grupo não suplementado no pré-parto (grupo 0). (Tabela 15; Figura 38).

Tabela 15 - Médias ($\pm$ EPM) das populações de granulócitos, mononucleares e suas subpopulações em função dos grupos experimentais

Item	Dietas experimentais ¹				Probabilidades ²				
	0	30	60	90	Dieta	Semanas	INT	L	Q
<i>% células positivas</i>									
Granulócitos									
PréP	37,6 $\pm$ 3,65	36,4 $\pm$ 3,54	30,2 $\pm$ 2,47	32,3 $\pm$ 2,70	0,287	0,343	0,760	0,129	0,600
PósP	28,6 ^a $\pm$ 3,04	37,2 ^b $\pm$ 3,28	40,5 ^b $\pm$ 2,77	35,9 ^b $\pm$ 2,84	0,040	0,162	0,962	0,059	0,030
CD138 ⁺									
PréP	83,8 $\pm$ 4,55	80,3 $\pm$ 4,56	82,5 $\pm$ 3,34	85,6 $\pm$ 3,46	0,818	0,073	0,814	0,687	0,431
PósP	84,5 $\pm$ 2,99	80,4 $\pm$ 3,14	88,4 $\pm$ 2,62	82,4 $\pm$ 3,07	0,241	0,009	0,001	0,898	0,753
Mononucleares									
PréP	55,4 $\pm$ 4,18	56,9 $\pm$ 4,09	59,6 $\pm$ 2,91	60,2 $\pm$ 3,16	0,776	0,090	0,970	0,341	0,898
PósP	60,4 $\pm$ 3,09	58,1 $\pm$ 3,34	54,6 $\pm$ 2,82	60,9 $\pm$ 2,98	0,124	0,283	0,984	0,143	0,235
CD14 ⁺									
PréP	23,6 $\pm$ 5,98	24,0 $\pm$ 5,89	21,9 $\pm$ 4,11	17,4 $\pm$ 4,46	0,767	0,093	0,789	0,407	0,644
PósP	15,7 $\pm$ 2,16	17,5 $\pm$ 2,49	19,6 $\pm$ 2,03	16,9 $\pm$ 2,16	0,611	0,110	0,009	0,551	0,311
CD3 ⁺									
PréP	31,5 $\pm$ 302	32,9 $\pm$ 3,03	31,2 $\pm$ 2,58	35,5 $\pm$ 2,59	0,392	<0,001	0,132	0,515	0,392
PósP	21,6 ^a $\pm$ 3,12	29,9 ^b $\pm$ 3,37	30,7 ^b $\pm$ 2,85	31,4 ^b $\pm$ 2,92	0,091	0,234	0,011	0,028	0,220
CD4 ⁺									
PréP	2,7 $\pm$ 1,19	3,0 $\pm$ 1,17	3,0 $\pm$ 0,91	2,2 $\pm$ 0,89	0,928	0,551	0,549	0,735	0,625
PósP	1,3 $\pm$ 0,7	3,6 $\pm$ 0,7	1,8 $\pm$ 0,6	1,7 $\pm$ 0,6	0,114	0,175	0,521	0,867	0,071
CD8 ⁺									
PréP	13,4 $\pm$ 1,85	14,4 $\pm$ 1,86	10,9 $\pm$ 1,35	13,8 $\pm$ 1,26	0,356	<0,001	0,062	0,736	0,567
PósP	5,0 ^a $\pm$ 1,11	9,8 ^b $\pm$ 1,20	7,32 ^b $\pm$ 1,04	7,37 ^b $\pm$ 1,08	0,046	0,004	0,223	0,359	0,038
CD62L									
PréP	39,9 $\pm$ 10,9	49,6 $\pm$ 10,8	38,5 $\pm$ 8,03	52,3 $\pm$ 8,55	0,622	0,162	0,692	0,554	0,834
PósP	69,8 $\pm$ 5,92	75,6 $\pm$ 6,05	77,2 $\pm$ 5,65	79,4 $\pm$ 5,9	0,692	0,096	0,106	0,258	0,757

¹Grupo 0: Animais não receberam dieta contendo GSI no pré-parto; ²Grupo 30: Início do fornecimento de dieta com GSI nos 30 dias finais da gestação; ³Grupo 60: Início do fornecimento de dieta com GSI nos 60 dias finais da gestação; ⁴Grupo 90 Início do fornecimento de dieta com GSI nos 90 dias finais da gestação. ²Efeito de dieta; Efeito de Semana; Interação entre dieta x semana (INT); Efeito Linear (L); Efeito quadrático (Q).

Figura 38 - Porcentagem de linfócitos positivos no pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais. INT.: Semana 4 (0^a vs. 30^{ab} vs. 60^b vs. 90^b; P<0,05); Semana 8 (0^a vs. 30^b vs. 60^b vs. 90^b; P<0,05)

Efeito ($P < 0,05$) quadrático foi observado para porcentagem de granulócitos e $CD8^+$ no pós-parto. Onde animais suplementados com GSI no pré-parto (grupo 30, 60 e 90) apresentaram os maiores valores em relação ao grupo não suplementado no pré-parto (grupo 0). (Tabela 15; Figuras 39 e 40)

Figura 39 - Porcentagem de granulócitos positivos no pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais

Figura 40 - Porcentagem de CD8⁺ positivos no pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais

Segundo Amaral (2007), AGs dietéticas podem afetar a função imunológica por meio da modulação de respostas imunes inatas, tais como fagocitose e explosão oxidativa dos neutrófilos e macrófagos, assim como os efeitos sobre a resposta imune adaptativa, que incluem a produção de citocina e de eicosanóides, efeitos linfoproliferativos, e mudanças nas respostas humorais. Estes efeitos imunomoduladores são atingidos através da incorporação destes AGs na membrana de células imunitárias, resultando numa alteração no perfil de AGs das células. Isto permite que a célula consiga responder de forma diferente a estímulos externos. Assim no presente estudo a suplementação com GSI (independente do tempo) no pré-parto melhorou os parâmetros imunológicos, apresentando uma maior porcentagem de células imunes ativas (granulócitos, CD3⁺, CD8⁺) no pós-parto dos animais nos grupos suplementados (Tabela 15).

Assim, animais que foram alimentados no pré-parto com GSI (grupos 30, 60 e 90), podem ter melhorado a função imune através da maior síntese de AA derivado do ácido linoleico presente no GSI, consequentemente maior síntese de eicosanoides pró-inflamatórios, ativando maior porcentagem de células de defesa. Pois está bem estabelecido que os eicosanoides são derivados do AA, e que os AGPIs n-6 são precursores do AA (CALDER et al., 2002). Onde as conversões metabólicas de AGPIs ocorrem apenas dentro da mesma família de AGPIs, assim ácido linoleico (18:2 n-6), pode ser convertido em γ -linolênico (18:3, n-6), ácido dihomo- γ -linolênico (DGAL, 20:3, n-6), AA (20:4, n-6), e o DPA (22:5, n-6) (BEZARD et al., 1994). Segundo Calder

et al. (2006), a composição da membrana celular das células do sistema imune tem o principal efeito sobre a produção de moléculas inflamatórias (derivados de eicosanoides: prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos e leucotrienos) sendo os AGPIs os precursores para a síntese de eicosanoides. E segundo Thatcher et al. (2010), o fornecimento de dietas com AGPIs pode alterar os perfis de AGs dos tecidos, deixando as vacas em um estado “pró-inflamatório”, ou seja, diminuindo o limiar de resposta para o início de uma resposta inflamatória.

Em comparação de resultados na literatura, silvestre et al. (2011), ao mensurar $CD62L^+$ (L-selectina) e $CD18^+$ ($\beta 2$ -integrina). Observaram maior porcentagem de células para a dieta suplementada com sais de cálcio de cártamo ($\omega 6$) em relação ao óleo de palma (saturado), e também observaram efeito de tempo, onde houve maior porcentagem de células entre os dias 4 a 7 pós-parto. Gandra et al., (2016 no prelo¹⁵) ao suplementar vacas leiteiras no período de transição até 84 dias de lactação, com quatro diferentes dietas, onde três delas contendo fonte de lipídeos, semente de linhaça ($\omega 3$), grão de soja ($\omega 6$) e sais de cálcio ($\omega 6$), observaram maior porcentagem no pré e pós-parto de $CD4^+$ e no pós-parto de $CD8^+$, e $CD62L^+$ nos animais que receberam fontes de $\omega 3$ e $\omega 6$ em relação aos alimentados com a dieta controle. E maior porcentagem de $CD14^+$ nos animais que receberam fontes de $\omega 6$ em relação aos que receberam fonte de $\omega 3$. Ainda, Greco (2014) ao comparar a suplementação de gordura saturada (18:0), insaturada (18:2 n-6) e dietas sem inclusão (controle), em vacas do pré-parto (-30 dias) e início de lactação (+90 dias) observou maior porcentagem de $CD62L^+$ nos grupos suplementados com lipídeos.

Ao analisarmos o efeito ($P < 0,05$) de interação no pós-parto para $CD138^+$ (Figura 41), $CD14^+$ (Figura 42), $CD3^+$ (Figura 38) podemos observar que em determinado momento do pós-parto os grupos que receberam GSI no pré-parto apresentaram maior porcentagem de células ativas em relação ao grupo que não recebeu confirmando a influência da suplementação de GSI no pré-parto sobre a atividade das células imunológicas no pós-parto.

¹⁵ GANDRA, J.R.; BARLETTA, R.V.; MINGOTI, R.D.; VERDURICO, L.C.; FREITAS JUNIOR, J.E.; OLIVEIRA, L.J.; TAKIYA, C.S.; KFOURY JUNIOR, J.R.; WILTBANK, M.C.; RENNO, F.P. Effects of whole flaxseed, raw soybeans, and calcium salts of fatty acids on measures of cellular immune function of transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 2016. No prelo.

Figura 41 - Porcentagem de CD138⁺ positivos no pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais.
INT.: Semana 4 (0^a vs. 30^b vs. 60^b vs. 90^b; P<0,05)

Em relação ao CD138⁺ observou menor ($P<0,05$) porcentagem no grupo que começou a receber GSI no dia do parto em relação ao demais. Ainda houve um aumento na porcentagem de CD138⁺ uma semana antes do parto até o parto e posteriormente uma queda gradativa até a 4^o semana pós-parto e consequente estabilidade, porém no grupo que recebeu GSI a partir do parto (Grupo 0) a queda até a 4^o foi mais acentuada (Figura 41).

Figura 42 - Porcentagem de CD14⁺ positivos no pré e pós-parto de acordo com os grupos experimentais.
INT.: Semana 4 (0^a vs. 30^b vs. 60^b vs. 90^b; P<0,05); Semana 8 (0^a vs. 30^b vs. 60^b vs. 90^b; P<0,05)

Em relação a porcentagem de CD14⁺, ela não diferiu entre o grupo que recebeu GSI no dia do parto (Grupo 0) e o grupo que começou a receber com 30 dias antes da expectativa de parto (Grupo 30), porém foi menor em relação aos grupos que receberam a suplementação com GSI por mais tempo antes do parto (grupo 90 e 60, respectivamente) nas semanas 4 e 8 pós-parto. (Figura 42)

Em relação a porcentagem de CD3⁺, ela foi estável praticamente durante todas as semanas experimentais com a exceção da 4ª semana onde animais do grupo que começou a receber GSI no dia do parto (Grupo 0) apresentaram uma pequena diminuição em relação aos demais grupos experimentais. (Figura 38)

Tendo em vista os resultados apresentados pode-se inferir que a suplementação no pré-parto com GSI promove uma melhora na função imune de vacas no período transição e início de lactação, estando esta melhora diretamente com imunidade inata dos animais (Granulócitos, CD138⁺ e CD14⁺) e a imunidade adquirida (CD3⁺ e CD8⁺) de vacas leiteiras no período de transição.

A perfeita integração entre a nutrição, reprodução e imunidade de vacas leiteiras modernas no período de transição e início de lactação é fundamental para que os animais consigam expressar o máximo potencial produtivo ao longo da lactação, sendo que este potencial produtivo é expresso em produção de leite, índices reprodutivos adequados e resistência a eventuais transtornos metabólicos e infecciosos. Assim, a necessidade da realização de estudos que busquem integrar as diversas áreas da bovinocultura de leite é fundamental para que possamos sugerir estratégias integradas visando obter de cada animal o seu máximo potencial produtivo.

6.11 FAGOCITOSE (CÉLULAS POSITIVAS E INTENSIDADE)

Para avaliar a resposta imune dos grupos experimentais as amostras sanguíneas coletadas, como descrito no materiais e método, foram incubadas com bactérias gram-positiva (*S.aureus*) e gram-negativa (*E.coli*), posteriormente através do aparelho de citometria de fluxo foi mensurado a porcentagem de produção de células que produziram ERO e a Intensidade de Fluorescência de ERO (IFE), a porcentagem de fagocitose e a Intensidade de Fluorescência de Fagocitose (IFF). Foi realizado para granulócitos (Tabela 16) e CD14⁺ (Tabela 17).

Ao analisarmos a atividade granulocítica, observou-se efeito ($P<0,05$) de tempo, para a IFE quando estimulados com *S.aureus* no pré e pós-parto, e na IFF quando estimulados com *E.coli* no pré-parto. Ainda, observou-se efeito ($P<0,05$) quadrático para a porcentagem de granulócitos que produziram ERO quando estimuladas por *E.coli* no pós-parto. E efeito ($P<0,05$) de dieta e linear crescente para a IFE de granulócitos que foram estimulados por *S.aureus* (Tabela 16).

Tabela 16 - Médias ($\pm$ EPM) da porcentagem de produção de ERO, fagocitose e Intensidade de Florescência de ERO e fagocitose de granulócitos estimulados por *S.aureus* e *E.coli* no pré e pós-parto em função dos grupos experimentais

Item	Dietas experimentais ¹				Probabilidades ²				
	0	30	60	90	Dieta	Tempo	INT	L	Q
% Produção de ERO									
<i>S.aureus</i>									
PréP	84,9 $\pm$ 5,82	86,2 $\pm$ 5,73	86,3 $\pm$ 3,75	77,6 $\pm$ 4,15	0,486	0,201	0,352	0,381	0,363
PósP	84,7 $\pm$ 2,37	85,4 $\pm$ 2,47	80,3 $\pm$ 2,13	87,8 $\pm$ 2,16	0,106	0,336	0,254	0,698	0,140
<i>E.coli</i>									
PréP	88,6 $\pm$ 4,07	88,5 $\pm$ 3,98	87,1 $\pm$ 2,84	88,2 $\pm$ 3,10	0,895	0,786	0,326	0,881	0,873
PósP	84,4 ^a $\pm$ 2,80	93,9 ^b $\pm$ 2,72	92,3 ^b $\pm$ 2,60	91,1 ^b $\pm$ 2,65	0,112	0,517	0,528	0,315	0,029
Intensidade de Fluorescência de ERO									
<i>S.aureus</i>									
PréP	423,5 $\pm$ 87,4	447,0 $\pm$ 87,6	415,9 $\pm$ 70,9	436,4 $\pm$ 70,5	0,723	0,009	0,085	0,852	0,795
PósP	274,3 ^a $\pm$ 92,3	584,1 ^b $\pm$ 96,3	568,6 ^b $\pm$ 84,4	715,0 ^b $\pm$ 81,4	0,006	0,004	0,874	0,001	0,363
<i>E.coli</i>									
PréP	461,1 $\pm$ 128,2	423,7 $\pm$ 125,2	525,3 $\pm$ 89,2	324,6 $\pm$ 97,6	0,505	0,822	0,391	0,545	0,465
PósP	407,3 $\pm$ 89,7	440,5 $\pm$ 95,8	526,8 $\pm$ 83,4	654,8 $\pm$ 85,5	0,219	0,854	0,743	0,065	0,603
% Fagocitose									
<i>S.aureus</i>									
PréP	45,8 $\pm$ 5,40	43,3 $\pm$ 5,51	39,7 $\pm$ 3,70	48,3 $\pm$ 3,60	0,380	0,111	0,080	0,818	0,186
PósP	49,19 $\pm$ 4,16	45,7 $\pm$ 4,40	46,5 $\pm$ 3,72	45,5 $\pm$ 3,88	0,916	0,238	0,572	0,759	0,745
<i>E.coli</i>									
PréP	42,3 $\pm$ 6,73	36,4 $\pm$ 6,64	30,4 $\pm$ 5,22	34,4 $\pm$ 5,29	0,497	0,828	0,825	0,226	0,356
PósP	38,7 $\pm$ 3,17	33,7 $\pm$ 3,42	36,9 $\pm$ 2,90	38,2 $\pm$ 3,07	0,722	0,584	0,058	0,907	0,331
Intensidade de Fluorescência de Fagocitose									
<i>S.aureus</i>									
PréP	225,2 $\pm$ 91,0	238,3 $\pm$ 91,9	289,3 $\pm$ 56,7	384,0 $\pm$ 65,7	0,493	0,091	0,100	0,203	0,624
PósP	261,6 $\pm$ 35,5	226,9 $\pm$ 37,7	214,9 $\pm$ 33,0	213,9 $\pm$ 33,3	0,746	0,993	0,062	0,322	0,633
<i>E.coli</i>									
PréP	91,4 $\pm$ 64,7	141,8 $\pm$ 65,1	236,8 $\pm$ 47,8	189,4 $\pm$ 54,4	0,344	0,029	0,204	0,189	0,412
PósP	230,2 $\pm$ 29,8	193,8 $\pm$ 29,2	166,5 $\pm$ 25,0	152,2 $\pm$ 25,7	0,237	0,561	0,370	0,087	0,691

¹Grupo 0: Animais não receberam dieta contendo GSI no pré-parto; ²Grupo 30: Início do fornecimento de dieta com GSI nos 30 dias finais da gestação; ³Grupo 60: Início do fornecimento de dieta com GSI nos 60 dias finais da gestação; ⁴Grupo 90 Início do fornecimento de dieta com GSI nos 90 dias finais da gestação. ²Efeito de dieta; Efeito de Semana; Interação entre dieta x semana (INT); Efeito Linear (L); Efeito quadrático (Q).

Como pode ser observado, a suplementação de GSI no pré-parto, além de influenciar na proporção de granulócitos (Tabela 15), ela também pode estar melhorando a porcentagem de células produtoras de ERO estimuladas por *E.coli*, e ainda maior intensidade de produção ERO em granulócitos estimulados por *S.aureus* (Figuras 43 e 44).

Figura 43 - Porcentagem de granulócitos que produziram ERO no pré e pós-parto estimulados com *E.coli* em função dos grupos experimentais

Analisando a porcentagem de granulócitos que produziram ERO estimuladas por *E.coli* podemos observar que o grupo de animais que recebeu GSI a partir do parto (Grupo 0) apresentou um ligeiro declínio no parto e um declínio acentuado a partir da 1ª semana pós-parto até a 4ª semana. Porém fato este não ocorreu nos outros grupos (Figura 43).

Figura 44 - Intensidade de fluorescência de fagocitose em granulócitos no pré e pós-parto estimulados com *S.aureus* em função dos grupos experimentais

Ainda, ao analisar a IFF estimulada por *S.aureus* (Figura 44), podemos observar que os grupos alimentados com GSI no pré-parto (Grupo 90, 60 e 30) apresentaram um aumento a partir da 8ª semana que antecedeu o parto até a 8ª pós-parto com pequenas variações de amplitude, porém o grupo de animais que recebeu GSI a partir do dia do parto, apresentou variações durante o período pré-parto, com um declínio a partir da 1ª semana que antecedeu o parto até a 1ª semana pós-parto com posterior acúmulo, mas sempre manteve menor percentagem em relação aos grupos suplementados no pré-parto.

Como já discutido no tópico anteriormente, a suplementação com GSI no pré-parto pode ter melhorado a função imune através da maior síntese de AA, consequentemente maior síntese de eicosanoides pró-inflamatórios, ativando maior porcentagem de células de defesa (CALDER et al., 2002). Estudos *in vitro* tem claramente demonstrado que as alterações na composição dos ácidos graxos da membrana das células fagocíticas estão diretamente associados a capacidade fagocítica (CALDER, 2006), e que os ácidos graxos das membranas dos tecidos e consequentemente das células que os compõem podem ser alterados com o fornecimento de AGPIs na dieta (THATCHER et al., 2010). Assim, pode ocorrer maior expressão de receptores envolvidos na atividade fagocítica e melhorar a atividade da ação das células imunes (TIZARD, 2014), como ocorrido no presente estudo.

Silvestre et al. (2011), demonstrou que o fornecimento de lipídeos, principalmente as contendo ácido graxo linoleico, durante o período de transição

melhora a imunidade inata o que corrobora com os resultados do presente estudo. Ainda, Greco (2014) ao suplementar vacas no período de transição e início de lactação com AGs protegidos (controle, Ca-saturado e Ca-ácido linoleico), observou maior atividade fagocitária nos grupos que foram suplementados com AGs. E Gandra et al. (2015), ao suplementar vacas leiteiras (-30 até 90 dias pós-parto) com dietas contendo AGPIs (controle, semente de Linhaça, GSI e Ca-ácido linoleico) observou maior porcentagem de leucócitos e monócitos tanto no pré como no pós-parto para as dietas com AGPIs, ainda observou maior IFF para leucócitos no pré e pós-parto e de monócitos no pós-parto.

Kew et al. (2003a) em estudo *in vitro* verificou que a atividade fagocítica de neutrófilos e monócitos foi negativamente correlacionado com a suplementação de ácidos graxos saturados e positivamente correlacionada com o teor de instauração dos ácidos graxos. Ainda, Kew et al. (2003b) observou que atividade fagocítica de humanos aumentou, neutrófilos cerca de 40 % e monócitos em 200% quando pessoas foram suplementadas com dietas contendo AGPIs.

No presente estudo, ao analisar os resultados das análises de monócitos (CD14⁺), encontramos efeito de tempo ($P < 0,05$) no pós-parto para IFE CD14⁺ estimulados com *S.aureus* e *E.coli*. E para porcentagem e IFF de CD14⁺ no pós-parto quando estimulados por *E.coli* e *S.aureus*, respectivamente. Ainda, observou-se efeito ($P < 0,05$) de dieta e linear crescente para a porcentagem de CD14⁺ que produziram ERO no pós-parto quando estimulados com *E.coli* e *S.aureus* (Tabela 17).

Tabela 17 - Médias ($\pm$ EPM) da porcentagem de produção de ERO, Fagocitose e Intensidade de Florescência de ERO e fagocitose de CD14⁺ estimulados por *S.aureus* e *E.coli* no pré e pós-parto em função dos grupos experimentais

Item	Dietas experimentais ¹				Probabilidades ²				
	0	30	60	90	Dieta	Tempo	INT	L	Q
<i>% Produção de ERO</i>									
<i>S.aureus</i>									
PréP	43,5 $\pm$ 6,89	46,7 $\pm$ 6,69	47,6 $\pm$ 5,02	52,1 $\pm$ 5,3	0,788	0,372	0,265	0,338	0,924
PósP	45,5 ^a $\pm$ 6,59	63,2 ^b $\pm$ 4,74	56,6 ^b $\pm$ 4,12	64,8 ^b $\pm$ 4,18	0,012	0,056	0,761	0,010	0,284
<i>E.coli</i>									
PréP	38,4 $\pm$ 7,78	46,2 $\pm$ 7,72	43,5 $\pm$ 5,77	48,2 $\pm$ 6,20	0,789	0,784	0,135	0,400	0,820
PósP	46,8 ^a $\pm$ 4,49	66,4 ^b $\pm$ 4,85	59,7 ^b $\pm$ 4,10	62,1 ^b $\pm$ 4,27	0,020	0,237	0,966	0,048	0,056
<i>Intensidade de Fluorescência de ERO</i>									
<i>S.aureus</i>									
PréP	68,6 $\pm$ 26,7	80,3 $\pm$ 24,1	91,0 $\pm$ 20,1	86,3 $\pm$ 21,0	0,918	0,711	0,076	0,549	0,725
PósP	72,0 $\pm$ 26,0	163,5 $\pm$ 27,6	119,9 $\pm$ 24,2	137,5 $\pm$ 24,2	0,104	0,026	0,584	0,179	0,152
<i>E.coli</i>									
PréP	81,6 $\pm$ 1,39	89,7 $\pm$ 23,0	83,3 $\pm$ 16,9	66,7 $\pm$ 18,5	0,864	0,507	0,130	0,587	0,553
PósP	78,1 $\pm$ 17,3	118,9 $\pm$ 18,9	76,6 $\pm$ 17,0	105,1 $\pm$ 16,7	0,266	0,005	0,266	0,614	0,725
<i>% Fagocitose</i>									
<i>S.aureus</i>									
PréP	54,5 $\pm$ 8,77	49,8 $\pm$ 8,61	47,8 $\pm$ 6,91	49,6 $\pm$ 7,09	0,945	0,124	0,396	0,643	0,681
PósP	44,6 $\pm$ 5,09	42,8 $\pm$ 5,30	45,3 $\pm$ 4,49	43,0 $\pm$ 4,6	0,978	0,743	0,068	0,913	0,956
<i>E.coli</i>									
PréP	53,9 $\pm$ 6,99	43,3 $\pm$ 7,05	44,3 $\pm$ 5,59	38,1 $\pm$ 5,75	0,396	0,435	0,701	0,115	0,741
PósP	47,3 $\pm$ 3,57	44,0 $\pm$ 3,85	48,6 $\pm$ 3,31	48,6 $\pm$ 3,31	0,717	0,049	0,321	0,444	0,543
<i>Intensidade de Fluorescência de Fagocitose</i>									
<i>S.aureus</i>									
PréP	30,1 $\pm$ 9,61	41,5 $\pm$ 9,51	43,6 $\pm$ 7,12	50,8 $\pm$ 8,42	0,094	0,463	0,632	0,086	0,672
PósP	43,8 $\pm$ 6,12	45,3 $\pm$ 5,93	41,7 $\pm$ 5,77	52,2 $\pm$ 5,50	0,582	0,057	0,188	0,412	0,444
<i>E.coli</i>									
PréP	35,7 $\pm$ 15,6	34,7 $\pm$ 15,7	57,5 $\pm$ 9,55	52,7 $\pm$ 11,3	0,550	0,340	0,341	0,296	0,894
PósP	70,7 $\pm$ 12,5	62,2 $\pm$ 11,7	61,8 $\pm$ 11,06	66,4 $\pm$ 10,6	0,947	0,081	0,080	0,798	0,573

¹Grupo 0: Animais não receberam dieta contendo GSI no pré-parto; ²Grupo 30: Início do fornecimento de dieta com GSI nos 30 dias finais da gestação; ³Grupo 60: Início do fornecimento de dieta com GSI nos 60 dias finais da gestação; ⁴Grupo 90 Início do fornecimento de dieta com GSI nos 90 dias finais da gestação. ²Efeito de dieta; Efeito de Semana; Interação entre dieta x semana (INT); Efeito Linear (L); Efeito quadrático (Q).

Assim como os granulócitos (neutrófilos, principalmente), os CD14⁺ (monócitos e macrófagos) fazem parte do sistema imune inato, porém os neutrófilos são de curta duração e morrem logo após a fagocitose de um agente patogénico, contribuindo para o pus, que está associada com infecções, enquanto que os CD14⁺ são de vida mais longa e continuam a gerar novos lisossomas (JANEWAY et al., 2005). Como pode ser observado a suplementação de GSI no pré-parto melhorou a resposta dos CD14⁺, com

uma maior porcentagem de células produzindo ERO nesses grupos em relação ao grupo não suplementado no pré-parto (Grupo 0).

Analisando a porcentagem de CD14⁺ que produziram ERO dos diferentes grupos experimentais no decorrer do tempo experimental, tanto os estimulados por *S.aureus* (Figura 45) como por *E.coli* (Figura 46), observamos um aumento gradativo desde a 8ª semana pré-parto até a 8ª semana pós-parto nos grupos que foram suplementados com GSI no pré-parto com pequenas variações. Já o grupo que recebeu GSI a partir do parto apresentou menor porcentagem de CD14⁺ em relação demais e apresentou um decréscimo a partir da 8ª semana pré-parto que se estendeu até a 2ª semana pré-parto com um posterior aumento, porém voltou a diminuir a partir da 1ª semana pré-parto até a 1ª semana pós-parto aonde voltou a aumentar (Figuras 46 e 47).

Figura 45 - Porcentagem de CD14⁺ que produziram ERO no pré e pós-parto estimulados com *S.aureus* em função dos grupos experimentais

Figura 46 - Porcentagem de CD14⁺ que produziram ERO no pré e pós-parto estimulados com *E.coli* em função dos grupos experimentais

Os resultados imunológicos do presente estudo corroboram com os encontrados na literatura (JUCHEM et al., 2010; SILVESTRE et al., 2011; BICALHO et al., 2012; GANDRA, 2012; WATTS et al., 2013; GRECO, 2014; SHELDON et al., 2014), onde a suplementação com AGPIs estimula e/ou melhora a resposta do sistema imune frente a patógenos, e a suplementação com AGIs da família n-6 sugere uma ação mais “pró-inflamória” diante dos outros AGs. Ainda, Silvestre et al. (2011) sugere que a menor atividade do sistema imunológico pode estar correlacionada também a altas concentrações de AGNE na circulação consequência de um BEN. No caso do presente estudo as concentrações de AGNE podem estar também interferindo na menor atividade das células granulocíticas e de CD14⁺ no grupo que recebeu GSI a partir do parto (Grupo 0), pois na semana 3 pós-parto o grupo apresentou maiores concentrações de AGNE em relação aos demais (Figura 33).

7 CONCLUSÕES

A suplementação com GSI no pré-parto melhora a atividade do sistema imune dos animais no período de transição e início da lactação deixando a resposta imunológica inata e adquirada mais ativa.

A alimentação prolongada com GSI no pré-parto não melhora a qualidade oocitária e embrionária e não influencia a digestibilidade, balanço de nitrogênio, peso corpóreo, ECC e produção de leite em vacas no período de transição e início de lactação.

A alimentação prolongada com GSI no pré-parto aumenta o consumo de extrato etéreo e as concentrações de colesterol total, HDL, VLDL no pré-parto, altera o perfil de ácido graxo do leite e diminui lesões hepáticas com diminuição das concentrações de GGT no pré-parto e AST no período pré e pós-parto de vacas no período de transição e início de lactação

REFERÊNCIAS

- AARDEMA, H.; VOS P.; LOLICATO, F.; ROELEN, B.; KNIJN, H.M.; VAANDRAGER, A. B.; HELMS, J. B.; GADELLA, B. M. Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence. **Biology Reproduction**, v. 85, p. 62–69, 2011.
- ADLER, J.H. Theoretical quantitative approach to the mechanism of hypoglycemic ketosis in ruminants. **Journal of Theoretical Biology**, v. 28, p. 101–109, 1970.
- ALIZADEH, A.R.; ALIKHANI, M.; GHORBANI, G.R.; RAHMANI, H.R.; RASHIDI, L.; LOOR, J.J. Effects of feeding roasted safflowecaldarir seeds (variety IL-111) and fish oil on dry matter intake, performance and milk fatty acid profiles in dairy cattle. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 96, p. 466–473, 2012.
- ALLEN, M.S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 7, p. 1598-1630, 2000.
- ALLEN, M.S.; BRADFORD, B.J.; OBA, M. Board Invited Review: The hepatic oxidation theory of the control of feed intake and its application to ruminants. **Journal Animal Science**, v.87, p.3317–3334, 2009.
- AMADORI, M.; FUSI, F.; BILATO, D.; ARCHETTI, I.L.; LORENZI, V.; BERTOCCHI, L. Disease risk assessment by clinical immunology analyses in periparturient dairy cows. **Research in Veterinary Science**, v.102, p.25–26, 2015.
- AMARAL, B.C. **Effect of supplemental fat source on production, immunity, hepatic gene expression, and metabolism of periparturient dairy cows**. 2008. 297 p. PhD dissertation. Department of Animal Sciences, University of Florida, Gainesville, 2008.
- AMBROSE, D.J.; KASTELIC, J.P.; CORBETT, R.; PITNEY, P.A.; PETIT, H.V.; SMALL, J.A.; ZALKOVIC, P. Lower pregnancy losses in lactating dairy cows fed a diet enriched in α -linolenic acid. **Journal of Dairy Science**, v.89 p.3066–3074, 2006.
- AOAC. Official methods of analysis of AOAC International, Gaithersburg, MD, USA, 17th ed., 2000.
- AMADORI, M.; FUSI, F.; BILATO, D.; ARCHETTI I.L.; LORENZI, V.; BERTOCCHI, L. Disease risk assessment by clinical immunology analyses in periparturient dairy cows. **Research in Veterinary Science**, v.102, p.25–26, 2015.
- ASHKENAZI, H.; CAO, X.; MOTOLA, S.; POPLIKER, M.; CONTI, M.; TSAFRIRI, A. Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. **Endocrinology**, v.146, p.77-84, 2005.
- BADIEI, A.; ALIVERDILOU, A.; AMANLOU, H.; BEHESHTI, M.; DIRANDEH, E.; MASOUMI, R.; MOOSAKHANI, F.; H.V. PETIT. Postpartum responses of dairy

cows supplemented with n-3 fatty acids for different durations during the peripartal period. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p.6391–6399, 2014.

BAGGA, D.; WANG, L.; FARIAS-EISNER, R.; GLASPY, J.A.; REDDY, S.T. Differential effects of prostaglandin derived from ω -6 and ω -3 polynsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.100 p.1751-1756, 2003.

BALLOU, M.A.; GOMES, R.A.; JUCHEM, S.O.; DePETERS, E.J. Effects of dietary supplemental fish oil during the peripartum period on blood metabolites and hepatic fatty acid compositions and total triacylglycerol concentrations of multiparous Holsteincows. **Journal of Dairy Science**, v.92, n.2, p.657-669, 2009.

BARLETTA, R.V. **Grão de soja cru e integral na alimentação de vacas leiteiras**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010, 96p.

BARLETTA, R.V.; RENNÓ, F.P.; GANDRA, J.R.; FREITAS JUNIOR, J.E.; VERDURICO, L.C.; MINGOTI, R.D.; VILLELA, F.G. Desempenho e parâmetros sanguíneos de vacas leiteiras alimentadas com grão de soja. **Archivos de Zootecnia**, v.61, p.1-10, 2012.

BASS, D.A.; PARCE, J.W.; DECHATELET, L.R.; SZEJDA, P.; SEEDS, M.C.; THOMAS, M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. **Journal of Immunology**, v.130, n.4, p.1910-1917, 1983.

BATEMAN, H.G.; JENKINS, C. Influence of soybean oil in high fiber diets fed to non lactating cows on ruminal unsaturated fatty acids and nutrient digestibility. **Journal of Dairy Science**, v.81 n.9, p.2451-2458, 1998.

BATES, E.J.; FERRANTE, A.; HARVEY, D.P.; NANDOSKAR, M.; POULOS, A. Docosahexanoic acid (22:6, n-3) but not eicosapentaenoic acid (20:5, n-3) can induce neutrophil-mediated injury of cultured endothelial cells: involvement of neutrophil elastase. **Journal of Leukocyte Biology**, v.54, n.6, p.590-8, 1993

BATES, E.J.; FERRANTE, A.; SMITHERS, L.; POULOS, A. ROBINSON, B.S. Effect of fatty acid structure on neutrophil adhesion degranulation and damage to endothelial cells. **Arteriosclerosis**, v.116, n.2, p.247-59, 1995.

BATTERHAM, R.L.; BLOOM, S.R. The gut hormone Peptide YY regulates appetite. **Annals of the New York Academy Sciences**, v.994, p.162-168, 2003.

BAUMAN, D.E.; CURRIE, W.B. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. **Journal of Dairy Science**, v.62, p.1514-1528, 1980.

BAUMAN, D.E.; GRIINARI, J.M. Nutritional regulation of milk fat synthesis. **Annual Review of Nutrition**, v.23, p.203-227, 2003.

BAUMAN, D.E.; LOCK, A.L. Concepts in lipid digestion and metabolism in dairy cows. In: Tri-State Dairy Nutrition Conference 15., West Lafayette. **Proceedings**. West Lafayette: Cornell University, 2006, 14 p.

BAUMGARD, L.H.; MATITASHVILI, E.; CORL, B.A.; DWYER D.A.; BAUMAN, D.E.. *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid decreases lipogenic rates and expression of genes involved in milk lipid synthesis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.2155–2163, 2002.

BEAM, T.M.; JENKINS, T.C.; MOATE, P.J.; KOHN, R.A.; PALMQUIST, D.L. Effects of amount and source of fat on the rates of lipolysis and biohydrogenation of fatty acids in ruminal contents. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.2564-2573, 2000.

BELL, A.W. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. **Journal of Animal Science**, v.73, p. 2804-2819, 1995.

BENCHAAAR, C.; EUGÈNE, M.; CÔRTES, C.; CHAVES, A.V.; PETIT, H.V.; McALLISTER, T.A. Digestion, milk production, and milk composition of dairy cows fed increasing amounts of linseed oil. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.72, E-Supplement 1, 2008.

BERCHIELLI, T.T; PIRES, A.V; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de Ruminantes**. 2ªEd. Funep. Jaboticabal, 2011.

BEZARD, J.; BLOND, J.P.; BERNARD, A.; CLOUET, P. The metabolism and availability of essential fatty acids in animal and human tissues. *Reproduction Nutrition Development*, v.34, p.539-568, 1994.

BICALHO, M.L.; MACHADO, V.S.; OIKONOMOU, G.; GILBERT, R.O.; BICALHO, R.C. Association between virulence factors of *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, and *Arcanobacterium pyogenes* and uterine diseases of dairy cows. *Vet. Microbiol*, v.157,p.1225-1231, 2012

BILBY, T.R.; JENKINS, T.; STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W. Pregnancy, bovine somatotropin, and dietary n-3 fatty acids in lactating dairy cows: III. Fatty acid distribution. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.3386–3399, 2006a.

BILBY, T.R.; SOZZI, A.; LOPEZ, M.M.; SILVESTRE, F.T.; EALY, A.D.; STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W. Pregnancy, bovine somatotropin and dietary n-3 fatty acids in lactating dairy cows: 1. Ovarian, conceptus, and growth hormone-IGF system responses. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.3360–3374, 2006b.

BILBY, T.R.; BLOCK, J.; AMARAL, B.C.; SA FILHO, O.; SILVESTRE, F.T.; HANSEN, P.J.; STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W. Effects of dietary unsaturated fatty acids on oocyte quality and follicular development in lactating dairy cows in summer. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.3891–3903, 2006b.

BIONAZ, M.; THERING, B.I.; LOOR, J.J. Fine metabolic regulation in ruminants via nutrient – gene interactions: saturated long-chain fatty acids increase expression of genes involved in lipid metabolism and immune response partly through PPAR- α activation. **Journal Nutrition**, v.107, p.179-191, 2012.

BOMFIM, M.A.D.; LANNA, D.P.D.; FACO, O.; RODRIGUES, M.T.; GOMES, M.F.; PEREIRA, L.P.S. Efeito da manipulação dos teores de ácidos graxos sobre o potencial funcional da gordura do leite de cabra para a nutrição e saúde humanas. In: CONGRESSO PANAMERICANO DO LEITE, 9., 2006, Porto Alegre-RS, 2006.

BRADFORD, B.J.; HARVATINE, K.J.; ALLEN, M.S. Dietary unsaturated fatty acids increase plasma glucagon-like peptide-1 and cholecystokinin and may decrease pre-meal ghrelin in lactating dairy cows. **Journal Dairy Science**, v.91, p.1443–1450, 2008.

BRITT, J.H. Follicular development and fertility: Potential impacts of negative energy balance. In Proc. **National Reproduction Symposium**. Pittsburgh, PA, p.103-112, 1994.

BUTLER, W.R.; SMITH, R.D. Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. **Journal Dairy Science**. v.72, p.767–783, 1989.

CADORNIGA-VALINO, C.; GRUMMER, R.R.; ARMENTANO, L.E. Effects of fatty acids and hormones on fatty acid metabolism and gluconeogenesis in bovine hepatocytes. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.646-656, 1997.

CALDARI-TORRES, C. **Effects of long-chain fatty acids on production, metabolism and immunity of Holstein cows**. Dissertation to the graduate school (Doctor of Philosophy) - University of Florida, Florida, 2009, 205p.

CALDARI-TORRES, C.; LOCK, A.L.; STAPLES, C.R.; BADINGA, L. Performane, metabolic, and endocrine responses of periparturient Holstein cows fed 3 sources of fat. **Journal Dairy Science**. v.94, p.1500-1510, 2011.

CALDER, P.C. Dietary fatty acids and lymphocyte functions. **Proceedings Nutrition Society**, v.57, p.487–502, 1998.

CALDER, P.C.; BOND, J.A.; HARVEY, D.J.; GORDON, S.; NEWSHOLME, E.A. Uptake and incorporation of saturated and unsaturated fatty acids into macrophage lipids and their effect upon macrophage adhesion and phagocytosis. **Biochemistry Journal**, v.269, p.807–814, 1990.

CALDER, P.C.; YAQOOB, P.; THIES, F.; WALLACE, F.A.; MILES, E.A. Fatty acids and lymphocyte functions. **British Journal Nutrition**, v.87, p. s31–s48, 2002.

CALDER, P.C. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.77, p.327-35, 2007.

CALOMENI, G.D.; GARDINAL, R.; VENTURELLI, B.C.; SANTOS, M.C.B.; FREITAS JUNIOR, J.E.; VENDRAMINI, T.H.A.; TAKIYA, C.S.; SOUZA, H.N.; RENNÓ, F. Effects of polymer-coated of slow release urea on performance, ruminal fermentation, and blood metabolites in dairy cows. **Brazilian Journal of Animal Science**, v.44, p.327-334, 2015.

CANALE, C.J.; BURGESS, P.L.; MULLER, L.D.; VARGA, G.A. Calcium salts of fatty acids in diets that differ in neutral detergent fiber: effect on lactation performance and nutrient digestibility. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.1031-1038, 1990.

CANT, J.P.; DEPETERS, E.J.; BALDWIN, R.L. Mammary amino acid utilization in dairy cows fed fat and its relationship to milk protein depression. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 762-774, 1993.

CARROLL, D.J.; JERRED, M.J.; GRUMMER, R.R.; COMBS, D.K.; PIERSON, R.A.; HAUSER, E.R. Effects of fat supplementation and immature alfalfa to concentrate ratio on plasma progesterone, energy balance, and reproductive traits of dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.2855–2863, 1990.

CARROLL, J.A.; FORSBERG, N.E. Influence of stress and nutrition on cattle immunity. *Veterinary of Clinical*. **Food Animal**, v.23, p.105-149, 2007.

CARTER, F.; FORDE, N.; DUFFY, P.; WADE, M.; FAIR, T.; CROWE, M.A.; EVANS, A.C.; KENNY, D.A.; ROCHE, J.F.; LONERGAN, P. Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. **Journal of Reproduction & Infertility**, v.20, p.368–375, 2008.

CASALI, A.O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C; PEREIRA, J.C.; HENRIQUES, L.T.; FREITAS, S.G.; PAULINO, M.F. Influência do tempo de incubação e do tamanho de partículas sobre os teores de compostos indigestíveis em alimentos e fezes bovinas obtidos por procedimentos *in situ*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.335-342, 2008.

CERRI, R.L.A.; JUCHEM, S.O.; CHEBEL, R.C.;RUTIGLIANO, H.M.; BRUNO, R.G.S.; GALVÃO, K.N.; THATCHER, W.W.; SANTOS, J.E.P. Effect of fat source differing in fatty acid profile on metabolic parameters, fertilization, and Embryo quality in high-producing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.1520-1531, 2009a.

CERRI, R.L.A.; RUTIGLIANO, H.M.; LIMA, F.S.; ARUJO, D.B.; SANTOS, J.E.P. Effect of source of supplemental selenium on uterine health and embryo quality in high-producing dairy cows. **Theriogenology**, v.71, p.1127-1137, 2009b.

CHEN, G.; RUSSELL, J.B. More monensin-sensitive, ammonia producing bacteria from the rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, p.1052-1057, 1989.

CHEN, J.; GROSS, J.J.; VAN DORLAND, H.A.; REMMELINK, G.J.; BRUCKMAIER, R.M.; KEMP, B.; VAN KNEGSEL, A.T.M. Effects of dry period length and dietary energy source on metabolic status and hepatic gene expression of dairy cows in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v.98, p.1033–1045, 2015.

CHIBISA, G.E.; GOZHO, G.N.; VAN KESSEL, A.G.; OLKOWSKI, A.A.; MUTSANGWA, T. Effects of peripartum propylene glycol supplementation on nitrogen metabolism, body composition, and gene expression for the major protein degradation pathways in skeletal muscle in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.91, n. 9, p.3512-27, 2008.

CHILDS, S.; HENNESSY, A.A.; STANTON, C.; WATHES, D.C.; SREENAN, J.M.; DISKIN, M.G.; KENNY, D.A. Effect of dietary enrichment with either n-3 ou n-6 fatty acids on systemic metabolite and hormones concentration and ovarian function in heifers. **Animal**, v.2, p.883-893, 2008.

CHILLIARD, Y. Dietary fat and adipose tissue metabolism in ruminants, pigs, and rodents: a review. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.3897-3931, 1993.

CHILLIARD, Y.; GLASSER, F.; FERLAY, A.; BERNARD, L.; ROUEL, J.; DOREAU, M. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.109, p.828-855, 2007.

CHILLIARD, Y.; MARTIN, C.; ROUEL, J.; DOREAU, M. Milk fatty acids in dairy cows fed whole crude linseed, extruded linseed, or linseed oil, and their relationship with methane output, **Journal of Dairy Science**, v.92, p.5199–5211, 2009.

CHIZZOTTI, M. L. **Avaliação da casca de algodão para novilhos de origem leiteira e determinação da excreção de creatinina e produção de proteína microbiana em novilhas e vacas leiteiras**. 2004. 132 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2004.

CHOI, B. R.; PALQUIST, D. L. High fat diets increase plasma cholecystokinin and pancreatic polypeptide, and decrease plasma insulin and feed intake in lactating cows. **Journal of Nutrition**, v. 126, n. 11, p. 2913-2929, 1996.

CHOW, J.M.; DePETERS, E.J.; BALDWIN, R.L. Effect of rumen- protected methionine and lysine on casein in milk when diets high in fat or concentrate are fed. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.1051-1061, 1990.

CHRISTENSEN, R.A.; CAMERON, M.R.; CLARK, J.H.; DRACKLEY, J.K.; LYNCH, J.M.; BARBANO, D.M. Effects of amount of protein and ruminally protected amino acids in the diet of dairy cows fed supplemental fat. **Journal of Dairy Science**, v.77, p.1618-1629, 1994.

COFFEY, M.P.; EMMANS, G.E.; BROTHERSTONE, S. Genetic Evaluation of Dairy Bulls for Energy Balance Traits Using Random Regression. **Animal Science**, v.73, p.29-40, 2001.

CONTREARAS, G.A.; SORDILLO, L.M. Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.34, p.281–289, 2011.

COOKE, R.F.; SILVA DEL RIO, N.; CARAVIELLO, D.Z.; BERTICS, S.J.; RAMOS, M.H.; GRUMMER, R.R. Supplemental choline for prevention and alleviation of fatty. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 2413-2418, 2007.

COPPOCK, C.E.; WILKS, D.L. Supplemental fat in high-energy rations for lactating cows: effects on intake, digestion, milk yield, and composition. **Journal of Animal Science**, v. 69, n. 9, p. 3826-37, 1991.

CORRÊA, A.M.V. **Utilização de grão de soja em diferentes formas na alimentação de vacas leiteiras**. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal Viçosa, Minas Gerais, Viçosa, 2007, 128p.

CULLENS, F.M.; STAPLES, C.R.; BILBY, T.R.; SILVESTRE, F.T.; BARTOLOME, J.; SOZZI, A.; BADINGA, L.; THATCHER, W.W.; ARTHINGTON, J.D. Effect of

timing of initiation of fat supplementation on milk production, plasma hormones and metabolites, and conception rates of Holstein cows in summer. **Journal Dairy Science**, v.86, p.308-315, 2004.

CULLENS, F.M. Effects of the timing of fat supplementation on productive and reproductive responses of periparturient dairy cows during summer. Thesis, University of Florida, 2005, 146p.

D'ALESSANDRIS, C.; CANIPARI, R.; GIACOMO, M.D.; EPIFANO, O.; CAMAIONI, A.; SIRACUSA, G.; SALUSTRI, A. Control of Mouse Cumulus Cell-Oocyte Complex Integrity before and after Ovulation: Plasminogen Activator Synthesis and Matrix Degradation. **Endocrinology**, v.142, p.3033-3040, 2001.

DALLAIRE, M.P.; TAGA, H.; MA, L.; CORL, B.A.; GERVAIS, R.; LEBEUF, Y.; RICHARD, F.J.; CHOUINARD, P.Y. Effects of abomasal infusion of conjugated linoleic acids, *Sterculia foetida* oil, and fish oil on production performance Δ^9 -desaturation in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.97, p.6411-6425, 2014.

DELBECCHI, L.; AHNADI, C.E.; KENNELLY, J.J.; LACASSE, P. Milk fatty acid composition and mammary lipid metabolism in Holstein cows fed protected or unprotected conola seeds. **Journal of Dairy Science**, v.84, n.6, p.1375-1381, 2001.

DEMEYER, D.; DOREAU, M. Targets and procedures for latering ruminant meat and milk lipid. **Processings of the Nutrition Society**, v.58, p.593-607, 1999.

DETILLEX, J.C.; KEHRLI, M.E.Jr.; FREEMAN, A.E.; KELLEY, D.H. Study of immunological dysfunction in periparturient Holstein cattle selected for high and average milk production. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.44, p.251-267, 1995.

DHIMAN, T.R.; NAM, S.H.; URE, A.L. Factors affecting conjugated linoleic acid content in milk and meat. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.45, n.6, p.463-82, 2005.

DIRANDEH, E.; TOWHIDI, A.; ANSARI PIRSARAEI, Z.; ADIB HASHEMI, F.; GANJKHANLOU, M.; ZEINOALDINI, S.; REZAEI ROODBARI, A.; SABERIFAR, T.; PETIT, H.V. Plasma concentrations of PGFM and uterine and ovarian responses in early lactation dairy cows fed omega-3 and omega-6 fatty acids. **Theriogenology**, v.80 p.131-137, 2013.

DISKIN, M.G.; MORRIS, D.G. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, p.260-267, 2008.

DRACKLEY, J. K.; OVERTON, T.R.; DOUGLAS, G.N. Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. **Journal of Dairy Science**, v.84, E100-E112. 2001.

DRACKLEY, J.K.; KLUSMEYER, T.H.; TRUSK, A.M.; CLARK, J.H. Infusion of long-chain fatty acids varying in saturation and chain length into the abomasum of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.1517-1526, 1992.

- DRACKLEY, J.K. Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier? **Journal of Dairy Science**, v.82, p.2259–2273, 1999.
- DRACKLEY, J.K.; LACOUNT, D.W.; ELLIOT, J.P.; KLUSMEYER, T.H.; OVERTON, T. R.; CLARK, J. H.; BLUM, S. A. Supplemental fat and nicotinic acid for Holstein cows during an entire lactation. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.201–214, 1998.
- DUARTE, L.M.A.; STUMPF JUNIOR, W.; FISCHER, V.; SALLA, L.E. Efeito de diferentes fontes de gordura na dieta de vacas jersey sobre o consumo, a produção e a composição do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.6, p.2020-2028, 2005.
- DUNNE, L.D.; DISKIN, M.G.; SREENAN, J.M. Embryo and foetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. **Animal Reproduction Science**, v.58, p.39–44, 2000.
- EDMONSON, A.J.; LEAN, I.J.; WEAVER, L.D.; FARVER, T.; WEBSTER, G.A body condition scoring chart for holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.72, n.1, p.68-78, 1989.
- ELLIOTT, J.P.; DRACKLEY, J.K.; SCHAUFF, D.J.; JASTER, E.H. Diets Containing High Oil Corn and Tallow for Dairy Cows During Early Lactation. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.775-789, 1993.
- ELMES, M.; TEW, P.; CHENG, Z.; KIRKUP, S. E.; ABAYASEKARA, D.R.; CALDER, P.C.; HANSON, M.A.; WATHES, D.C.; BURDGE, G.C. The effect of dietary supplementation with linoleic acid to late gestation ewes on the fatty acid composition of maternal and fetal plasma and tissues and the synthetic capacity of the placenta for 2-series prostaglandins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1686, p.139–147, 2004.
- EMERY, R. S.; LIESMAN, J. S.; HERDT, T. H. Metabolism of long chain fatty acids by ruminant liver. **Journal of Nutrition**, v. 122, p. 832-7, supplement 3, 1992.
- FENG, S.; LOCK, A.L.; GARNSWORTHY, P.C.A rapid method for determining fatty acid composition of milk. **Journal of Dairy Science**, v.87, p. 3785–3788, 2004.
- FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G.H.A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **Journal Biology Chemistry**, v. 226, n.1, p.497–509, 1957.
- FOULADI-NASHTA, A.A.; GUTIERREZ, C.G.; GONG, J.G.; GARNSWORTHY, P.C.; WEBB, R. Impact of dietary fatty acids on oocyte quality and development in lactating dairy cows. **Biology of reproduction**. v.77, p.9–17. 2007.
- FOULADI-NASHTA, A.A.; WONNACOTT, K.E.; GUTIERREZ, C.G.; GONG, J.G.; SINCLAIR, K.D.; GARNSWORTHY, P.C.; WEBB, R. Oocyte quality in lactating dairy cows fed on high levels of n-3 and n-6 fatty acids. **Reproduction**, v.138, p.771-781, 2009.

- FREITAS JUNIOR, J.E. **Utilização de fontes de gordura em rações de vacas leiteiras**. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008, 93p.
- FREITAS JUNIOR, J.E. **Biohidrogenação e fluxo intestinal de ácidos graxos em vacas leiteiras**. Tese (doutorado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Jaboticabal, SP, 2012, 119p.
- FUENTES, M.C.; CALSAMIGLIA, S.; SÁNCHEZ, B.; GONZÁLEZ, A.; NEWBOLD, J.R.; SANTOS, J.E.P.; RODRÍGUEZ-ALCALÁ, L. M.; FONTECHA, J. Effect of estrused linseed on productive and reproductive performance of lactating dairy cows. **Livestock Science**, v.113, p.144-154, 2007.
- GANDRA, J.R **Fontes de ácidos graxos ω 3 e ω 6 em dietas de vacas leiteiras no período de transição e início de lactação**. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012, 170p.
- GARCIA-BOJALIL, C.M.; STAPLES, C.R.; RISCO, C.A.; SAVIO, J.D.; THATCHER, W. W. Protein degradability and calcium salts of long-chain fatty acids in the diets of lactating dairy cows: Reproductive responses. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.1385-1395, 1998.
- GARNSWORTHY, P.C. Fat in dairy cow diets. In: WISEMAN, J.; GARNSWORTHY, P. C. **Recent developments in ruminant nutrition 4**. Nottingham: University Press, 2002, 600p.
- GERVAIS, R., MCFADDEN, J.W.; LENGI A.J.; CORL, B.A.; CHOUINARD, P.Y. Effects of intravenous infusion of trans-10, cis-12 18:2 on mammary lipid metabolism in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.5167–5177, 2009.
- GOFF, A.K. Embryonic signals and survival. **Reproduction Domestic of Animal**, v.37, p.133-139, 2002.
- GONZALES, F.H.D.; ROCHA. J.A.R. Metabolic profile variations and reproduction Performance in Holstein cows of different Milk yields in southern Brasil. **Arquivo da Faculdade Veterinária**, UFRGS, v.26, n.1, p.53-64, 1998.
- GONTHIER, C.; MUSTAFA, F.A.; QUELLET, D.R.; CHOULNARD, P.Y.; BERTHLAUME, PETIT, H. V. Feeding micronized and extruded flaxseed to dairy cow on blood parameters and milk fatty adic composition. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.748-756, 2005.
- GOZHO, G.N.; MUTSVANGWA, T. Influence of carbohydrate source on ruminal fermentation characteristics, performance, and microbial protein synthesis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.2726-2735, 2008.
- GRABER, M., KOHLER, S.; KAUFMANN, T.; DOHERR, M.G.; BRUCKMAIER, R.M.; VAN DORLAND, H.A. A field study on characteristics and diversity of gene expression in the liver of dairy cows during the transition period. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.5200–5215, 2010.

GRECO, L.F. **Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on lactation performance, tissue gene expression, and reproduction in dairy cows.** Dissertation to the graduate school (Doctor of Philosophy) - University of Florida, Florida, 2014, 270p.

GRECO, L.F.; NEVES NETO, J.T.; PEDRICO, A.; FERRAZZA, R.A.; LIMA, F.S.; BISINOTTO, R.S. ; MARTINEZ, N.; GARCIA, M.; RIBEIRO, E.S.; GOMES, G.C.; SHIN, J.H.; BALLOU, M.A.; THATCHER, W.W.; STAPLES, C.R.; SANTOS, J.E.P. Effects of altering the ratio of dietary n-6 to n-3 fatty acids on performance and inflammatory responses to a lipopolysaccharide challenge in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.98, p. 602–617, 2015.

GRUM, D.E.; DRACKLEY, J.K.; CLARK, J.H. Fatty acid metabolism in liver of dairy cows fed supplemental fat and nicotinic acid during an entire lactation. **Journal of Dairy Science**, v.85, n.11, p.3026-3034, 2002.

GRUMMER, R.R. Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.3882-3896, 1993.

GRUMMER, R.R. Impact of changes in organic nutrients metabolism on feeding the transition cow. **Journal of Animal Science**, v.73, p.2820-2833, 1995.

GRUMMER, R. R. Gordura da dieta: fonte energética e/ou regulador metabólico? In: NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 8., 2004, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: CONAPEC JR.; UNESP-BOTUCATU, 2004. p. 83-108.

GRUMMER, R.R.; CARROLL, D.J. Effects of dietary fat on metabolic disorders and reproductive performance of dairy cattle. **Journal of Animal Science**, v.69, p.3838–3852, 1991.

GUILBAULT, L A.; THATCHER, W.W.; DROST, M.; HOPKINS, S.M. Source of series prostaglandins during the early postpartum period in cattle. **Biology of Reproduction**, v.31, p.879–887, 1984.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004, 513p.

HAGGARTY, P.; WOOD, M.; FERGUSON, E.; HOAD, G.; SRIKANTHARAJAH, A.; MILNE, E.; HAMILTON, M.; BHATTACHARYA, S. Fatty acid metabolism in human preimplantation embryos. *Human Reproduction*, v.21, p.766–773, 2006.

HAMMON, D.; SEVJEN, I.M.; DHIMAN, T.R.; GOFF, J.P. Neutrophil function and energy status in holstein cows with uterine health disorders. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.113, p.21–29. 2006.

HARFOOT, C.G.; HAZLEWOOD, G.P. LIPID Metabolism in the rumen. in: **the rumen microbial ecosystem**. Ed. new york, usa, Elsevier Science Publishers, p.285-322, 1988.

- HARFOOT, C. G.; HAZLEWOOD, G. P. Lipid metabolism in the rumen. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. (Ed.) **The rumen microbial ecosystem**. London, UK: Chapman & Hall, 1997. p. 382-426.
- HARVATINE, K.J.; ALLEN, M.S. Effects of fatty acid supplements on milk yield and energy balance of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.1081–1091, 2006a.
- HASUI, M.; HIRABAYASHI, Y.; YOHNOSUKE, K. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. **Journal of Immunological Methods**, v.117, n.1, p.53-58, 1989.
- HAVARTINE, K. J.; ALLEN, M.S.; Effects of fatty acid supplements on ruminal and total tract nutrient digestion in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.1092-1103, 2006.
- HAYIRLI, A.; KEISLER, D.H.; DOEPEL, L. Peripartum responses of dairy cows to prepartal feeding level and dietary fatty acid source. **Journal of Dairy Science**, v.94, p.917–930, 2011
- HAWKINS, D.E.; NISWENDER, K.D.; OSS, G.M.; MOELLER, C.L.; ODDE, K.G.; SAWYER, H.R.; NISWENDER, G.D. An increase in serum lipids increases luteal lipid content and alters the disappearance rate of progesterone in cows. **Journal of Animal Science**, v.73, p.541–545, 1995.
- HEITMANN, R.N.; DAWES, D.J.; SENSENIG, S.C. Sensenig Hepatic ketogenesis and peripheral ketone body utilization in the ruminant. **Journal Nutrition**. v.117, p.1174–1180, 1987.
- HERDT, T.H. Ruminant adaptation to negative energy balance. In: HERDT, T. H. (Ed.). Metabolic disorders of ruminants. **Veterinary Clinical of North American**, v.16, n.2, p.215-230, 2000.
- HIRABAYASHI, Y.; TANIUCHI, S.; KOBAYASHI, Y. A quantitative assay of oxidative metabolism by neutrophils in whole blood using flow cytometry. **Journal of immunology and Immunopathology**, v.112, n.1-2, p.12-23, 2006.
- HINCKLEY, T.; CLARK, R. M.; BUSHMICH, S.L.; MILVAE, R.A. Long chain polyunsaturated fatty acids and bovine luteal cell function Biology of Reproduction. **Journals of Reproduction and Fertility**, v.55, p.445–449, 1996.
- HOEDEMAEKER, M.L.A.; LUND, L.A.; WAGNER, W.C. Influence of arachidonic acid metabolites and steroids on function of bovine polymorphonuclear neutrophils. **American Journal of Veterinary Research**, v.53, p.1534–1539, 1992.
- HOLST, J.J. Gut hormones as pharmaceuticals. From enteroglucagon to GLP-1 and GLP-2. **Regulatory Peptides**, v.93, p.45–51, 2000.
- HOMA, S.T.; BROWN, C.A. Changes in linoleic acid during follicular development and inhibition of spontaneous breakdown of germinal vesicles in cumulus-free bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.94, p.153–160, 1992.

HUR, S.J.; PARK, G.B.; JOO, S. T. Biological activities of conjugated linoleic acid (CLA) and effects of CLA on animal products. **Livestock Science**, v.110, p.221–229, 2006.

HUTCHINSON, I.A.; HENNESSY, A.A.; WATERS, S.M.; DEWHURST, R.J.; EVANS, A.C.O.; LONERGAN, P.; BUTLER, S.T. Effect of supplementation with different fat sources on the mechanisms involved in reproductive performance in lactating dairy cattle. **Theriogenology**, v.78, p.12–27, 2012.

INGRAHAM, R.H.; KAPPEL, L C. Metabolic profile testing. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal**, v.4, p.391-411, 1988.

IRELAND, J.J. Control of follicular growth and development. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 34, p.39-54, 1987.

JAMES, M.J.; GIBSON, A.R.; CLELAND, L.G. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.71, p.343s–348s, 2000.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M.J. Immunobiology: the immune system in health and disease, 6th ed. New York: Garland Science, p.1-432. 2005.

JENKINS, T.C.; JENNY, B.F. Nutrient digestion and lactation performance of dairy cows fed combinations of prilled fat and canola oil. **Journal of Dairy Science**, v.75, n.3, p.796-803, 1992.

JENKINS, T.C. Lipid metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v.76, p. 3851-3863, 1993.

JUCHEM, S.O. Lipid Digestion and Metabolism in Dairy Cows: Effects on Production, Reproduction and Health. PhD thesis, **University of California Davis**, 2007, 217p.

JUCHEM, S.O.; SANTOS, J.E.P.; CERRI, R.L.A.; CHEBEL, R.C.; GALVÃO, K.N.; BRUNO, R.; DEPETERS, E.J. Effect of calcium salts of fish and palm oils on lactational performance of Holstein cows. **Animal Feed Science and Technology**, v.140, p.18-38, 2008.

JUCHEM, S.P.; CERRI, R.L.A.; VILLASEÑOR, M.; GALVÃO, K.N.; BRUNO, R.G. S.; RUTIGLIANO, H.M.; DEPETERS, J.E.; SILVESTRE, F.T.; TATCHER, W.W.; SANTOS, J.E.P. Supplementation with calcium salts of linoleic and *trans*-octadecenoic acids improves fertility of lactating dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v.140, p.18-38, 2010.

KAMPEM, A.H.; TOLLERSRUD, T.; LARSEN, S.; ROTH, J.A.; FRANK, D.E.; LUND, A. Repeatability of flow cytometric and classical measurement of phagocytosis and respiratory burst in bovine polymorphonuclear leukocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.97, n.1-2, p.405-414, 2004.

KAMPEM, A.H.; TOLLERSRUD, T.; LUND, A. Flow citometric measurement of neutrophil respiratory burst in whole bovine blood using live *Staphylococcus aureus*. **Journal of Immunological Methods**, v.289, n.1-2, p.47-55, 2004.

- KEHRLI, M.E.; NONNECKE, B.J.; ROTH, J.A. Alterations in bovine lymphocyte function during the periparturient period. **American Journal of Veterinary Research**, v.50, p. 215–220, 1989.
- KEMP, P.; LANDER, D.J.. Hydrogenation in vitro of α -linolenic acid to stearic acid by mixed cultures of pure strains of rumen bacteria. **Journal of General Microbiology**, v.130, p.527-533, 1984.
- KEW, S.; BANERJEET, T.; MINIHANE A.M.; FINNEGAN, Y.E.; MUGGLI, R.; ALBERS, R.; WILLIAMS, C.M.; CALDER, P.C. Lack of effect of foods enriched with plant- or marine-derived n-3 fatty acids on human immune function, **American Journal of Clinical Nutrition**, v.77, p.1287–1295, 2003b.
- KEW, S.; BANERJEET, T.; MINIHANE A.M.; FINNEGAN, Y.E.; WILLIAMS, C. M.; CALDER, P. C. Relation between the fatty acid composition of peripheral blood mononuclear cells and measures of immune cell function in healthy, free-living subjects aged 25–72 yr, **American Journal of Clinical Nutrition**, v.77, p.1278–1286, 2003a.
- KIM, J.Y.; KINOSHIT, M.; OHNISHI, M.; FUKUI, Y. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature an in vitro matured bovine oocytes. **Reproduction**, v.122, p.131–138, 2001.
- KIMURA, K.; GOFF, J.P.; KEHRLI, M.E. Effects of the presence of the mammary gland on expression of neutrophil adhesion molecules and myeloperoxidase activity in periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.82, p.2385–2392, 1999.
- KIMURA, K.; GOFF, J.P.; KEHRLI JR., M.E.; REINHARDT, T.A. Decreased neutrophil function as a cause of retained placenta in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.544–550, 2002.
- KINDT, T.J.; GOLDSBY, R.A.; OSBORNE, B.A. Kindt, Immunology, 6th ed. New York: WH Freeman and Company, p.1-370, 2007.
- KOBZIK, L.; GODLESKI, J.J.; BRAIN, J.D. Selective down regulation of alveolar macrophage oxidative response to opsonin-inde-pendent phagocytosis. **Journal of Immunology**, v.144, p.4312–4319, 1990.
- KRAMER, J.K.G.; FELLNER, V, DUGAN, M.E., SAUER, F.D., MOSSOBA, M.M., YURAWECZ, M.P. Evaluating acid and base catalysis in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total *trans* fatty acids. **Lipids**, v.32, n.11, p.1220-1228, 1997.
- KRUIP, T.H.; BONI, R.; WURTH, Y.A.; ROELOFSEN, M.W.M.; PIETERSE, M.C. potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. **Theriogenology**, v.42, p.675-684, 1994.
- KUNZ, P.L.; BLUM, J.W.; HART, I.C.; BICKEL, H.; LANDIS, J. Effects of different energy intakes before and after calving on food-intake, performance and blood hormones and metabolites in dairy cows. **Animal Production**, v.40, p.219-231, 1985.
- LACETERA, N.; SCALIA, D.; FRANCI, O.; BERNABUCCI, U.; RONCHI, B.; NARDONE, A. Short communication: effects of nonesterified fatty acids on

lymphocyte function in dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.1012–1014, 2004.

LESSARD, M.; GAGNON, N.; GODSON, D.L.; PETIT, H.V. influence of parturition and diets enriched in n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids on immune response of dairy cows during the transition period. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.2197-2210, 2004.

LONERGAN, P.; SHARIF, H.; MONAGHAN, P.; GALLGHER, H.; GORDON, M. Effect of follicle size on bovine oocyte morphology and embryo yield following maturation, fertilization and culture in vitro, fertilization and culture in vitro. **Theriogenology**, v.37, p.248, 1992.

LÓPEZ, S.; LÓPEZ, J.; STUMPF JUNIOR, W. Produção e composição do leite e eficiência alimentar de vacas da raça Jersey suplementadas com fontes lipídicas. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v.15, n. 1, p. 1022-1031, 2007.

LUCY, M.C.; COLLIER, R.J.; KITCHELL, M.L.; DIBNER, J.J.; HAUSER, S.D.; KRIVI, G.G. Immunohistochemical and nucleic acid analysis of somatotropin receptor populations in the bovine ovary. **Biology of Reproduction**, v.48, n.6, p.1219-1227, 1993.

MACHUGH, D.E.; TARAKTSOGLOU, M.; KILLICK, K.E.; NALPAS, N.C.; BROWNE, J.A. Pan-genomic analysis of bovine monocyte-derived macrophage gene expression in response to in vitro infection with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. **Veterinary Research**, v.43, n.25, p.1-19, 2012.

MALLARD, B.A.; DEKKERS, J.C.; IRELAND, M.J.; LESLIE, K.E.; SHARIF, S.; VANKAMPEN, C.L.; WAGTER, L.B.N.; WILKIE, B.N. Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.585– 595, 1998.

MALLARD, B.A.; WAGTER, L.C.; IRELAND, M.J.; DEKKERS, J.C. Effects of growth hormone, insulin-like growth factor-i, and cortisol on periparturient antibody response profiles of dairy cattle. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.60, p.61–76, 1997.

MANN, G.E.; LAMMING, G.E. The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v.34, p.269-274, 1999.

MAREI, W.F.; WHATES, D.C.; FOULADI-NASHTA, A.A.: The effect of linolenic acid on bovine oocyte maturation and development. **Biology of Reproduction**, v.81, p.1064–1072, 2009.

MAREI, W.F.; WHATES, D.C.; FOULADI-NASHTA, A.A. Impact of linoleic acid on bovine oocyte maturation and embryo development. **Reproduction**, v.139, p.979–88, 2010.

MARTIN, C.; ROUEL, J.; JOUANY, J.P.; DOREAU, M.; CHILLIARD, Y. Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed oil. **Journal of Animal Science**. v.86, p.2642-2650, 2008.

- MASHEK, D.G.; BERTICS, S.J.; GRUMMER, R.R. Effects of intravenous triacylglycerol emulsions on hepatic metabolism and blood metabolites in fasted dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.88, n.1, p.100-109, 2005.
- MATTOS, R.; STAPLES, C.R.; ARTECHE, A.C.M.; WILTBANK, M.C.; DIAZ, F.J.; JENKINS, T.J.; THATCHER, W.W. The effects of feeding fish oil on uterine secretion of PGF 2α , milk composition, and metabolic status of periparturient Holstein cows. **Journal. Dairy Science**, v.87, p.921-932, 2004.
- MATTOS, R.; STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W. Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. **Reviews of Reproduction**, v.5, p.38–45, 2000.
- McEVOY, T.G.; ROBINSON, J.J.; SINCLARI, K.D. Developmental consequences of embryo and cell manipulation in mice and farm animals. **Reproduction**, v.122, n.4, p.507-18, 2000.
- McNAMARA, S.; BUTLER, T.; RYAN, D.P.; MEE, J.F.; DILLON, P.; O'MARA, F. P.; BUTLER, S.T.; ANGLESEY, D.; RATH, M.; MURPHY, J.J. Effect of offering rumen protected fat supplements on fertility performance in spring-calving holstein-friesian cows. **Animal Reproduction Science**, v.79, p.45- 56, 2003.
- MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 85, p.1217-1240, 2002.
- MILES, E.A.; BANERJEE, T.; CALDER, P.C. The influence of different combinations of gamma-linolenic, stearidonic and eicosapentaenoic acids on the fatty acid composition of blood lipids and mononuclear cells in human volunteers. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.70, p.529-38, 2004.
- MOALLEM, U.; KATZ, M.; LEHRER, H.; LIVSHITZ, L.; YAKOBY, S. Effects of peripartum propylene glycol or fats differing in fatty acid profiles on feed intake, production, and plasma metabolites in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.3846-3856, 2007.
- MUSTAFA, A.F.; SEGUIN, P. Characteristics and in situ degradability of whole crop faba bean, pea, and soybean silages. **Canadian Journal Animal Science**, v.83, p.793–799, 2003.
- NAGAHATA, H. Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD): a review. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v.66, n.12, p.1475-82, 2004.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. 1989. **Nutrient requeriments of dairy cattle**. 6th rev.ed. National Academy Press Washinton, D.C.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. 2001. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. 7th rev. ed. National Academy Press, Washington, DC.
- NAVES, A. B. **Grão de soja integral e moído na alimentação de vacas leiteiras**. 2010. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Ed. 6. 2014.

NIBART, M.; SILVA PEIXER, M.; THUARD, J. M.; DURANT, M.; GUYADER-JOLY, C.; PONCHON, S.; MARQUANT-LE GUIENE, B.; HUMBLLOT, P. Embryo production by OPU and IVF in dairy cattle. In: RÉUNION A.E.T.E., 11., 1995, Hannover. **Proceedings...** Hannover, 1995. p. 216.

NOCEK, J.E. In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility. A review. **Journal of Dairy Science**, v.71, p.2051-2069, 1988.

NONNECKE, B.J.; FRANKLIN, S.T.; YOUNG, J.W. Effects of ketones, acetate, and glucose on *in vitro* immunoglobulin secretion by bovine lymphocytes. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.982-990, 1992.

OLDICK, B.S.; STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W.; GYAWU, P. Abomasal infusion of glucose and fat – effects on digestion, production, and ovarian and uterine functions of cows. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.1315-1328, 1997.

OLIVEIRA, A.S.; VALADARES, R.F.D.; VALADARES FILHO, S.C.; CECON, P.R.; RENNÓ, L.N.; QUEIROZ, A.C.; CHIZZOTTI, M.L. Produção de proteína microbiana e estimativas das excreções de derivados de purinas e de uréia em vacas lactantes alimentadas com rações isoprotéicas contendo diferentes níveis de compostos nitrogenados não-protéicos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.5, p.1621-1629, 2001.

OLSON, J. Estratégias de nutrición para vacas en transición. **Hoard's dairyman**, n. 88, 2002, 288 p.

ONETTI, S.G.; GRUMMER R.R. Response of lactating cows to three supplemental fat sources as affected by forage in the diet and stage of lactation: a meta-analysis of literature. **Animal Feed Science and Technology**, v.115, n.01-02, p.65-82, 2004.

OVERTON, T.R.; DRACKLEY J.K.; OTTEMANN-ABBAMONTE, C.J.; BEAULIEU, A.D.; CLARK, J.D. Metabolic adaptation to experimentally increased glucose demand in ruminants. **Journal of Animal Science**, v.76, n.11, p.2938-46, 1998.

OVERTON, T.R.; DRACKLEY, J.K.; OTTEMANN-ABBAMONTE, C.J. Substrate utilization for hepatic gluconeogenesis is altered by increased glucose demand in ruminants. **Journal of Animal Science**, v.77, p.1940-1951, 1999.

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

PALMIQUIST, D.L.; JENKINS, T.C. Fat in lactation rations: review. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n.1, p.1-14, 1980.

PALMQUIST, D.L.; MOSER, E. A. Dietary fat effects on blood insulin, glucose utilization, and milk protein content of lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v.64, p.1664-1670, 1981.

- PALMQUIST, D.L. The feeding value of fats. In: Orskov, R. (ed.). **World Animal Science**. B. Disciplinary approach. 4. Feed Science. Amsterdam: Elsevier, p.293–311, 1988.
- PALMQUIST, D.L. Influence of source and amount of dietary fat on digestibility in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 5, n.4, p.1354-60, 1991.
- PALMQUIST, D.L.; BEAULIEU, D.; BARBANO, D.M. Feed and animal factors affecting milk fat composition. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.1753-1771, 1993.
- PALMQUIST, D.L.; MATTOS, W.R.S. Metabolismo de lipídeos. In: BERCHIELI, T. T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Ed.). **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, p.287-310, 2006.
- PARK, J.Y.; SU, Y.Q.; ARIGA, M.; LAW, E.; JIN, S.L.; CONTI, M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. **Science**, v.303, p.682-684, 2004.
- PETERSON, D.G.; MATITASHVILI, E.A.; BAUMAN, D.E. Diet-induced milk fat depression in dairy cows results in increased trans-10, cis-12 CLA in milk fat and coordinate suppression of mRNA abundance for mammary enzymes involved in milk fat synthesis. **Journal of Nutrition**, v.133, p.3098-102, 2003.
- PETIT, H.V. Digestion, milk production, milk composition, and blood composition of dairy cows fed whole flaxseed. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.1482-1490, 2002.
- PETIT, H.V.; GERMIQUET, C.; LEBEL, D. Effect of feeding whole, unprocessed sunflower seeds and flaxseed on milk production, milk composition, and prostaglandin secretion in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.3889–3898, 2004.
- PETIT, H.V.; TWAGIRAMUNGU, H. Conception rate and reproductive function of dairy cows fed different fat sources, **Theriogenology**, v.66, p.1316–1324, 2006.
- PETIT, H.V.; PALIN, M.F.; DOEPEL, L. Hepatic lipid metabolism in transition dairy cows fed flaxseed. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.4780–4792. 2007.
- PIPEROVA, L.S.; SAMPUGNA J.; TETER B.B. et al. Duodenal and milk trans octadecenoic acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomers indicate that postabsorptive synthesis is the predominant source of cis-9-containing CLA in lactating dairy cows. **Journal Nutrition**, v.132, p.1235–41, 2002.
- PIRES, J.A.A.; PESCARA, J.B.; GRUMMER, R.R. Reduction of plasma NEFA concentration by nicotinic acid enhances the response to insulin in feed-restricted Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.90, n.10, p.4635-4642, 2007.
- PONTER, A.A.; GUYADER-JOLY, C.; NUTTINCK, F.; GRIMARD, B.; HUMBLLOT, P. Oocyte and embryo production and quality after OPU-IVF in dairy heifers given diets varying in their n-6/n-3 fatty acid ratio. **Theriogenology**, v.78, p.632–645, 2012.
- PREISLER, M.T; WEBER, P.S.; TEMPELMAN, R.J.; ERSKINE, R.J.; HUNT, H.; BURTON, J.L. Glucocorticoid receptor expression profiles in mononuclear leukocytes of periparturient Holstein cows. **Journal Dairy Science**, v.83, p.38-47, 2000.

RABIEE, A.R.; BREINHILD, K.; SCOTT, W.; GOLDER, H.M.; BLOCK, E.; LEAN, I.J. Effect of fat additions to diets of dairy cattle on milk production and components: A meta-analysis and meta-regression. **Journal of Dairy Science**, v.95, p.3225–3247, 2012.

RABOISSON, D.; CAUBET, C.; TASCA, C.; DE MARCHI, L.; FERRATON, J.M.; GANNAC, S.; MILLET, A.; ENJALBERT, F.; SCHELCHER, F.; FOUCRAS, G. Effect of acute and chronic excesses of dietary nitrogen on blood neutrophil functions in cattle. **Journal Dairy Science**, v.97, p.7575–7585, 2014.

RAMIREZ-RAMIREZ, H.A.; CASTILLO LOPEZ, E.; JENKINS, C.J.R.; ALUTHGE, N.D.; ANDERSON, C.; FERNANDO, S.C.; HARVATINE, K.J.; KONONOFF, P.J. Reduced-fat dried distillers grains with solubles reduces the risk for milk fat depression and supports milk production and ruminal fermentation in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, in press, 2016.

RANDEL, R.D. Nutrition and post-partum rebreeding in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 68, p.853–862, 1990.

REYNOLDS, C.K.; AIKMAN, P.C.; LUPOLI, B.; HUMPHRIES, D.J.; BEEVER, D.E.; Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. **Journal Dairy Science**, v.86, p.1201–1217, 2003.

ROBERTS, C.J.; REID, I.M.; ROWLANDS, G.J.; PATTERSON, A. A fat mobilization syndrome in dairy cows in early lactation. **The Veterinary Record**, v.108, p.7–9, 1981.

ROBINSON, R.S.; PUSHPAKUMARA, P.G.; CHENG, Z.; PETER, A.R.; ABAYASEKARA, D.R.; WATHES, D.C.. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on ovarian and uterine function in lactating dairy cows. **Reproduction**, v.124, p.119–131, 2002.

RODGERS, R.J.; IRVING-RODGERS, H.F. Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. **Biology Reproduction**, v. 82, p.1021–1029, 2010.

RODNEY, R.M.; CELI, P.; SCOTT, W.; BREINHILD, K.; LEAN, I.J. Effects of dietary fat on fertility of dairy cattle: A meta-analysis and meta-regression. **Journal of Dairy Science**, v.98, p.5601–5620, 2015.

ROMO, G.A.; ERDMAN, R.A.; TETER, B.B.; SAMPUGNA, J.; CASPER, D.P. Milk composition and apparent digestibilities of dietary fatty acids in lactating dairy cows abomasally infused with *cis* or *trans* fatty acids. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.2609–2619, 2000.

RYAN, D.P.; SPOON, R.A.; WILLIAMS, G.L. Ovarian follicular characteristics, embryo recovery, and embryo viability in heifers fed high fat diets and treated with follicle-stimulating hormone. **Journal Animal Science**, v.70, p.3505–3513, 1992.

SANTOS, J.E.P.; BILBY, T.R.; THATCHER, W.W.; STAPLES, C.R.; SILVESTRE, F.T. Long-chain fatty acids of diet as factors influencing reproduction in cattle. **Reproduction of Domestic Animals**, v.43, p.23–30, 2008.

SANTOS, J.E.P.; BISINOTTO, R.S.; RIBEIRO, E.S.; LIMA, F.S.; GRECO, L.F.; STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W. Applying nutrition and physiology to improve reproduction in dairy cattle. **Reproduction Domestic Animal**, v.67, p.387-404, 2010.

SATTERFIELD, M.C.; BAZER, F.W.; SPENCER, T.E. Progesterone regulation of preimplantation conceptus growth and galectin 15 (LGALS15) in the ovine uterus. **Biology of Reproduction**, v.75, p.289–296, 2006.

SCANZANI, M. **Expansão do cumulus oophorus de oócitos bovinos maturados in vitro na presença de fosfatidilcolina ou ácido linoleico conjugado**. Monografia - Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2013, 48p.

SCHAUFF, D.J.; CLARK, J.H. Effects of feeding diets containing calcium salts of long-chain fatty acids to lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.2990–3002, 1992.

SCHAUFF, D.J.; CLARK, J.H.; DRACKLEY, J.K. Effects of feeding lactating dairy cows diets containing extruded soybeans and calcium salts of long-chain fatty acids. **Journal of Dairy Science**, v.75, n. 11, p.3003-3019, 1992.

SCHAUFF, D.J.; ELLIOT, J.P.; CLARK, J.H. et al. Effects of feeding lactating dairy cows diets containing whole soybeans and tallow. **Journal of Dairy Science**, v.75, p. 1923-1935, 1992a.

SCHILLO, K.K. Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. **Journal of Animal Science**, v.70, p.1271–1282, 1992.

SEALS, R.C.; MATAMOROS, I.; LEWIS, G.S. Relationship between postpartum changes in 13, 14-dihydro-15-keto-pgf₂ α concentrations in holstein cows and their susceptibility to endometritis. **Journal of Animal Science**, v.80, p.1068–1073, 2002.

SHELDON, I.M.; CRONIN, J.G.; HEALEY, G.D.; GABLER, C.; HEUWIESER, W.; STREYL, D.; BROMFIELD, J.J.; MIYAMOTO, A.; FERGANI, C.; DOBSON, H. Innate immunity and inflammation of the bovine female reproductive tract in health and disease. **Reproduction**, v.148, p.41-51, 2014.

SHIMABUKURO, M.; WANG, M.Y.; ZHOU, Y.T.; NEWGARD, C.B.; UNGE, R.H. Protection against lipoapoptosis of β 2 cells through leptin dependent maintenance of bcl-2 expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.95, p.9558–9561, 1998.

SILVESTRE, F.T. **Nutraceutical and hormonal regulation of immunity, uterine health, and milk production of postpartum dairy cows**. Dissertation to the graduate school (Doctor of Philosophy) - University of Florida, Florida, 2008, 316p.

SILVESTRE, F.T.; CARVALHO, T.S.M.; CRAWFORD, P.C.; SANTOS, J.E.P.; STAPLES, C.R.; JENKINS, T.; THATCHER, W.W. Effects of differential supplementation of fatty acids during the peripartum and breeding periods of Holstein cows: II. Neutrophil fatty acids and function, and acute phase proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 2285–2301, 2011.

- SILVESTRE, F.T.; RISCO, C.A.; LOPEZ, M.; DE SA, M.J.S.; BILBY, T.R.; THATCHER, W.W. Use of increasing doses of a degradable deslorelin implant to enhance uterine involution in postpartum lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v.116, p.196–212, 2009.
- SILVESTRE, F.T.; CARVALHO, T.S.M.; FRANCISCO, N.; SANTOS, J.E.P.; STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W. Effects of Differential Supplementation of Calcium Salts of Fatty Acids (CSFAs) on Dairy Cows. **Journal. Dairy Science**, v.91, p.76, 2008a.
- SILVESTRE, F.T.; CARVALHO, CRAWFORD, C; SANTOS, J.E.P.; STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W. Effects of Differential Supplementation of Calcium Salts of Fatty Acids (CSFAs) to Lactating Dairy Cows on Plasma Acute Phase Proteins and Leukocyte Responses: Phagocytic and Oxidative Burst, CD62L and CD18 Expression and Cytokine Production. **Biology Reproduction**, p.158, 2008b.
- SILVESTRE, F.T. Nutraceutical and Hormonal Regulation of Immunity, Uterine Health, Fertility, and Milk Production of Postpartum Dairy Cows. Doctorate Dissertation. **Univ. of Florida**, Gainesville, 2008c.
- SKLAN, D., KAIM, M., MOALLEM, U. . Effect of dietary calcium soaps on milk yield, body weight, reproductive hormones, and fertility in first parity and older cows. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p.1652-1660, 1994.
- SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR, J.D.; VAN SOEST, P.S.; FOX, D. G.; RUSSEL, J.B.A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v.70, n.11, p.3562-3577, 1992.
- SPENCER, T.E.; BURGHARDT, R.C.; JOHNSON, G.A.; BAZER, F.W. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.537-550, 2004.
- STAPLES, C.R.; BURKE, J.M.; THATCHER, W.W. Optimizing energy nutrition for reproducing dairy cows: Influence of supplement fats on reproductive tissues and performance of lactating cow. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.856–871, 1998.
- STAPLES, C.R.; WILTBANK, M.C.; GRUMMER, R. R.; GUENTHER, J.; SARTORI, R.; DIAZ, F.J.; BERTICS, S.; MATTOS, S.; THATCHER, W.W. Effect of long chain fatty acids on lactation performance and reproductive tissues of Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.278, Supplement 1, 2000.
- STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W.; MATTOS, R. Fat supplementation strategies for lactating dairy cow diets. **In: Simpósio Internacional de Bovinocultura de Leite**, 2, 2001, lavras. Anais... Lavras:Ufla, p.161-178, 2001
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS**. SAS OnlineDoc. Version 9.1.4. Cary: SAS Institute, 2012. (CD-ROM).
- STENSON, W.F., CORT, D.; RODGERS, J.; BURAKOFF, R.; DESCHRYVER-KECKSKEMETI, K.; GRAMLICH, T.L.; BEEKEN, W. Dietary supplementation with fish oil in ulcerative colitis. **Annals of Internal Medicine**. v.116, p.609–614, 1992.

- STERN, M.D.; SANTOS, K.A.; SATTER, L.D. protein degradation in rumen and amino acid absorption in small intestine of lactating dairy cattle fed heat-treated whole soybeans. **Journal of Dairy Science**, v.68, n. 1, p.45-56, 1985.
- STRANG, B.D.; BERTICS, S.J.; GRUMMER, R.R. Effect of long-chain fatty acids on triglycerides accumulation, gluconeogenesis, and ureagenesis in bovine hepatocytes. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.728-739, 1998.
- SURIYASATHAPORN, W.; DAEMEN, A.J.J.M.; NOORDHUIZEN-STASSEN, E.N.; DIELEMAN, S.J.; NIELEN, M.; SCHUKKEN, Y.H. Betahydroxybutyrate levels in peripheral blood and ketone bodies supplemented in culture media affect the in vitro chemotaxis of bovine leukocytes. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.68, p. 177–186, 1999.
- SUTTER, F.; BEEVER, D.E. Energy and nitrogen metabolism in Holstein-Friesian cows during early lactation, **Animal Science**, v.70, p.503–514, 2000.
- SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Dukes - Fisiologia dos animais domésticos**. 11° ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 902 p, 1996.
- TAMMINGA, S.; LUTEIJN, P.A.; MEIJER, R.G.M. Changes in composition and energy content of liveweight loss in dairy cows with time after parturition. **Livestock Production Science**, v.52, p.31-38, 1997.
- TARAKTSOGLU, M.; SZALABSKA, U.; MAGEE, D.A.; BROWNE, J.A.; SWEENEY, T. Transcriptional profiling of immune genes in bovine monocyte-derived Macrophages exposed to bacterial antigens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.140, p.130–139, 2011.
- TARGOWSKI, S.P.; KLUCINSKI, D.V.M. Reduction in mitogenic response of bovine lymphocytes by ketone bodies. **Animal Journal of Veterinary Research**, v.44, p.828–830, 1983.
- THANGAVELU, G.; COLAZO, M.G.; AMBROSE, D.J.; OBA, M.; OKINE, E.K.; DYCK, M.K. Diets enriched in unsaturated fatty acids enhance early embryonic development in lactating Holstein cows. **Theriogenology**, v.68, p.949–957, 2007.
- THATCHER, W.W.; GUZELOGLU, A.; MEILKE, A.; KAMIMURA, S.; BILBY, T.; KOWASKI, A.A.; BADINGA, L.; PERSHING, R.; BATOLOME, J.; SANTOS, J.E. Regulation of embryo survival in cattle. **Reproduction Supplement**, v.61, p.253–266, 2003.
- THATCHER, W.W.; SILVESTRE, F.T.; SANTOS, J.E.P. Modulação nutricional da função imune para melhorar o desempenho reprodutivo em vacas leiteiras. **Anais XVI Curso Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos**. XVI Curso Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos, Uberlândia-SP, 2010.
- THATCHER, W.W.; SANTOS, J.E.P.; STAPLES, C.R. Dietary manipulations to improve embryonic survival in cattle. **Theriogenology**, v.76, p.1619–1631, 2011.
- TREBBLE, T.M.; WOOTTON, S.A.; MILES, E.A.; MULLEE, M.; ARDEN, N.K.; BALLINGER, A.B.; STROUD, M.A.; BURDGE, G.C.; CALDER, P.C. Prostaglandin

E2 production and T-cell function after fish-oil supplementation: response to antioxidant co-supplementation. **Animal Journal Clinical Nutrition**, v.78, p.376-382, 2003.

THIES, F.; PETERSON, L.D.; POWELL, J.R.; NEBE-VON-CARON, G.; HURST, T.L.; MATTHEWS, K.R.; NEWSHOLME, E.A.; CALDER, P.C. Manipulation of the type of fat consumed by growing pigs affects plasma and mononuclear cell fatty acid compositions and lymphocyte and phagocyte functions. **Journal Animal Science**, v.77, p.137-47, 1999.

TIZARD, I. R. **Veterinary immunology: an introduction**. 9. ed. Londres; Elsevier, 2014, 574 p.

UEDA, K.; FERLAY, A.; CHABORT, J.; LOOR, J.J.; CHILLIARD, Y.; DOREAU, M. Effect of linseed oil supplementation on ruminal digestion in dairy cows fed diets with different forage:concentrate ratios. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.3999–4007, 2003.

VAN HERPEN, N.A.; SCHRAUWEN-HINDERLING, V.B. Lipid accumulation in non-dipose tissue and lipotoxicity. **Physiology & Behavior**, v.94, p.231–241, 2008.

VAN KNEGSEL, A.T.M.; VAN DEN BRAND H.; DIJKSTRA, J.; VAN STRAALLEN, W.M.; HEETKAMP, M.J.; TAMMINGA, S.; KEMP, B. Dietary energy source in dairy cows in early lactation: energy partitioning and milk composition. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p.1467–1476, 2007.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3583, 1991.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. Comstock Publ. Assoc. Ithaca, 476 p, 1994.

VANDEHAAR, M.J.; YOUSIF, G.; SHARMA, B.K.; HERDT, T.H.; EMERY, R.S.; ALLEN, M. S.; LIESMAN, J. S. Effect of energy and protein density of prepartum diets on fat and protein metabolism of dairy cattle in the periparturient period. **Journal of Dairy Science**, v.82, n.6, p.1282-1295, 1999.

VARGAS L.H.; LANA, R.P.; JHAM, G.N. et al. Adição de lipídios na ração de vacas leiteiras: parâmetros fermentativos ruminais, produção e composição do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.1, p.522-529, 2002.

VAZQUEZ-ANON, M.; BERTICS, S.; LUCK, M.; GRUMMER, R.R. Peripartum liver triglyceride and plasma metabolites in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.77, p.1521-1528, 1994.

VEERKAMP, R.F.; OLDENBROEK, J.K.; VAN DER GAAST, H.J.; VAN DER WERF, J.H.J. Genetic correlation between days until start of luteal activity and milk yield, energy balance, and live weights. **Journal Dairy Science**, v.83, p.577–583, 2000.

VENTURELLI, B.C.; ARAÚJO, A.P.C.; GANDRA, J.R.; SANTOS, M.C.B.; GARDINAL, R.; VENDRAMINI, T.H.A.; RENNÓ, F.P. Produção e composição do leite de vacas leiteiras alimentadas com altos níveis de grão de soja cru e integral. In:

REUNIÓN ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA DE PRODUCCIÓN ANIMAL, 22, 2011, Montevideo. Anais...Montevideo: ALPA, p.67, 2011.

VENTURELLI, B.C.; FREITAS JÚNIOR, J.E.; TAKIYA, C.S.; ARAÚJO, A.P.C.; SANTOS, M.C.B.; CALOMENI, G.D.; GARDINAL, R.; VENDRAMINI, T.H.A.; RENNÓ, F.P. Total tract nutrient digestion and milk fatty acid profile of dairy cows fed diets containing different levels of whole raw soya beans. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.99, p.1149-1160, 2015.

WALSH, S.W.; WILLIAMS, E.J.; EVANS, A.C.O. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v.123, p.127-138, 2011.

WATANABE, M.R.; LÔBO, R.B.; FRANCESCHINI, P.H.; DAYAN, A.; VILA, R.A.; GALERANI, M. A. V.; WATANABE, Y. F. Embryo in vitro production per session of follicular aspiration in Nelore cows. **Arquivos Faculdade Veterinária UFRGS**, v.26, p.383-392, 1998.

WATSON, A.J.; WATSON, P.H.; ARCELLANA-PANLILIO, M.; WARNES, D.; WALKER, S.K.; SCHULTZ, G.A.; ARMSTRONG, D.T.; SEAMARK, R.F. A growth factor phenotype map for ovine preimplantation development. **Biology Reproduction**, v.50, p.725-733, 1994.

WATTS, J.S.; REZAMAND, P.; SEVIER, D.L.; PRICE, W.; MCGUIRE, M.A. Short-term effects of dietary trans fatty acids compared with saturated fatty acids on selected measures of inflammation, fatty acid profiles, and production in early lactating Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.96, p.6932-6943, 2013.

WEBER, P. S. D.; MADSEN, S. A.; SMITH, G. W.; IRELAND, J. J.; BURTON, J. L. Pre- translational regulation of neutrophil CD62L in glucocorticoid-challenged cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 83, p.213-240, 2001.

WEHRMAN M.E.; WELSH JR, T.H.; WILLIAMS, G.L. Diet-induced hyperlipidemia in cattle modifies the intrafollicular cholesterol environment, modulates ovarian follicular dynamics, and hastens the onset of postpartum luteal activity *Biology of Reproduction* **Journals of Reproduction and Fertility**, p.514-522, 1991.

WEISS, W. Energy prediction equations for ruminant feeds. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURERS. **Proceedings...** Ithaca: Cornell University, p.176-185, 1999.

WILDMAN, E. E.; JONES, G. M.; WAGNER, P. E. A dairy cow body condition system and its relationship to selected production characteristics. **Journal of Dairy Science**, v. 65, n.3, p.495-501, 1982.

WU, Z.; HUBER, J. T. Relationship between dietary fat supplementation and milk protein concentration in lactating cows: a review. **Livestock Production Science**, v. 39, p. 141-155, 1993.

WU, Z.; HUBER, J. T.; CHAN, S. C.; SIMAS, J. M.; CHEN, K. H.; VARELA, J. G.; SANTOS, C.; FONTES JR., C.; YU, P. Effect of source and amount of supplemental

fat on lactation and digestion in cows. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 1644-1651, 1994.

WU, L.L.; DUNNING, K.R.; YANG, X.; RUSSELL, D.L.; LANE, M.; NORMAN, R.J.; ROBKER, R. L. High-fat diet causes lipotoxicity responses in cumulus-oocyte complexes and decreased fertilization rates. **Endocrinology**, v. 151, p.5438-5445, 2010.

YAQOOB, P.; PALA, H.S.; CORTINA-BORJA, M.; NEWSHOLME, E.A.; CALDER, P.C. Encapsulated fish oil enriched in alpha-tocopherol alters plasma phospholipid and mononuclear cell fatty acid compositions but not mononuclear cell functions. **European Journal of Clinical Investigation**, v.30, p.260-74, 2000.

ZACHUT, M.; ARIELI, A.; LEHRER, H.; LIVSHITZ, L.; YAKOBY, S.; MOALLEM, U. Effects of increased supplementation of n-3 fatty acids to transition dairy cows on performance and fatty acid profile in plasma, adipose tissue, and milk fat. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p.5877–5889, 2010a.

ZACHUT, M.; DEKEL, I.; LEHRER, H.; ARIELI, A.; ARAV, A.; LIVSHITZ, L.; YAKOBY, S.; MOALLEM, U. Effects of dietary fats differing in n-6:n-3 ratio fed to high-yielding dairy cows on fatty acid composition of ovarian compartments, follicular status, and oocyte quality. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p.529–545, 2010b.

ZACHUT, M.; HONIG, H.; STRIEM, S.; ZICK, Y.; BOURA-HALFON, S.; MOALLEM, U. Periparturient dairy cows do not exhibit hepatic insulin resistance, yet adipose-specific insulin resistance occurs in cows prone to high weight loss. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 5656–5669, 2013.

ZERON, Y.; SKLAN, D.; ARAV, A. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.61, p. 271–278, 2002.

ZOLA, H.; SWART, B.; BANHAM, A.; BARRY, S.; BEARE, A.; BENSUSSAN, A.; BOUMSELL, L.D.; BUCKLEY, C.; BÜHRING, H.J.; CLARK, G.; ENGEL, P.; FOX, D.; JIN, B.Q.; MACARDLE, P.J.; MALAVASI, F.; MASON, D.; STOCKINGER, H.; YANG, X. CD molecules 2006 - human cell differentiation molecules. **Journal Immunology Methods**. v.318 (1–2), p.1–5, 2007.