JEFFERSON RODRIGUES GANDRA

Fontes de ácidos graxos ω 3 e ω 6 em dietas de vacas leiteiras no período de transição e início de lactação

Pirassununga

2012

JEFFERSON RODRIGUES GANDRA

Fontes de ácidos graxos ω 3 e ω 6 em dietas de vacas leiteiras no período de transição e início de lactação

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 m Ciências

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de Concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Francisco Palma Rennó

Pirassununga
2012

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.2732 FMVZ

Gandra, Jefferson Rodrigues

Fontes de ácidos graxos ω 3 e ω 6 em dietas de vacas leiteiras no período de transição e início de lactação / Jefferson Rodrigues Gandra. -- 2012.

170 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2012.

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. Função imune. 3. Período de transição. 4. Qualidade embrionária. 5. Vacas leiteiras. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeito da suplementação de ácidos graxos insaturados sobre o desempenho produtivo, qualidade oocitária e embrionária em vacas leiteiras no período de transição e início de lactação", utilizando 36 (trinta e seis) bovinos, protocolado sob o nº1783/2009, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Antonio Visintin, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 14/10/09.

We certify that the Research "Effect of supplementation of unsaturated fatty acids on the performance, oocyte and embryo quality in dairy cows during the transition period and early lactation", utilizing 36 (thirty six) bovine, protocol number 1783/2009, under the responsibility Prof. Dr. José Antonio Visintin, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/14/09.

São Paulo, 16 de outubro de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55 11 3091-7671/7676

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: GANDRA, Jefferson Rodrigues

Título: Fontes de ácidos graxos ω 3 e ω 6 em dietas de vacas leiteiras no período de transição e início de lactação

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: 14 / 12 / 2012

Banca Examinadora

Prof. Dr.: Francisco Palma Rennó

Instituição: FMVZ - USP Julgamento: Aprovado

Prof. Dr.: Luis Felipe Prada e Silva

Instituição: FMVZ - USP Julgamento: APROVADO

Prof. Dr.: José Antonio Visintin

Instituição: FMVZ - USP Julgamento: Aprovado

Prof. Dr.: Arlindo Saran Neto

Instituição: FZEA - USP Julgamento: APROVADO

Prof. Dr.: Anselmo Domingos Fernandes Santos

Instituição: UFS Julgamento: APROVADO

DEDICATÓRIA

Ao Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em nome de todos os seus professores, funcionários e alunos de pós-graduação, onde passei 6 anos de minha vida, onde tenho o privilégio de ser o primeiro aluno a ser Mestre e Doutor, onde aprendi realmente o valor do trabalho e do profissionalismo

A minha esposa Érika e minha filha Júlia:

"Eu não achei outra flor
Com a beleza e a cor
Que tem você para mim
Deus fez a terra e o céu
Fez você e o seu mel
E me fez só pra te amar"

Dedico este trabalho do fundo de minha'lma

AGRADECIMENTOS

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;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento desta 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;

A minha esposa Érika e minha filha Júlia, por sempre estarem presentes ao meu lado, mesmo estando tão longe;

A todos os estudantes e funcionários do grupo de Pesquisa do Laboratório de Pesquisa em Bovinos Leiteiros da FMVZ USP;

A todos os professores do Departamento de Nutrição Animal, com quem tive o prazer de conviver ao longo destes 6 anos;

A todos os funcionários do Departamento de Nutrição Animal, com quem tive o prazer de conviver ao longo destes 6 anos;

Aos amigos Milton Maturana Filho, Rafael Villela Barletta, Elmesson Ferreira de Jesus, Gustavo Fereira de Almeida, Pablo Gomes de Paiva e Caio Seiti Takiya, pela convivência e amizade ao longo deste anos;

Ao Labóratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento FZEA –USP, sob responsabilidade do Professor Dr. Flávio Vieira Meirelles, em especial a Dra. Lilian J. Oliveira e Gustavo Morandini, estudante de graduação FZEA –USP, pela realização das análises de imunologia;

A empresa ***In Vitro*** pela realização das aspirações foliculares e manipulação dos embriões utilizados neste projeto;

Aos pós graduandos Lenita Camargo Verdurico e Rodolfo Daniel Mingoti por sempre estarem comigo ao logo de todo o período experimental;

Aos pós graduandos Rafael Villela Barletta, Vitor Pereira Bettero, Elmesson Ferreira de Jesus e Gustavo Ferreira de Almeida, Tiago Antônio Dell Vale Rodrigo Gardinal e Gustavo Delfino Calomeni pela ajuda em momentos cruciais condução do experimento;

A Dra Taíssa Canaes e as pós graduandas Lenita Camargo Verdurico e Cybelle Emília de Araújo pela imprescindível ajuda nas análises bioquímicas;

Ao caro Amigo Dr. José Esler de Freitas Junior pela imprescindível ajuda em momentos críticos das análises e escrita deste trabalho;

Aos pós graduando Filipe Zanferari pela primordial ajuda nas análises bromatológicas;

As alunas de Iniciação Científica Vanessa Lacuna, Karim Koyama e Bruna Benevento pela ajuda no processamento e análises das amostras de campo;

Em especial ao aluno de iniciação científica Caio Seiti Takyia por sempre, sempre estar ao meu lado trabalhando desde o começo ao fim deste trabalho, em todas as fases de realização deste trabalho;

A todos que ajudaram direta ou indiretamente a realização deste trabalho meus sinceros agradecimentos.

“Eu não procuro saber as respostas, procuro compreender as perguntas”.

Confúcio

“*Qui nihil remanet impossibile*”.

Alexander Magnus 356 a.C a 323 a.C

Veni,Vidi, Vici

Caius Julius Caesar 100 a.C. a 44 a.C.

"E mesmo que meus passos, sejam falsos, mesmo que os meus caminhos sejam errados, mesmo que meu jeito de levar a vida te incomoda, eu sei quem sou, e sei pelo que devo lutar, se você acha que meu orgulho é grande, é porque nunca viu o tamanho da minha FÉ!"

Tião Carreiro

RESUMO

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.** [Sources of fatty acid ω3 and ω6 in dairy cows diets during the transition period and early lactation]. 2012. 170 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

Objetivou-se avaliar a influencia da suplementação de ácidos graxos ω3 e ω6, sobre desempenho produtivo, perfil metabólico, qualidade oocitária e embrionária, função imune em vacas leiteiras no período de transição e inicio de lactação. Foram selecionadas 42 vacas da raça holandesa, multíparas e gestantes, com parto previsto para 35 dias após o início da avaliação e fornecimento das dietas experimentais. As vacas foram alojadas em estábulo tipo "free-stall", providos de baias individuais. Os animais foram distribuídos aleatoriamente para receber uma das quatro dietas experimentais fornecidas a partir de 35 dias antes da data prevista para o parto até 84 dias do pós-parto: controle (n=11) (C): dieta sem adição de gordura; semente de linhaça (n=10) (SL): inclusão de 60 a 80 g/kg de MS (fonte de ômega 3); grão de soja cru e integral (n=11) (GS): inclusão de 120 a 160 g/kg de MS (fonte de ômega 6); sais de cálcio de ácidos graxos insaturados (n=11) (SC): inclusão de 24 a 32 g/kg de MS (fonte de ômega 6). As dietas experimentais tiveram a mesma concentração de ácidos graxos insaturados, porém o perfil de ácidos graxos das fontes foi diferente. 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 -20ºC. 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 -28, -14, 21, 42 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 foram coletados amostras semanalmente e analisadas a fresco. Amostras de sangue foram coletadas nos dias -21, -14, -7, parto (até 24 horas), 7, 14, 21, 42 e 84 dias em relação ao parto, a fim de mensuração a concentração dos metabólitos plasmáticos e função imune. O scaneamento das estruturas ovarianas por ultrassonografia foi realizada do 14º ao 72º dia de lactação a fim de analisar a dinâmica folicular dos animais. Aspirações foliculares foram realizadas nos dia 35±7 e 65±7, com o objetivo de avaliar a quantidade e qualidade oocitária e embrionária, por fertilização*" in vitro"*. Foi observado maior CMS para a dieta SL

em relação às dietas GS e SC no pré-parto. No pós-parto não foi observado diferenças no CMS. Foi observado maior consumo de EE para as dietas SL, GS e SC no pré e pós-parto em relação à dieta C. Não foi observado diferença na digestibilidade da matéria seca no pré e pós-parto entre as dietas experimentais. Foi obtido maior digestibilidade do EE para a dieta SL em relação às dietas GS e SC no pós-parto. Não foi observada diferença no balanço de energia no pré-parto. No entanto no período pós-parto foi observado melhor balanço de energia para as dietas SL, GS e SC em relação à dieta C. Não foi observada diferença para o balanço de nitrogênio nos períodos pré e pós-parto entre as dietas avaliadas. Foi observado maior teor e produção de gordura no leite para a dieta GS em relação às dietas SL e SC, porém não foi observado diferença para a produção de leite entre as dietas experimentais. No perfil de ácidos graxos do leite foi obtido maior concentração de $C_{18:\ 1\ trans}$ e CLA $_{cis\text{-}9\ trans\text{-}11}$ para a dieta SC em relação as demais dietas experimentais, maior concentração de $C_{18:2}$ para a dieta GS e SC em relação a dieta SL e $C_{18:3}$ para a dieta SL em relação as dietas GS e SC. Não foi observada diferença no escore de condição corporal e peso corporal no pré e pós-parto. Foi observada maior concentração de glicose no pré e pós-parto para a dieta SL em relação às dietas GS e SC. Foi observado maior concentração de colesterol total para as dietas SL, GS e SC em relação a dieta C no pós-parto. Não foi observadas diferenças nas concentrações de ácidos graxos não esterificados e β-hidroxibutirato no pré e pós-parto. Foi observado menor número total de folículos e folículos de classe1 para a dieta C em relação as dietas SL, GS e SC. Foi observado maior número de oócitos viáveis na aspiração dos 65±7 dias em relação a dos 35±7 dias de lactação. Foi obtido maior número e porcentagem de embriões viáveis para a dieta SL em relação às dietas GS e SC. Foi observada maior porcentagem de leucócitos e monócitos positivos a fagocitose para as dietas SL, GS e SC em relação à dieta C, no pré e pós-parto, para os neutrófilos no pré e pós-parto e monócitos no pós-parto foi observado maior porcentagem de células positivas para a dieta SL em relação às dietas SC e GS. Foi observado maior expressão das células de adesão $CD4^+$, $CD8^+$, $CD25^+$ e CD62L para as dietas SL, GS e SC em relação as dieta C, para o $CD14^+$ foi observado maior expressão para as dietas GS e SC em relação à dieta SL. A suplementação de ácidos graxos ω3 e ω6 melhorou o balanço energético, e não influenciou negativamente os parâmetros produtivos, melhorou a qualidade oocitária e embrionária, bem como a função imune de imune de vacas leiteiras em período de transição e inicio de lactação.

Palavras-chave: Ácidos graxos. Função imune. Período de transição. Qualidade embrionária. Vacas leiteiras.

ABSTRACT

GANDRA, J. R. **Sources of fatty acid ω3 and ω6 in dairy cows diets during the transition period and early lactation** [Fontes de ácidos graxos ω 3 e ω 6 em dietas de vacas leiteiras no período de transição e início de lactação]. 2012. 170 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

The objective was to evaluate the influence of ω3 and ω6 fatty acid supplementation, on productive performance, metabolic profile, oocyte and embryo quality, immune system function in dairy cows during the transition period and early lactation. Were selected forty-two Holstein cows, and multiparous pregnant with calving provided for 35 days after the beginning of the evaluation and supply of experimental diets. The cows were housed in stable type "free-stall", provided with individual stalls. The animals were randomly assigned to one of four experimental treatments provided from 35 before the expected date of calving up to 84 days postpartum: control (n = 11) (C) diet without added fat; flaxseed whole (n = 10) (FW): inclusion of 60 to 80 g / kg DM (source of omega 3); whole raw soybean raw (n = 11) (WS) including 120-160 g / kg MS (source of omega 6), calcium salts of insatured fatty acids (n = 11) (CS): inclusion 24-32 g / kg DM (source of omega 6). The experimental diets had the same concentration of unsaturated fatty acids, but the fatty acid profile of the sources was different. The animals were fed according to the dry matter intake the day before, so as to be maintained orts a percentage of the diet every day, between 5 and 10%. Samples of feeds and orts were collected daily and stored at -20 º C. Weekly samples were collected daily mixed and a sample was taken corresponding to a period of a week in order to measure the intake of dry matter and nutrients. Feces samples were collected on days -28, -14, 21, 42 and 84 days in relation at calving, in order to measure the digestibility of dry matter and nutrients. Milk yield was measured daily and the composition of fat, protein and lactose samples were collected weekly and analyzed fresh. For the fatty acid profile of milk samples were collected weekly and were grouped for analysis of the week 1-3, 4-6, 7-9, 10-12, totaling 4 points of analysis. The measurement of body weight and body condition score were measured weekly. Blood samples were collected on days -21, -14, -7, calving (+24 hours), 7, 14, 21, 42 and 84 days in relation at calving in order to measure the concentration of plasma metabolites and immune function. The scanning of ovarian structures by ultrasonography was performed from 14th to 72nd day of lactation in order to analyze the dynamics of follicular animals. Follicular aspirations were performed on day 35 ± 7 and 65 ± 7, in order to assess the quantity and

quality oocyte and embryo by fertilization "in vitro". It was observed higher DMI for the diet FW in relation to CS and WS diets pre-partum. Postpartum was not observed differences in DMI. It was observed higher intake of fat to the FW, WS and CS in the pre and postpartum compared to C diet. There was no difference in dry matter digestibility in pre-and postpartum. It was obtain the highest digestibility of fat to the diet FW in relation to WS and CS diets postpartum. There was no difference in the balance of energy in prepartum. Postpartum was observed better energy balance for diets FW, WS and CS in relation to the C diet. No differences were observed for nitrogen balance in the pre-and postpartum between diets evaluated. It was observed a higher content and yield of milk fat for diet WS in relation to FW and CS, but no difference was observed for milk yield. In the fatty acid profile of milk was obtained higher concentration of $C_{18:\ 1\ trans}$ and CLA $_{cis\text{-}9\ trans\text{-}11}$ for diet CS in relation the others and higher concentration of C18: 2 for diet WS and CS in relation FW and and C18: 3 for FW diet in relation diets WS and CS. There was no difference in body condition score and body weight in pre-and postpartum. Higher value was observed of glucose in the pre and postpartum diet for FW in relation to CS and WS. It was observed higher concentrations of total cholesterol to the diets FW, WS and CS in relation to Cl diet in postpartum. There was no difference in concentrations of nonesterified fatty acids and β-hydroxybutyrate in pre and postpartum. It was observed a shorter total number of follicles and follicles class1 to the C diet compared with diets FW, WS and CS. It was observed a higher number of viable oocytes in aspiration of 65 ± 7 days compared to the 35 ± 7 days of lactation. Obtained the highest number and percentage of viable embryos for FW diet compared to diets CS and WS. There was a higher percentage of leukocytes and monocytes positive for phagocytosis for diets FW, WS and CS compared to the C diet, in pre and postpartum, for neutrophils in pre and postpartum and postpartum monocytes was observed higher percentage of positive cells for FW diet compared to diets CS and WS. It was observed increased expression of cell adhesion CD4 +, CD8 +, CD25 + and CD62L for diets FW, WS and CS in relation to the C diet. For CD14 + was observed increased expression for diets WS and CS in relation to diet FW. The fatty acid supplementation ω3 and ω6 improved energy balance, and did not influence the performance, improved oocyte and embryo quality and immune function of dairy cows in the transition period and early lactation.

Keywords: Dairy cows. Fatty acids. Embryo quality. Immune function. Transition period.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição químico-bromatológica dos ingredientes 59

Tabela 2 - Composição percentual dos concentrados experimentais. 59

Tabela 3 - Composição químico-bromatológica, analisada dos concentrados experimentais. 60

Tabela 4 - Composição percentual das dietas experimentais. 61

Tabela 5 - Composição químico-bromatológica, das dietas experimentais. 62

Tabela 6 - Médias (± EPM) do consumo de matéria e nutrientes no período pré e pós-parto de acordo com as dietas experimentais. 77

Tabela 7 - Média (±EPM) da digestibilidade aparente total da matéria seca e nutrientes no período pré e pós-parto de acordo com as dietas experimentais 87

Tabela 8 - Média (±EPM) do balanço de energia de acordo com as dietas experimentais. . 91

Tabela 9 - Média (±EPM) do balanço de nitrogênio de acordo com as dietas experimentais. 97

Tabela 10 - Média (±EPM) da produção e composição do leite de acordo com as dietas experimentais. 103

Tabela 11 - Média (±EPM) do perfil de ácidos graxos do leite de acordo com as dietas experimentais. 111

Tabela 12 - Média (±EPM) do peso corporal (PC), escore de condição corporal (ECC) e mudança de peso corporal (MPC) no período pré e pós-parto de acordo com as dietas experimentais. 114

Tabela 13 - Média (±EPM) dos parâmetros sanguíneos nos períodos pré e pós-parto, de acordo com as dietas experimentais. 120

Tabela 14 - Média (±EPM) da dinâmica folicular de acordo com as dietas experimentais.126

Tabela 15 - Médias (±EPM) da qualidade oocitária e embrionária em função das dietas experimentais. 130

Tabela 16 - Média (±EPM) das células positivas para fagocitose e intensidade da fagocitose de acordo com as dietas experimentais 135

Tabela 17 - Média (±EPM) da expressão das células de adesão de acordo com as dietas experimentais. 144

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Consumo de matéria seca (kg/dia) (A) e % peso vivo (B), nos períodos pré e pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3).....80

Figura 2 - Consumo extrato etéreo (A) e fibra em detergente neutro (B), nos períodos pré e pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3).....81

Figura 3 - Consumo carboidratos não fibrosos (A) e nutrientes digestíveis totais (B), nos períodos pré e pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3).....82

Figura 4 - Coeficiente de digestibilidade da matéria seca (A), da proteína bruta (B), nos períodos pré e pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3).....88

Figura 5 - Coeficiente de digestibilidade do extrato etéreo (A), da fibra em detergente neutro (B), nos períodos pré e pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3). 89

Figura 6 - Balanço de energia (A) consumo de EL_L (B), nos períodos pré e pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3).....93

Figura 7 - Produção de EL_L (A), eficiência de utilização da EL_L (B) ao longo da lactação de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3).....94

Figura 8 - Nitrogênio absorvido (A) nitrogênio retido (B), nos perídos pré e pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3). 99

Figura 9 - Nitrogênio no leite (A) eficiência de utilização do nitrogênio para a produção de leite (B), no pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3)..... 100

Figura 10 - Produção de leite (A) produção de leite corrigida (B), no pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3). 105

Figura 11 - Teor gordura (A) produção de gordura (B), no pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3). 106

Figura 12 – Teor de proteína (A) produção de proteína (B), no pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3). 107

Figura 13 - Concentração de C18:1*trans-11* (A) CLA cis-9 trans-11 (B), no período pós-parto de acordo com as dietas experimentais Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3). 112

Figura 14- Concentração de $C_{18:2}$ (A) $C_{18:3}$ (B), no período pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3). 113

Figura 15 - Peso corporal nos períodos pré e pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3). 115

Figura 16 - Mudança de peso corporal (A) e escore de condição corporal (B) nos períodos pré e pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3). 116

Figura 17 - Concentração de glicose (A) colesterol total (B), no pré e pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3). 123

Figura 18 - Ácidos graxos não esterificados (A) e β-hidroxibutirato (B) no pré e pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3). 124

Figura 19 - Número total de folículos scaneados por ultrassonografia agrupados por período ao longo da lactação. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3). 127

Figura 20 - Total de oócitos (A) oócitos viáveis (B), no período de lactação de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3). 132

Figura 21 - Oócitos degenerados (A) e embriões viáveis (B) no período de lactação de acordo com as dietas experimentais Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3)..... 133

Figura 22 - Leucócitos positivos (A) e monócitos positivos (B) no pré e pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3)..... 137

Figura 23 - Neutrófilos positivos (A) e leucócitos MFI (B) nos perídos pré e pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3). 139

Figura 24 - Monócitos MFI (A) e neutrófilos MFI (B) no pré e pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3) 141

Figura 25 - Adesão celular $CD4^+$ (A) e $CD8^+$ (B) no pré e pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3). 145

Figura 26 - Adesão celular $CD25^+$(A) e $CD62L^+$(B), no pré e pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3). 147

ABREVIAÇÕES

MS	Matéria Seca
MO	Matéria orgânica
PB	Proteína bruta
EE	Extrato etéreo
CNF	Carboidrato não fibroso
CMS	Consumo de matéria seca
CDMS	Coeficiente de digestibilidade da matéria seca
BE	Balanço de energia
$BE_{(nadir)}$	Balanço de energia no ponto mais negativo do balanço de energia
DEL	Dias em lactação
SL	Dieta experimental semente de linhaça
GS	Dieta experimental grão de soja cru e integral
SC	Dieta experimental sais de cálcio de ácido graxo
SCAG	Sais de cálcio de ácido graxo
SCAGi	Sais de cálcio de ácido graxo insaturado
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade
OPU	Aspiração folicular
CD	Cluster of differentiation

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL 23

2 HIPOTESE 24

3. OBJETIVOS 25

4 REVISÃO DE LITERATURA 26

4.1 PERÍODO DE TRANSIÇÃO E INÍCIO DE LACTAÇÃO EM VACAS LEITEIRAS 26

4.2 NUTRIÇÃO E ALIMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS NO PERÍODO DE TRANSIÇÃO E INÍCIO DE LACTAÇÃO 29

4.3 FONTES DE ÁCIDOS GRAXOS ω3 E ω6 NA ALIMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS 30
4.3.1 Sais de cálcio de ácidos graxos 31
4.3.2 Grão de soja 32
4.3.3 Semente de linhaça 35

4.4 INFLUÊNCIA DOS ÁCIDOS GRAXOS DA FAMÍLIA ω3 E ω6 NO DESEMPENHO PRODUTIVO DE VACAS LEITEIRAS NO PERÍODO DE TRANSIÇÃO E INÍCIO DE LACTAÇÃO 36
4.4.1 Consumo e digestibilidade da matéria seca e nutrientes 36
4.4.2 Produção, composição e perfil de ácidos graxos do leite 39
4.4.3 Perfil metabólico 41
4.4.4 Balanço de energia e nitrogênio 43

4.5 INFLUENCIA DOS ÁCIDOS GRAXOS ω3 E ω6 NA QUALIDADE OOCITÁRIA E EMBRIONÁRIA DE VACAS LEITEIRAS NO PERRÍODO DE TRANSIÇÃO E INÍCIO DE LACTAÇÃO 46
4.5.1 Qualidade oocitária 47
4.5.2 Qualidade de embriões 49
4.5.3 Dinâmica folicular 50

4.6 INFLUENCIA DOS ÁCIDOS GRAXOS ω3 e ω6 SOBRE A FUNÇÃO IMUNE DE VACAS LEITEIRAS NO PERÍODO DE TRANSIÇÃO E INICIO DE LaCTAÇÃO .. 51
4.6.1 Fagocitose 53
4.6.2 Adesão celular 54

5 MATERIAL E MÉTODOS 57

5.1 ANIMAIS E INSTALAÇÕES 57

5.2 DIETAS EXPERIMENTAIS E ANÁLISE DE ALIMENTOS 57

5.3 DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL 62
5.4 BALANÇO DE ENERGIA 63
5.5 BALANÇO DE NITROGÊNIO 64
5.6 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE 65
5.7 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE 65
5.8 AVALIAÇÃO DO ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL E PESO CORPORAL 66
5.9 METABÓLITOS PLASMÁTICOS 67
5.10 DINÂMICA FOLICULAR 67
5.11 QUALIDADE OOCITÁRIA E EMBRIONÁRIA 68
5.12 FAGOCITOSE E ADESÃO CELULAR 71
5.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS 73
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO 75
6.1 CONSUMO DE MATÉRIA SECA E NUTRIENTES 75
6.2 DIGESTIBILIDADE DA MATÉRIA SECA E NUTRIENTES 83
6.3 BALANÇO DE ENERGIA 90
6.4 BALANÇO DE NITROGÊNIO 95
6.5 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE 101
6.6 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS NO LEITE 108
6.7 PESO E ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL 114
6.8 PARÂMETROS SANGUÍNEOS 118
6.9 DINÂMICA FOLICULAR 125
6.10 QUALIDADE OOCITÁRIA E EMBRIONÁRIA 128
6.11 FAGOCITOSE (CÉLULAS POSITIVAS E INTENSIDADE) 134
6.12 CÉLULAS DE ADESÃO 142
7 CONCLUSÕES 148
8 REFERÊNCIAS 149

1 INTRODUÇÃO GERAL

As umdanças metabólicas que regem a fisiologia das vacas leiteiras no período de transição (-21 a +21 dias em relação ao parto) são de suma importância para a compreensão dos eventos subsequentes do desempenho produtivo e reprodutivo dos animais ao longo da lactação. As ações tomadas neste período podem refletir o melhor ou pior desempenho das vacas na lactação que está se iniciando.

Pensando em melhorar a condição metabólica das vacas, atenuando o balanço energético negativo, diversas estratégias nutricionais e de manejo são sugeridas a fim de proporcionar aos animais melhor status produtivo, reprodutivo e imune. Dentro desta ótica as fontes de ácidos graxos ω3e ω6 têm grande destaque como agentes nutraceuticos capazes de modular positivamente a reprodução e imunidade das vacas leiteiras no período de transição e inicio de lactação, consequentemente melhorando o desempenho produtivo dos animais.

Os ácidos graxos ω3 e ω6 tem grande influencia na fisiologia reprodutiva de vacas leiteiras, podendo regular a síntese de prostaglandinas dentro de diferentes estágios da lactação. No puerpério os ácidos graxos ω6 parecem ter a capacidade de aumentar a síntese de PGF2α, contribuindo com a involução uterina e a volta a ciclicidade. Por outro lado os ácidos graxos ω3 parecem atuar no período de serviço reduzindo a síntese de prostaglandina uterina, proporcionando um ambiente uterino mais favorável para a implantação e manutenção da gestação. Estes mesmos ácidos graxos parecem atuarem como mediadores de reações do sistema imune atuando na síntese, expressão e quimiotaxia de moléculas que aumentam atividade e poder de fagocitose de leucócitos, monócitos/macrófagos e neutrófilos. Nesta esfera de raciocínio é altamente desejável verificar a influencia destas fontes de ácidos graxos ω6 e ω3 no metabolismo de vacas leiteiras no período de transição e inicio de lactação.

2 HIPOTESE

A suplementação de ácidos graxos ω3 e ω6 não prejudica o desempenho produtivo, melhora a qualidade oocitária e embrionária e o sistema imune de vacas leiteiras no período de transição e início de lactação.

3. **OBJETIVOS**

O objetivo deste estudo foi avaliar a suplementação de ácidos graxos ω6 e ω3 sobre o desempenho produtivo, reprodutivo e função imune de vacas leiteiras no período de transição e início de lactação.

Os objetivos específicos na avaliação do desempenho produtivo foram:

Consumo de matéria seca e nutrientes
Digestibilidade da matéria seca e nutrientes
Balanço de energia
Balanço de nitrogênio
Produção e composição do leite
Perfil de ácido graxo no leite
Escore de condição corporal e peso corporal
Perfil metabólico

Os objetivos específicos na avaliação do desempenho reprodutivo foram:

Dinâmica folicular
Qualidade oocitária e embrionária

Os objetivos específicos na avaliação da função imune foram:

Fagocitose de células no sistema imune
Expressão de células de adesão do sistema imune

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 PERÍODO DE TRANSIÇÃO E INÍCIO DE LACTAÇÃO EM VACAS LEITEIRAS

O período de transição ou periparto em vacas leiteiras é considerado o período de tempo compreendido das últimas três semanas anteriores ao parto até as três primeiras semanas de lactação (GRUMMER, 1995). O início de lactação é caracterizado como sendo os primeiros 90 dias de lactação após o parto, existindo variações entre autores, que consideram até o 100 ou 120º dia após o parto em algumas situações. Desta forma, o início de lactação abrange a parte do período de transição onde as vacas estão em lactação e os dias subsequentes até o 90º dia após o parto.

Esse período é caracterizado por grandes mudanças nas demandas de nutrientes no organismo da vaca leiteira, sendo necessárias coordenadas alterações no metabolismo animal para atender suas exigências nutricionais (BELL, 1995). Após o parto, a produção de leite e o consumo de alimentos aumentam consideravelmente em vacas leiteiras. No entanto, a velocidade de aumento na produção de leite é maior do que a velocidade de aumento de consumo de alimentos e, consequentemente, de nutrientes (TAMMINGA; LUTEIJN; MEIJER, 1997).

Em função da assincronia entre a demanda e a disponibilidade de nutrientes, vacas leiteiras são submetidas a períodos de balanço negativo de nutrientes, principalmente energia, proteína e cálcio, no final da gestação e no início da lactação (BELL, 1995). Para atender a esse estado de balanço negativo de nutrientes, principalmente o balanço energético negativo (BEN), ocorrem adaptações fisiológicas no organismo da vaca. A adaptação ao BEN consiste em orquestradas adaptações no uso e conservação dos combustíveis corporais (BAUMAN; CURRIE, 1980). Essas alterações são baseadas na geração de energia a partir de novos compostos (principalmente ácidos graxos), e, ao mesmo tempo, economia na utilização de glicose (energia) por alguns tecidos corporais, principalmente tecidos periféricos como a musculatura esquelética (HERDT, 2000). Segundo Overton et al. (1998) a demanda estimada de glicose de uma vaca da raça holandesa é de 1000 a 1100 g/d durante os últimos dias de

gestação, mas aumenta rapidamente após o parto para aproximadamente 2500 g/d aos 21 dias pós-parto.

As adaptações envolvem mobilização da energia armazenada nos tecidos corporais, alterações na utilização de substratos, e na interconversão dos combustíveis corporais (HERDT, 2000). Para atender as exigências nutricionais de energia durante o período de transição, vacas leiteiras mobilizam grandes quantidades de ácidos graxos do tecido adiposo, resultando em aumentos na concentração de ácidos graxos não-esterificados (AGNE) na corrente sanguínea (DRACKLEY, 1999).

Os AGNE presentes na corrente sanguínea podem ser utilizados por diversos tecidos corporais para a geração de energia (economia na utilização de glicose) e incorporados na gordura do leite, em nível de glândula mamária. Em nível hepático, podem ser oxidados completa ou parcialmente, esterificados ou exportados como lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) (GRUMMER, 1993). O fígado aparentemente metaboliza 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 hepática de oxidação de ácidos graxos e exportação de VLDL é relativamente baixa em ruminantes (GRUMMER, 1993). Assim, o excesso de AGNE em nível hepático, 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, resultando no armazenamento hepático de triglicerídeos (oriundos da esterificação dos AGNE), levando os animais ao desenvolvimento de fígado gorduroso (acúmulo de triglicerídeos no parênquima hepático) (DRACKLEY, 1999).

O acúmulo de triglicerídeos no parênquima hepático reduz a capacidade do fígado em detoxicar amônia em uréia (STRANG; BERTICS; GRUMMER, 1998), resultando na diminuição da capacidade de gliconeogênese hepática a partir do propionato, o principal precursor de glicose em ruminantes (CADORNIGA-VALINO; GRUMMER; ARMENTANO, 1997; OVERTON; DRACKLEY; OTTEMANN-ABBAMONTE, 1999). Dessa forma, o animal estará sujeito a alterações nos desempenho produtivo e reprodutivo, bem como alterações de saúde, sendo prioridade a identificação de estratégias de manejo que promovam uma redução da mobilização das reservas corporais (GRUM et al., 2002; PIRES et al., 2007), promovam um incremento na capacidade do fígado em oxidar ácidos graxos

(COOKE et al., 2007 falta referência?) ou desviar rota de alguns ácidos graxos para outras funções no organismo das vacas como melhorias no desempenho reprodutivo (CERRI et al., 2009a ou b) e na função imune (SILVESTRE et al., 2011), principalmente de lipídeos, que resultem na diminuição da ocorrência de fígado gorduroso em vacas leiteiras durante o período de transição (MASHEK; BERTICS; GRUMMER, 2005).

O BEN se inicia no pré-parto e se estende durante o início da lactação devido à mobilização fisiológica de gordura do tecido adiposo, na forma de AGNE, que caso venha ser exacerbada pode provocar acúmulo de triglicérides no parênquima hepático comprometendo outras funções importantes, como a síntese de glicose e IGF-1. A condição de BEN das vacas no período de transição é fisiológica e comumente os animais perdem cercas de 1 unidade de ECC nesta fase, cerca de aproximadamente 10 % do peso corporal. Esta mobilização fisiológica pode ser responsável por até 30% da produção de leite nos primeiros 21 dias de lactação (GRUMMER, 1995).

Existe forte relação entre o balanço energético no pós-parto, a qualidade oocitária e atividade da função imune (ZACHUT et al., 2010a; SILVESTRE et al., 2011), que também tem alta correlação com as necessidades nutricionais e metabólicas voltadas a produção leiteira. São esperadas diferenças significativas no balanço energético das vacas antes do parto e no início de lactação, uma vez que estão bem estabelecidas as diferenças existentes entre as exigências nutricionais para mantença na vaca gestante em terço final de gestação em comparação a alta energia exigida para mantença e produção de leite na vaca em início de lactação (MCNAMARA et al., 2003). Portanto, as estratégias de manejo nutricional no período de transição devem priorizar a manutenção de consumo adequado de energia, visando minimizar a severidade do balanço energético, sendo este aspecto de grande importância para o entendimento da influência da nutrição na reprodução e na função imune.

O BEN interfere, primariamente, com a habilidade do eixo hipotalâmico-hipofisário em desenvolver um padrão de hormônio luteinizante (LH) necessário para estimular o desenvolvimento folicular ovariano e a ovulação. Secundariamente, o déficit de energia e a baixa concentração de insulina durante este período podem limitar a responsividade dos ovários à estimulação pelas gonadotrofinas. O intervalo para a primeira ovulação no período pós-parto depende da recuperação da função normal do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (BUTLER; SMITH, 1989).

A intensa mobilização de reservas do tecido adiposo parece estar intimamente relacionada com a expressão da função imune de vacas leiteiras no período de transição (CONTRERAS; SORDILLO, 2011). As altas concentrações de AGNE e acetil- CoA circulantes na corrente sanguínea atuam como agentes lipotóxicos para células de defesa do organismo dos animais, quando existe um grande acúmulo de gordura em tecidos não adiposos (VAN HERPEN; SCHRAUWEN-HINDERLING, 2008). A lipotoxicidade causada por altas concentrações de AGNE e consequente acúmulo lipídico no tecido hepático causa a morte programada das células de defesa, (SHIMABUKURO et al., 1998).

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 do ciclo produtivo das vacas leiteiras que devem atender a critérios relacionados aos vários eventos que determinam a fisiologia e a endocrinologia nas últimas semanas de gestação, que afetam o consumo de matéria seca, a produção leiteira, a saúde das vacas e a redução da incidência de doenças no início do período de lactação (OLSON, 2002). Assim sendo, as vacas no período seco devem ser agrupadas em 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 do parto, denominada fase 1 ou “FAR OFF”; o segundo grupo abrange os animais desde da fase 1 até as três últimas semanas que antecedem o parto, sendo denominada fase 2 ou “CLOSE UP”.

Aumentando a densidade energética na dieta de 1,30 para 1,62 Mcal de energia líquida de lactação (Mcal EL_l)/kg de matéria seca (MS) e a proteína bruta de 12 para 17 por cento durante os 21 dias pré-parto 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/grama de tecido) (VANDEHAAR; SHARMA; FOGWELL, 1995). A adição de 450 até 700 gramas de gordura na dieta pode aumentar a ingestão de energia pelo animal, sem causar problemas relacionados com o consumo de matéria seca (BORBA et al., 2006). Segundo o NRC (2001), as respostas produtivas a suplementação nas dietas de vacas em lactação são dependentes de dieta basal, estágio de lactação, balanço energético, composição e quantidade da fonte de gordura utilizada. Manter o consumo de energia no pré-parto até o parto e aumentar rápido no pós-parto seria uma estratégia interessante de minimizar o balanço

energético negativo (BUTLER; SMITH, 2004). Durante o balanço energético negativo, eventos homeorréticos sustentam as necessidades metabólicas da lactação, e aparentemente, a função da glândula mamária tem prioridade metabólica em relação à função ovariana, assim a função reprodutiva é diretamente dependente da disponibilidade de nutrientes a serem utilizados para lactação (STAPLES; BURKE; THATCHER, 1998).

As alterações no consumo de matéria seca podem ser observadas principalmente quando é iniciada a suplementação lipídica, em razão da fonte de gordura utilizada, muitas vezes não serem bem caracterizadas, ou quando somente a silagem de milho é usada em como volumoso padrão (ONETTI et al., 2001). Os lipídios são degradados dentro da parede celular microbiana, ou seja, o grau de maturação da forragem e o conteúdo de nitrogênio da dieta influenciam diretamente a taxa de passagem e a taxa de digestão do alimento, além de alterar a disponibilidade de substratos necessários para a sincronia do metabolismo e desenvolvimento da população de bactérias ruminais (JENKINS, 1993). A suplementação lipídica para vacas leiteiras deve objetivar primariamente a manipulação dos eventos físico-químicos gerados por estes compostos na fermentação ruminal e controlar a bio-hidrogenação para alterar a absorção destes ácidos graxos de forma seletiva (JENKINS, 1993).Tem sido demonstrado em várias situações, que a adição total de gordura na dieta não pode exceder 6 a 7 pontos percentuais da matéria seca, principalmente no período de transição e início de lactação, que pode ocasionar uma redução do consumo de matéria seca, antecipando e exacerbando o balanço energético negativo (NRC, 2001).

4.3 FONTES DE ÁCIDOS GRAXOS ω3 E ω6 NA ALIMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS

A suplementação de ácidos graxos específicos para vacas leiteiras no período de transição e início de lactação vem sendo utilizado, em sua grande maioria com finalidade nutraceutica, e não somente como mera fonte de energia em dietas de transição. A utilização destes ácidos graxos somente como fonte calórica em dietas pré e pós-parto não é capaz de modular o metabolismo dos animais visando melhores condições de saúde, e reprodução dos animais, pois desta forma a suplementação visaria somente atenuação de balanço energético negativo e não em modulação de síntese de hormônios esteroides, ativação de agentes do sistema imune e aumento do desempenho produtivo.

Trabalhando com vacas leiteiras de alta produção (38,45 kg/dia) no período de transição (25 pré-parto a 80 dias pós-parto) e suplementando com fontes de ácidos graxos da família ω3 e ω6, Cerri et al. (2009a ou b) observaram melhor qualidade oocitária e embrionária para as vacas que receberam fonte de ácido graxo da família n-3 em relação a n-6, sendo os índices obtidos sobre a qualidade embrionária satisfatórios para vacas leiteiras de alta produção.

Os ácidos graxos da família ω6 e ω3 tem sido mostrados como importantes moduladores das reações imunes (CALDER et al., 2002). Dietas ricas nestes ácidos graxos modulam as respostas inflamatórias em modelos e em ensaios clínicos (STENSON et al., 1992). Em camundongos alimentando-se de dietas ricas em ácidos graxos n-3, as reações inflamatórias foram reduzidas quando comparadas as reações estudadas em camundongos alimentando-se com ácidos graxos ω6 (ALBERS et al., 2002). Mecanismos envolvidos na regulação da resposta imune não estão completamente entendidos, mas existe evidência que os ácidos graxos ω6 e ω3 influenciam a comunicação e a ativação celular através da síntese de prostaglandinas, fator de necrose ((TNF-α), interferon-γ (IFN-γ) e outros fatores como o óxido nítrico (CALDER et al., 2002).

As fontes mais utilizadas de ácidos graxos ω6 e ω3 são sementes de oleaginosas e sais de cálcio de ácidos graxos, que podem ser utilizados como agentes nutraceuticos em vacas leiteiras no período de transição e início de lactação.

4.3.1 SAIS DE CÁLCIO DE ÁCIDOS GRAXOS

Diversos tipos de suplementos comerciais contendo lipídios inertes no rúmen estão disponíveis no mercado. O mais comum deles são os sais de cálcio de ácidos graxos, obtido a partir de ácidos graxos de cadeia longa. Esses ácidos graxos reagem com os sais de cálcio, unidos na forma de um sal do tipo R-COO-ca, popularmente conhecido como sabão de cálcio.

Existem no mercado sais de cálcio de ácidos graxos formados a partir de óleo de palma, colza, soja, girassol e linhaça sendo que os dois últimos são mais insaturados e mais dissociados e biohidrogenados no rúmen. Os sais de cálcio de ácidos de cadeia longa e algumas sementes de oleaginosas geram poucos efeitos sobre a população microbiana, sobre os processos de degradação e absorção ruminal de nutrientes (PALMQUIST; MATTOS,

2006; ALLEN, 2000). Entretanto, pode haver benefícios na digestibilidade da FDN quando utilizado sais de cálcio de ácidos graxos em rações de vacas leiteiras.

Normalmente, a inclusão média de gordura em dieta de vacas leiteiras é de 3,5%, de modo que, alguns estudos resultam em quedas de até de 2% na digestibilidade da matéria seca, para algumas oleaginosas e gorduras saturadas, entretanto, tem sido demonstrado aumentos o de até 1,7% pela suplementação com sais de cálcio de ácidos graxos, que pode estar associado ao tipo de fibra e da relação volumoso:concentrado, de modo que, o estabelecimento de um pH ruminal entre 6,5 e 7,0 pode contribuir com a diminuição da quebra das ligações dos ácidos graxos com o cálcio, que pode vir a interferir na fermentação ruminal e na produção de ácido linoleico conjugado (CLA) (ONETTI; GRUMMER, 2004).

Em estudos recentes a utilização de sais de cálcio de ácidos graxos em vacas no período de transição não tem reduzido o consumo de matéria seca. Rodriguez-Sallaberry et al. (2007) e Duske et al. (2009) avaliaram a inclusão de sais de cálcio de ácidos graxos em rações de vacas holandesas no período de transição com média de produção de leite de 34,0 kg/vaca/dia e um total de 5,9 % extrato etéreo (E.E.) na matéria seca total no período pós-parto. Estes autores não observaram redução do consumo de matéria seca no período pós-parto. Andersen et al. (2008) e Cerri et al. (2009a ou b) avaliaram vacas da raça Holandesas com suplemento comercial de ácidos graxos de óleo de palma e óleo de soja com dietas de 8,0 % e 5,5 % de E.E, na matéria seca total das dietas respectivamente, para as rações com fonte de gordura. Estes autores também não observaram redução no consumo de matéria seca.

Dessa forma, a inclusão de ácidos graxos de sais de cálcio em rações de vacas leiteiras pode ser considerada uma ótima alternativa como fonte de gordura, na tentativa de suprir a demanda energética de vacas leiteiras no início de lactação. Entretanto, é preciso considerar um período de adaptação e a aceitabilidade dessa fonte de gordura, pois em estágios críticos de baixo consumo de matéria seca os animais submetidos a essa rações podem não apresentar o desempenho esperado.

4.3.2 GRÃO DE SOJA

A soja é um grão rico em proteínas, cultivado em todo mundo como fonte de alimento para humanos e animais, e pertence à família *Fabaceae* (leguminosa). Destaca-se

entre os alimentos proteicos de origem vegetal como fonte alternativa de proteína e energia, sendo considerada semente de oleaginosa mais disponível no mundo, podendo ser usada na alimentação dos ruminantes na sua forma original (crua) ou processada (CORRÊA, 2007). Considera-se que resultados obtidos com grão de soja cru (moído grosseiramente, peletizado ou macerado) são iguais ou melhores quando comparados aos de processos de aquecimento, extrusão ou esfarelamento (EARLEYWINE, 1989 falta referência). Quanto ao custo, isso poderia acarretar vantagem econômica, pois em regiões produtoras brasileiras, na maioria das vezes, o preço do grão de soja é menor que o do farelo de soja.

Entre as características nutritivas da soja integral importantes na nutrição de ruminantes destaca-se a 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 ao seu elevado teor de energia devido ao teor de extrato etéreo. As sementes de oleaginosas se destacam por apresentar alto conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados. O ácido linoléico (C18:2) predomina nas fontes mais comuns, sendo que a soja apresenta maiores concentrações de ácido linoléico (C18:2) (DHIMAN et al., 2005).

Uma das vantagens do grão de soja integral como fonte lipídica para ruminantes é a lenta liberação de lipídios no rúmen, onde a capacidade de hidrogenação da microbiota ruminal não é excedida, impedindo possível redução na degradação da fibra pelo efeito negativo que ácidos graxos insaturados podem causar nas bactérias fibrolíticas (COPPOCK; WILKS, 1991; PALMQUIST, 1991). Isso ocorre em sementes de oleaginosas porque a maioria dos lipídios encontra-se no germe e, portanto, há necessidade da degradação da parede celular para que a hidrólise se inicie.

Schauff et al. (1992) avaliaram a inclusão de grão de soja cru na dieta de vacas lactantes, na proporção de 15 a 20% na matéria seca total, e verificaram que em quantidades menores que 16% da matéria seca da dieta de soja crua fornecida, não foram observados efeitos negativos sobre a fermentação ruminal.

Freitas Júnior et al. (2010) avaliaram a utilização de diferentes fontes de gordura para vacas leiteiras. Neste estudo foram avaliadas a dieta controle e três fontes de gordura, sendo mantido similar nível de extrato etéreo na matéria seca das dietas com gordura (aproximadamente 5,0%): óleo de soja, grão de soja e sais de cálcio de ácidos graxos insaturados. O nível de inclusão do óleo de soja e dos sais de cálcio foi de 3%, enquanto que do grão de soja integral foi de 16% da MS, e o volumoso utilizado foi a silagem de milho na

relação volumoso/concentrado de 60/40. Estes autores observaram menor consumo de matéria seca para os animais submetidos às rações contendo fontes de gordura, em relação à dieta controle. O consumo de extrato etéreo, como era de se esperar, foi superior para os animais submetidos às dietas com fontes de gordura. Não houve efeito das fontes de gorduras nas rações sobre a produção de leite com e sem correção, produção de gordura, lactose e nos teores de proteína e lactose.

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. Os autores não observaram efeitos sobre a produção de leite, teores de proteína, lactose, observando uma tendência no aumento dos teores de gordura para as dietas suplementadas com grão de soja.

Quando Barletta et al. (2012) avaliaram o consumo de matéria seca, somente observaram diminuição do consumo da dieta com inclusão de 24% de grão de soja,não sendo observardo sobre a digestibilidade da matéria seca. No presente estudo os autores recomendam o uso da inclusão 16% de grão de soja cru e integral na dieta de vacas leiteiras, com média de 30 kg/dia, com silagem de milho como volumosa base.

Naves (2010) trabalhou 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. Neste estudo não foram observadas diferenças no consumo e digestibilidade da matéria seca, produção e composição de leite, fermentação ruminal e síntese de proteína microbiana entre a dieta com grão cru e integral e as demais com o grão moído.

Venturelli et al. (2011), suplementaram vacas leiteiras no final de lactação com média de produção de 23,0 kg/dia com altos níveis de grão de soja cru e integral (0, 9, 18 e 27 % na MS das dietas). Houve efeito linear crescente para o teor de gordura no leite (3,59; 3,95; 4,07; 4,20 %). Não houve efeito da inclusão do grão de soja para a produção de leite corrigida, produção de gordura, escore de condição corporal e eficiência produtiva.

A utilização de grão de soja cru e integral em vacas leiteiras mostra-se como uma alternativa viável para ser usada em todo o período de lactação, para vacas de alta, média e

baixa produção de leite, sendo, contudo necessário a inclusão dos níveis corretos de acordo com a fase de lactação, nível de produção e volumoso base.

4.3.3 SEMENTE DE LINHAÇA

A semente de linhaça, como o grão de soja inteiro, tradicionalmente na nutrição animal se enquadra como alimento proteico, mas seu grande conteúdo energético advindo das altas concentrações de ácidos graxos torna sua importância nutricional muito mais importante que meramente um simples alimento proteico.

A linhaça em sua forma de semente oleaginosa destaca-se pelo equilíbrio nutricional, contento 24,60 % de proteína bruta, 39,10% de extrato etéreo, 17,65% de fibra em detergente neutro e um conteúdo energético de 6500 kcal de energia bruta (VALADARES FILHO et al., 2006). O destaque principal desta oleaginosa de clima temperado está no seu alto teor de ácidos graxos essenciais onde são encontrados 52,70% de C18: 3 *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 ; 17,20% de C18:2 *cis*-9, *cis*12 e 18,20% de C18:1 *cis*-9, sobre o total do conteúdo de lipídios da semente.

O uso da linhaça da nutrição de vacas leiteiras vem sendo difundido principalmente a partir dos anos 2000, quando uma série trabalhos de pesquisadores canadenses retrataram os benefícios da linhaça como alimento energético e modulador do desempenho reprodutivo e imunológico (PETIT et al., 2004, 2007).

A utilização da linhaça em dietas de vacas leiteiras no início de lactação não altera o consumo e a digestibilidade da matéria seca em relação a dietas controle (PETIT et al., 2002.2003; CORTÊS et al., 2010 ; CAROPRESE et al., 2010; KAZAMA et al., 2010). Em relação à produção de leite a semente de linhaça pode contribuir com significativos aumentos na produção quando em vacas no início de lactação (PETIT et al., 2004), que observaram um aumento de 4,3kg de leite por dia quando compararam a dieta com linhaça a controle em vacas durantes os 35 dias iniciais do período de lactação. E em vacas no período de transição Andersen et al. (2008) obtiveram um aumento de 2,6kg de leite dia. Não apresentando diferenças em relação ao controle quando os animais se encontram no terço médio e final de lactação (CORTÊS et al., 2010; CAROPRESE et al., 2010; KAZAMA et al., 2010).

A respeito da composição do leite não se observa alterações nas porcentagens de gordura, proteína e lactose em relação à dieta controle (CORTÊS et al., 2010; CAROPRESE et al., 2010; KAZAMA et al., 2010). A literatura retrata um aumento considerável no leite do conteúdo de ácidos graxos insaturados, com destaque para os ácidos C 18:2 e C 18:3 (PETIT et al., 2007; CAROPRESE et al., 2010).

A influência da semente de linhaça na nutrição de vacas leiteiras parece ser mais evidente quando observamos os seus efeitos como agente nutraceutico na modulação da eficiência reprodutiva e da função imune de vacas no período de transição e início de lactação. As altas concentrações de ácido linolênico reduzem as concentrações de prostaglandina e com maiores diâmetros do corpo lúteo no período de serviço dos animais (PETIT et al., 2002). As baixas concentrações de $PGF_2\alpha$ nesta fase do ciclo de lactação contribuem com melhores taxas de concepção de vacas leiteiras pela influencia negativa deste hormônio na manutenção da gestação (WILTBANK et al., 2006).

Os efeitos da semente de linhaça podem ser observados na resposta imune dos animais pela redução da proliferação de linfócitos (ALBERS et al., 2002; CALDER et al., 2002) e pela redução de citocinas pró inflamatórias pelos monócitos (KHAIR-EL-DIN et al., 1996).

4.4 INFLUÊNCIA DOS ÁCIDOS GRAXOS DA FAMÍLIA ω3 E ω6 NO DESEMPENHO PRODUTIVO DE VACAS LEITEIRAS NO PERÍODO DE TRANSIÇÃO E INÍCIO DE LACTAÇÃO

4.4.1 CONSUMO E DIGESTIBILIDADE DA MATÉRIA SECA E NUTRIENTES

Dois principais pontos devem ser destacados quando se analisa alterações no consumo de matéria seca em vacas suplementadas com fontes de gordura: 1) aceitabilidade do suplemento de gordura, que está diretamente relacionado às alterações no consumo de matéria seca, pois quando o período de adaptação não é suficiente para os animais, às respostas à suplementação podem não representar a realidade e 2) tipo e nível de suplementação, pois respostas diferentes são observadas de acordo com as características químicas e físicas da gordura utilizada.

A suplementação lipídica através de sementes de oleaginosas parece não afetar o consumo de matéria seca de vacas no período de transição e início da lactação (LESSARD et

al., 2004; PETIT et al., 2007; ANDERSEN et al., 2008). No entanto, mais estudos devem ser realizados visando obter resultados mais consistentes sobre os efeitos diretos dos ácidos graxos das famílias ω3 e ω6 sobre o consumo de matéria seca de vacas no período de transição e inicio de lactação.

Allen (2000) investigou uma série de estudos (n=28) envolvendo a suplementação de sais de cálcio de óleo de palma (rico em gordura saturada) em vacas leiteiras e concluiu que a cada 1% de inclusão de sais de cálcio de óleo de palma comparando-se com a dieta controle, ocorre uma depressão de 2,5% na CMS. Em alguns estudos a suplementação de gordura diminuiu a digestibilidade (PALMQUIST; JENKINS, 1980) e o CMS (CHOI; PALMQUIST, 1996; SCHAUFF; CLARK, 1992) de vacas em lactação. Os mecanismos pelos quais a suplementação de gordura em alguns casos deprime a ingestão de matéria seca não estão esclarecidos, mas envolvem efeitos da gordura na fermentação ruminal, motilidade intestinal, aceitabilidade das dietas contendo gordura, liberação de hormônios intestinais, e oxidação hepática (ALLEN, 2000).

Choi e Palmquist (1996) sugeriram que o decréscimo no consumo de matéria seca em vacas alimentadas com dietas com grandes quantidades de gordura é mediado por 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, oxicintomodulina, peptídeo *glucagon-like* 1 (GLP-1) ou GLP2], são potenciais mediadores da redução do CMS observado em animais alimentados com gordura (HOLST, 2000; BATTERHAM; BLOOM, 2003).

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 (com base na MS), porém Martin et al. (2008) observaram grande decréscimo no CMS e na digestibilidade de nutrientes quando suplementou-se a dieta em 5,7% de óleo de semente de linhaça. Benchaar et al. (2008), concluíram que a suplementação de óleo de semente de linhaça com até 4% de inclusão da MS total da dieta não causa nenhum detrimento da função ruminal, digestão e produção de leite.

Zachut et al. (2010a) ao estudarem a inclusão de semente de linhaça extrusada (5,8% de extrato etéreo da MS) na dieta de vacas leiteiras no período de transição até 100 dias de lactação observaram que o CMS foi 3,8% maior e a ingestão de energia 5% maior quando

comparadas as vacas do grupo controle no período pós parto porém, no pré parto não foram observadas diferenças no CMS. O aumento do CMS do grupo alimentado com semente de linhaça extrusada vai de encontro com os resultados obtidos por Petit et al. (2007), que concluíram que uma dieta contendo uma alta proporção de ácidos graxos saturados causam menor CMS do que uma dieta rica em ácidos graxos insaturados. Porém, diversos estudos encontraram queda no CMS ao realizarem infusão abomasal de ácidos graxos insaturados (DRACKLEY et al., 1992falta referência; BREMMER et al., 1998) ou alimentando vacas com quantidades crescentes de ácidos graxos insaturados com decréscimos de ácidos graxos saturados (HAVARTINE; ALLEN, 2006).

As alterações no consumo de matéria seca podem ser observadas principalmente quando é iniciada a suplementação lipídica, em razão da fonte de gordura utilizada, muitas vezes não serem bem caracterizadas, ou quando somente a silagem de milho é usada como volumoso padrão (ONETTI et al., 2001), pois os lipídios são degradados dentro da parede celular microbiana, ou seja, o grau de maturação da forragem e o conteúdo de nitrogênio (n) da dieta, influenciam diretamente a taxa de passagem e a taxa de digestão do alimento, além de alterar a disponibilidade de substratos necessários para a sincronia do metabolismo e desenvolvimento da população de bactérias ruminais (JENKINS, 1993).

Ballou et al. (2009) realizaram experimento com 42 vacas multíparas dentro do período de transição (-21d até +10 d) utilizando 3 tratamentos (controle - sem suplementação lipídica; “energy buster”– fonte de gordura saturada e óleo de peixe - fonte de gordura insaturada ω3) e a suplementação era realizada em bolus. A dose utilizada no pré-parto foi de aproximadamente 0,92% e 1% no pós-parto do CMS. Nesse experimento não foi observado efeito de suplementação no CMS. Este resultado foi semelhante no estudo realizado por Fuentes et al. (2007) que não observaram efeito no CMS de animais no início de lactação suplementados com fontes de ácidos graxos insaturados (grão de soja extrusado e semente de linhaça extrusada e níveis de inclusão baseado na MS da dieta de 4,9% e 5,5% respectivamente).

Lessard et al. (2004) estudaram os efeitos de dietas enriquecidas com ácidos graxos poli-insaturados ω3 e ω6 durante o período de transição (n=48), e utilizaram de sais de cálcio de oléo de palma (Megalac-R® – fonte de gordura saturada), grão de soja micronizado (fonte de ácidos graxos ω6) e semente de linhaça integral (fonte de ácidos graxos ω3). Nesse experimento o CMS nas seis primeiras semanas pós-parto foi significantemente 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 micronizada.

A partir da literatura nota-se que a suplementação de gordura pode ou não afetar o CMS, porém o grau de saturação, a porcentagem de inclusão no total da MS da dieta, a palatabilidade das dietas, o perfil de ácidos graxos, o método de suplementação e o período fisiológico influenciam diretamente no efeito da CMS.

4.4.2 PRODUÇÃO, COMPOSIÇÃO E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE

Em estudo realizado por Zachut et al. (2010a), foram observadas maior produção de leite (6,4%) e menor teor de gordura no leite (0,4%) quando comparou-se uma dieta rica em ácidos graxos da família ω3 com uma dieta controle, em vacas (n=256) no período de transição até 100 dias de lactação. Esses resultados estão de acordo com os observados por Petit et al. (2007), no qual vacas alimentadas com semente de linhaça integral com 3,3 e 11% de inclusão na MS nos períodos pré e pós-parto, respectivamente, produziram mais leite com um menor teor de gordura em relação ao grupo controle. A queda na porcentagem de gordura também foi observada por Mustafa et al. (2003) com vacas alimentadas com 7% da MS de linhaça integral, e por Chilliard et al. (2009) em vacas alimentadas com suplemento contendo 70% de linhaça extrusada (21,2% da MS).

Em contraste, Cortes et al. (2010) não encontraram diferenças na produção e na produção de leite corrigida a 4% entre as vacas alimentadas com semente de linhaça nas formas integral ou em sais de cálcio de óleo de linhaça em relação a dieta controle, as dietas também não afetaram as porcentagens de proteína, lactose, nitrogênio uréico e sólidos totais no leite. No entanto, a concentração de gordura no leite foi menor para a dieta de sais de cálcio quando comparada com a dieta controle. Além das fontes de gorduras serem exploradas pela sua eficiência no metabolismo energético atualmente estão sendo exploradas pelo potencial efeito nutraceutico que algumas formas lipídicas apresentam na nutrição animal e humana.

Ácidos graxos poli-insaturados como os da família ω3 não são sintetizados pelos humanos, e a procura dos consumidores pelos benefícios para a saúde que esses ácidos graxos podem trazer está aumentando, como por exemplo, diminuição na incidência de doenças

cardiovasculares, hipertensão, e artrites (SIMOPOULOS, 2002). Como resultado, há também um aumento do interesse em manipular as dietas de vacas leiteiras para aumentar as concentrações dos ácidos graxos poli-insaturados na gordura do leite (CORTES et al., 2010).

A suplementação com semente de linhaça aumenta as proporções do ácido graxo ω3 e CLA *cis*-9, *trans*-11 na gordura do leite (GLASSER et al.,2008), porém a proporção de ácido linolênico (*cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 18:3) na gordura do leite de vacas suplementadas com ácidos graxos ω3 de semente de linhaça integral não ultrapassa 1% do total de ácidos graxos (PETIT et al., 2002). No entanto, quando uma fonte de ácidos graxos ω3 como o óleo de semente de linhaça, que é rico em ácido linolênico, foi infundido no intestino delgado para não sofrer o impacto ruminal, concentrações de ácidos graxos ω3 chegaram a 14% do total de ácidos graxos na gordura do leite (PETIT et al., 2002). Chillard et al. (2009) relatam resultados mais expressivos quando se protege a gordura da biohidrogenação ruminal, com as concentrações de ácido graxo α-linolênico no leite podendo atingir até 20%.

Zachut et al. (2010a) observaram aumento de 3,7 vezes da proporção de ácidos graxos ω3 na gordura do leite de vacas com inclusão de linhaça extrusada quando comparada com vacas alimentadas com uma dieta comum, além de menor proporção ω6:ω3 (de 8,3 para 2,3). Porém foi observado que a eficiência de transferência de C18:3 ω3 da dieta para a gordura do leite foi maior na dieta controle do que a dieta com semente de linhaça (médias de 22,7 e 5,9% respectivamente), implicando que a eficiência de transferência diminui conforme aumenta-se o C18:3 ω3 da dieta, resultados semelhantes foram observados por Gonthier et al. (2005) e Chilliard et al. (2009). Ainda no mesmo estudo o conteúdo de C18:3 n-3 na gordura do leite chegou ao alcance máximo de aproximadamente 2% o que implica que o enriquecimento deste ácido graxo na gordura do leite é limitado quando alimenta-se com semente de linhaça parcialmente protegida. A média desse ácido graxo encontrada nesse estudo (1,74g/ 100g) é maior do que a reportada por outros estudos que utilizaram diferentes fontes e quantidades de semente de linhaça (GONTHIER et al., 2005,2007; CHILLARD et al., 2009).

No estudo conduzido por Barlleta (2010), no qual vacas leiteiras foram suplementadas com níveis crescentes de grão de soja, foi observado aumento nos teores de C 18:0 que é o produto final da biohidrogenação, também foi verificado aumento nas concentrações de C18:2 *cis*, mesmos resultados observados por Naves (2010), Freitas Jr et al. (2010) e Venturelli (2011).

Comparando os efeitos independentes dos ácidos linoléico e linolênico na concentração de ácido linoléico conjugado (CLA) no leite Lock e Garnsworthy (2002) concluíram que dietas ricas em ácido linoléico aumentaram a produção de CLA C18:2 *cis*-9, *trans*-11 no rúmen. Grandes quantidades de ácido vacênico e CLA que chegaram ao duodeno foram encontradas em vacas alimentadas com dietas suplementadas com óleos ricos em ácido linoléico quando comparada com vacas alimentadas com óleos ricos em ácido linolênico.

Fuentes et al. (2007) avaliaram o efeito da semente de linhaça extrusada no desempenho e perfil de ácidos graxos no leite de vacas (n=44) no início da lactação. Os animais foram alimentados com relação volumoso : concentrado de 40% : 60% sendo que a composição das duas dietas utilizadas foram similares variando apenas na porcentagem de proteína. As duas dietas utilizadas foram nomeadas de controle (CTR: inclusão de 4,9% de grão de soja extrusado) e semente de linhaça (LIN: 5,5% de semente de linhaça extrusada). No experimento não houve efeito das dietas para produção de leite (45 kg/d), porém observou-se menor teor da gordura do leite para vacas alimentadas com LIN (2,65%) quando comparada com CTR (2,86%). A concentração de ácidos graxos saturados foi menor na gordura do leite da LIN (56,2%) do que CTR (60,2%). A suplementação com semente de linhaça extrusada também aumentou a proporção de ácido vacênico (2,21 *vs.* 1,55%), total de ácido linoleico conjugado (0,91 *vs.* 0,72%) e ácido graxos n-3 (1,21 *vs.* 0,54%) no leite quando comparado com a CTR.

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 ω3 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 ω6 : ω3 no leite foi menor para a dieta com linhaça (4,39 *vs.* 9,26%).

4.4.3 PERFIL METABÓLICO

Drackley (1999) sugeriu que o aumento da ingestão de ácidos graxos para 1 kg/d resultaria em aumento da concentrações de ácidos graxos não esterificados (AGNE) em apenas 81μM em vacas de lactação e 1*m*M ou mais durante o período de transição.

Bu et al. (2010) ao estudarem o efeito de óleos ricos em ácido linoléico (óleo de soja), ácido linolênico (óleo de semente de linhaça) ou uma combinação dos dois óleos encontraram concentrações de colesterol, fosfolipídios, colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL),e AGNE no sangue aumentadas em relação a dieta controle. O aumento nas concentrações desses parâmetros foi similar em estudos anteriores (GRUMMER; CARROL, 1991; PETIT et al., 2002; PETIT , 2002). As concentrações de beta-hidroxibutirato (BHBA) não foram alteradas relativamente durante a suplementação dos óleos comparando-se com o controle. Vacas alimentadas com óleo de linhaça (1,35% da MS no pré-parto e 1,5% da MS no pós- parto) também tiveram maiores concentrações de AGNE na segunda e quinta semana pós-parto e ainda maiores concentrações de gordura hepática na segunda semana pós-parto quando comparadas com vacas alimentadas com dieta de alta concentração de ácido linoléico (AMARAL, 2008).

Lessard et al. (2004) observaram que a dieta enriquecida com ω3 (inclusão de semente de linhaça integral), resultou em concentração de C18:3 no plasma alterado durante todo o experimento enquanto que permaneceu similar para as alimentadas com sais de cálcio de óleo de palma ou para as alimentadas com soja micronizada. Quantidades relativas de ácido eicosapentanóico (C20:5n3) e a razão ω6/ω3 foram, respectivamente, maiores e menor para vacas alimentadas com semente de linhaça integral quando comparada a vacas alimentadas com Megalac-E® ou grão de soja.

Petit et al. (2007) analisaram o perfil metabólico de 33 vacas alimentadas com diferentes fontes de gordura (sendo que as dietas utilizadas foram: controle, inclusão de semente de linhaça (3,3 e 11% da MS no pré e pós-parto, respectivamente) e gordura saturada na forma de “energy buster” – 1,7 e 3,5% da MS no pré e pós-parto) durante 6 semanas da data prevista para o parto até 28 dias de lactação. Este estudo observaram que as porcentagens relativas de C18:3 tenderam a ser maiores nos momentos do parto e duas semanas antes do parto (P=0,06 e 0,07 respectivamente) para vacas alimentadas com semente de linhaça e houve diferença nas segunda e quarta semanas pós-parto. Houve interação com significância entre o tratamento e período para as concentrações de AGNE em vacas multíparas. Não foi observada diferença no pré-parto, mas no pós-parto observaram que vacas alimentadas com “energy buster” tiveram concentrações maiores de AGNE quando comparadas com o grupo controle e alimentadas com semente de linhaça. No entanto as dietas não influenciaram os níveis de AGNE nas vacas primíparas. No mesmo experimento observou-se efeito de interação entre os tratamentos e o período para concentração plasmática de BHBA após o parto nas vacas

primíparas e multíparas, sendo que o efeito do aumento de BHBA foi notado nas vacas alimentadas com fonte de gordura saturada logo após o parto para as multíparas e após duas semanas para as primíparas.

Mandebu et al. (2003) compararam a suplementação de gorduras em forma de sais de cálcio sendo que as concentrações de AGNE e BHBA durante as duas primeiras semanas pós-parto não sofreram efeito das dietas (óleo de palma e óleo de soja), e os níveis estavam dentro dos limites normais para espécie (DRACKELY et al., 1998; GARCIA-BOJALIL et al., 1998) Ballou et al. (2009) observaram que a suplementação lipídica tendeu a aumentar a glicose plasmática e diminuir a concentração plasmática de AGNE. A concentração plasmática de BHBA 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.

Gonthier et al. (2005) observaram aumento do colesterol plasmático e das concentrações de AGNE no sangue para vacas alimentadas com semente de linhaça em relação as vacas do grupo controle. No entanto os tratamentos não influenciaram na concentração plasmática de glicose assim como mencionado em estudo de Zachut et al. (2010a). Em contra partida Zachut et al. (2010b) não notaram alterações nas concentrações plasmáticas de AGNE. Fuentes et al. (2007) ao alimentarem vacas no início da lactação 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 AGNEs e colesterol entre vacas que receberam dietas isolipídicas suplementadas com semente de linhaça e sais de cálcio de ácidos graxos.

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 balanço energético negativo esta associado com a perda de energia corpórea e o balanço de energia positivo esta associado com o ganho de energia corpórea. Vacas que perdem tecido corpóreo e, portanto energia, no início da lactação usualmente retornado a balanço positivo de energia dos 40 aos 80 dias pós-parto (SUTTER et al., 2000; VEERKAMP et al., 2000; COFFEY et al., 2001). 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 inclusão de semente de linhaça na dieta de 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 semente de linhaça na dieta, aos 100 dias de lactação as vacas alimentadas com semente de linhaça estavam 32,2 kg mais pesadas que as do grupo controle. Quando analisado o escore de condição corpóreo (ECC) observou-se que as vacas alimentadas com semente de linhaça 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.

No estudo de Zachut et al. (2010a) , 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). O BE nadir foi menor no grupo controle que no grupo semente de linhaça (-7,7 e -3,6 Mcal, respectivamente); no entanto, os dias em BE nadir negativo não foram afetados pelo tratamento.

O consumo de energia foi 5% maior e a produção de energia no leite foi 2% menor nas suplementadas que no controle, contribuindo para o balanço energético. Resultados similares foram obtidos num experimento com vacas no pós parto com dietas de 11% de semente de linhaça integral, as vacas suplementadas com linhaça tiveram maior balanço energético do que as da dietas com ácidos graxos saturados (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 inicio da lactação ocorre uma maior utilização dos aminoácidos musculares principalmente os aminoácidos glicogênicos visando suprir o déficit de energia fisiológico dos amimais neste período, também há utilização em maior escala dos aminoácidos essenciais para a produção de leite devidos a condição homeorréticas das vacas leiteiras para na 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 6 semanas 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, por 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 uréia, 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 inicio do déficit energético já ocorrendo nesta fase, 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 1ª a 2ª semana de lactação com produção média de 38,5 kg/dia, voltando a patamares positivos por volta da 5ª a 6ª semana, juntamente com inicio do restabelecimento do consumo de matéria seca (CHIBISA et al., 2008).

4.5 INFLUENCIA DOS ÁCIDOS GRAXOS ω3 E ω6 NA QUALIDADE OOCITÁRIA E EMBRIONÁRIA DE VACAS LEITEIRAS NO PERRÍODO DE TRANSIÇÃO E INÍCIO DE LACTAÇÃO

Ácidos graxos poliinsaturados na dieta podem influenciar positivamente a reprodução de vacas leiteiras pela alteração do folículo ovariano e função do corpo lúteo, por melhorar o *status* energético e pelo aumento dos precursores das sínteses dos hormônios reprodutivos como os esteróides e as prostaglandinas (STAPLES; BURKE; THATCHER, 1998; MATTOS et al., 2000, 2002). Acredita-se que o efeito positivo da gordura sobre a função reprodutiva seja principalmente devido aos ácidos graxos poliinsaturados (AMBROSE; KASTELIC, 2003; PETIT, 2003).

Os efeitos positivos de a suplementação alimentar com ácidos graxos ploiinsaturados em vacas leiteiras pode ocorrer pelo estímulo do crescimento folicular ovariano em associação a um aumento no balanço energético (LUCY et al., 1991). Alguns estudos demonstraram um aumento na população folicular em vacas suplementadas com ácidos graxos poliinsaturados (LUCY et al., 1991; BEAM; BUTLER, 1997), e outros demonstraram um aumento no tamanho do folículo ovulatório, quando utilizaram ácidos graxos poliinsaturados sob a forma de sais de calcio (BEAM; BUTLER, 1997; STAPLES et al., 2000). A ovulação de um folículo maior pode resultar em um CL maior (VASCONCELOS et al., 2001; SARTORI et al., 2002).

O ácido linoleico (C18: 2 ω6) é um AG essencial necessário para a função normal da reprodução em mamíferos (BURR; BURR, 1930). À medida que há maior ingestão deste AG há maior disponibilidade deste precursor para a síntese endógena de ácido araquidónico (C20: 4 ω6) o que se pode resultar em aumento de incorporação de ácido araquidónico em membranas das células do endométrio resultando em ampla síntese de PGF2α (MATTOS et al., 2003.). A PGF2α desempenha um importante papel no pós-parto durante a involução uterina (KINDAHL et al., 1992). Melhorar a saúde uterina, durante o período de pós-parto imediato, tem potencial efeito para melhorar a fertilidade de vacas leiteiras, obtido por uma melhor saude uterina e, por conseguinte, melhor fertilização (CERRI et al., 2009a) e prenhez (RUTIGLIANO et al., 2008), em vacas diagnosticados livres de endometrite subclínica após 30 DEL.

Recentemente, vacas de alta produção leiteira alimentadas com gordura suplementares enriquecidas com ácido linoléico e uma mistura de AG trans-octadecenóicos (AGCL) tiveram aumento na prenhez entre 27 e 41 d após a IA (JUCHEM et al., 2008.). No entanto, as causas para essa melhoria não foram claramente determinadas. Além disso, a prova de um efeito positivo direto de ácido linoleico durante o desenvolvimento embrionário inicial foi observada em embriões humanos mais desenvolvidos que incorporaram mais ácido linoleico em comparação com os seus homólogos não desenvolvidas (HAGGARTY et al., 2006). Um maior número de blastômeros foi observada quando as vacas doadoras de embrião superovuladas foram alimentados com dietas enriquecidas com ácido linoleico ou linolénico (C18: 3 ω3), em comparação com uma fonte de AG saturados (THANGAVELU et al., 2007). Portanto, é plausível especular que a o aumento da ingestão de ácido linoleico pode afetar a composição de AG dos tecidos reprodutivos e, por sua vez, melhorar as taxas de concepção e de desenvolvimento embrionário. Isso poderia explicar a melhora na prnhez por IA observado em vacas leiteiras alimentados com sal de cálcio de AGCL (JUCHEM et al., 2008).

4.5.1 QUALIDADE OOCITÁRIA

Crescimento do folículo ovariano pode ser influenciado pelo estado nutricional e metabólico (GUTIÉRREZ et al., 1997; DISKIN et al., 2003). Este efeito é mediado por alterações nos metabólitos plasmáticos e hormônios, tais como a insulina e fator de crescimento semelhante à insulina -1 (IGF-1) (ARMSTRONG et al., 2001; FERGUSON et al;. 2006) e / ou fatores de hormônios de crescimento presentes no fluido folicular (LANDAU et al., 2000). A dieta pode afetar também a morfologia dos oócitos (O'CALLAGHAN et al., 2000), a capacidade de desenvolvimento de oócitos e a produção de embriões. Muitos estudos têm mostrado os efeitos nocivos do balanço energético negativo sobre os parâmetros reprodutivos de vacas leiteiras no pós-parto. Enquanto estiver no período não-lactante a superalimentação de animais também foi demonstrado ser prejudicial (MANTOVANI et al., 1993; PAPADOPOULOS et al., 2001), enquanto que a restrição alimentar em especial em animais previamente superalimentados poderiam ter um efeito positivo (Armstrong et al., 2001; McEvoy et al., 2001; Freret et al., 2006), sobre a qualidade dos oócitos e no desenvolvimento embrionário.

Ácidos graxos poliinsaturados constituem a maior parte do conteúdo de ácidos graxos do fluido folicular de folículos grandes e pequenos (HOMA et al., 1992). Alterando o teor de ácidos graxos total da dieta ocorre alteração sobre a distribuição de ácidos graxos nos tecidos reprodutivos (BILBY et al., 2006). A suplementação dietética em novilhas de corte com uma elevada inclusão de óleo de peixe (fonte rica de ácidos graxos n-3) aumentou significativamente a quantidade de AGPIs ω3 totais e a relação ω3: ω6 no fluido folicular (CHILDS et al., 2008), sendo que esta mudança foi fortemente correlacionado com o aumento dos níveis de ω3 no plasma sanguíneo. Tal alteração do perfil dos ácidos graxos no fluido folicular demonstrou que há influencia desses sobre o desenvolvimento de oócitos.

Alguns ácidos graxos podem ser prejudiciais, pois no caso do excessivo balanço energético negativo em vacas leiteiras de alta produção ocorre a determinação direta da causa do aumento da concentração de ácidos graxos não esterificados (AGNE) no soro e fluido folicular (LEROY et al., 2005). Um efeito prejudicial sobre o desenvolvimento dos oócitos foi mostrado por adição da mesma concentração de AGNE em oócitos "*in vitro*" (Leroy et al., 2005). Em contraste, os ácidos graxos poliinsaturados, tais como ω3 fornecido por sais de cálcio de óleo de peixe, influenciam a qualidade dos oócitos, onde foi observado melhora da integridade da membrana após a refrigeração (ZERON et al.,, 2002). Estes dados sugerem um efeito diferencial de ácidos graxos diferente no oócito, pode afetar a maturação do oócito e desenvolvimento embrionário subsequente.

No entanto, em termos de análise qualitativa e quantitativa de AG e teor de lipídios, os dados sobre oócitos ainda são limitadas, bem como o conhecimento sobre o metabolismo lipídico, durante a maturação do oócito (KIM et al., 2001; STURMEY et al., 2009). AGNE adicionados durante a maturação in vitro de oócitos de bovinos tiveram efeios transitórios sobre a qualidade embrionária. Marei et al. (2009) relataram que o ácido linolénico (18:3 ω3) pode melhorar a maturação do oócito bovino e do potencial desenvolvimento deste, melhorando a qualidade do blastocisto. Ácidos araquidónico (C20: 4 ω6) e eicosapentaenóico (C20: 5 ω3) também melhorou a qualidade de criopreservação e embrionária (MARQUES et al., 2007).

Vacas Leiteiras alimentas com uma dieta rica em sais de cálcio de óleo de palma (800 g / d) apresentaram aumento do número de blastocistos produzidos in vitro após aspiração de foliculos ovarianos por punção transvaginal (OPU), em comparação a uma dieta de baixa inclusão de sais de cálcio de óleo de palma (200 g /d) (FOULADI-NASHTA et al.,

2004). Além disso, o número de células de espermatozóides acessórios ligados à zona pelúcida foi maior (CERRI et al., 2004). Coletivamente, estes estudos indicam que vários ácidos graxos têm efeitos diferenciais sobre as respostas reprodutivas e pode afetar o desenvolvimento de oócitos e de embriões. Compreendendo que ácidos graxos possuem efeitos benéficos sobre o desenvolvimento dos oócitos e embriões, pode-se admitir que a alimentação com dietas ricas em ácidos graxos específicos pode aumentar a fertilidade.

4.5.2 QUALIDADE DE EMBRIÕES

Sabe-se que oócitos de vacas de alto mérito genético resultam em rendimentos de blastocisto significativamente mais baixos, independentemente do seu nível de produção de leite. Portanto, é de fundamental importância concentrar as atenção em oócitos e embriões de qualidade superior para caminhar no sentido de resolver o problema da infertilidade ou fertilidade em vacas de alta produção leiteira. Os recentes resultados de Veth et al. (2009) indicam que o desempenho reprodutivo de vacas leiteiras pode ser melhorada através da alimentação com suplementos de ácido linoléico conjugado durante o início da lactação.

Vários estudos indicam que a suplementação dietética com ácidos graxos insaturados podem melhorar a qualidade e desenvolvimento do embrião (SANTOS et al., 2008; SANTOS et al., 2009). Estes estudos foram fundamentados por estudos *"in vitro"* Marei et al. (2009). Incorporação de linolénico ao meio de maturação de oócitos aumentou a expansão do cumulus e desenvolvimento de células dos oócitos para methafase II.

A mortalidade embrionária durante o período de pré-implantação é um fator chave para a redução da fertilidade em bovinos, sendo que até 40% das perdas embrionárias totais ocorrem entre os dias 8-17 de gestação (THATCHER et al., 2001). Esta fase de perda embrionária coincide com os efeitos inibidores do interferon-Tau (IFN) produzido por células de embriões, controlando efeitos que determinam a liberação de prostaglandinas a partir do útero (FLINT et al., 1995; ROBINSON et al., 2006). Isto sugere que a proporção de embriões não conseguem inibir a liberação de prostaglandina (PGF2a) cuja induz à regressão do CL, redução na produção de progesterona (THATCHER et al., 1995) e interrupção da gestação (FLINT et al., 1995; ROBINSON et al., 2006). Consequentemente, a qualidade do embrião no período de pré-implantação e a sua capacidade de comunicação com as células do útero, são críticos eventos para a concepção e manutenção da prenhez.

Dietas ricas em ácidos graxos insaturados da família ω3 pode ter um efeito positivo pelo seu potencial de redução da secreção de PGF2α pelo útero e diminuição da sensibilidade do CL à PGF2α (SARTORI; MOLLO, 2007). Reduzindo a liberação de PGf2α após a IA, potencialmente melhora a fertilidade pela redução de perdas embrionárias causadas pela falha na supressão da liberação de PGF2α, durante o início da gestação (BINELLI et al., 2001). Além disso, durante essa fase, maiores concentrações circulantes de progesterona resultantes da suplementação com gordura podem auxiliar no desenvolvimento embrionário, incrementando a sua produção e secreção de interferon-t (MANN et al., 1999), prevenindo assim a luteólise e mantendo a gestação.

Zachut et al. (2010b) trabalharam com vacas leiteiras com média de 114 dias de lactação, onde compararam a influencia de dois produtos comerciais um rico em ácido graxo ω3 (E-FLAX 31,06% de C18:3); outro rico em ácido graxo ω6 (E- SUN 33,38% de C18:2), com uma dieta sem adição de ácidos graxos, sobre a quantidade e qualidade oócitária e embrionária. Os autores supracitados observaram um maior número de oócitos aspirados e uma maior taxa de clivagem dos embriões para a dieta contendo ácido ω3 em relação a controle, todavia observaram um menor número de oócitos de grau I para a dieta contendo ω6 em relação ao controle.

Trabalhando com um período maior (-25 a 80 dias pós-parto) de suplementação de fontes de ácidos graxos ω3 e ω6, com vacas de alta produção (38,45 kg/dia) Cerri et al. (2009a ou b), observaram melhor qualidade oócitaria e embrionária para as vacas que receberam fonte de ácido graxo ω3 em relação a ω6, sendo os índices obtidos sobre a qualidade embrionária satisfatórios para vacas leiteiras de alta produção.

4.5.3 DINÂMICA FOLICULAR

Mudanças em curto prazo no plano da nutrição tem demonstrado ter um efeito direto sobre a dinâmica folicular ovariana em rebanhos de bovinos, sem quaisquer alterações em concentrações circulantes de gonadotropinas (ARMSTRONG et al., 2003; WEBB et al., 2003). Postula-se que o sistema endócrino e metabólico sinaliza e regula o crescimento folicular como também influenciam no desenvolvimento de oócitos através de alterações nas concentrações de hormônios e/ou fatores de crescimento presentes no fluido folicular ou via interações nas células da granulosa dos oócitos (WEBB et al., 1999).

A regulação do crescimento folicular, mudanças em curto prazo da ingestão de energia da dieta influência a morfologia dos oócitos e potencial de desenvolvimento. A maior parte destes estudos foram realizados em ovinos, bovinos, novilhas ou vacas; até agora, os efeitos dos ácidos graxos na dieta sobre a qualidade dos oócitos em vacas leiteiras, que estão sob maior pressão metabólica, não foram totalmente esclarecidos. Os ácidos graxos são fontes ricas de energia e têm um papel importante na estrutura e função das membranas biológicas (CRIBIER et al., 1993).

Gorduras alimentares influenciam a função reprodutiva, ou por balanço de energia crescente (BUTLER; SMITH, 1989) ou por ações em processos reprodutivos que não estão relacionados à energia (Thatcher et al., 2003). A suplementação da dieta com a gordura tem sido demonstrada que aumenta o número total de folículos e estimulam o crescimento e o tamanho do folículo pré-ovulatório (LUCY et al.,, 1993; Mattos et al., 2000). Além disso, o aumento da disponibilidade de precursores ácidos graxos esta correlacionado ao aumento da secreção de esteroides e de eicosanoides, que podem alterar a função dos ovários e do útero e afetar a implantação do embrião (WANG et al., 2005).

4.6 INFLUENCIA DOS ÁCIDOS GRAXOS ω3 E ω6 SOBRE A FUNÇÃO IMUNE DE VACAS LEITEIRAS NO PERÍODO DE TRANSIÇÃO E INICIO DE LACTAÇÃO

A lactação impõe grande demandas metabólicas para vacas de alta produção no período de transição. Falhas para conseguir energia necessária para a produção de leite pelo consumo de energia resultam no balanço energético negativo, que pode ser acompanhado pelas desordens metabólicas como cetose e fígado gorduroso (GRUMMER, 1993). Estratégias de manejo e nutrição visam aumentar e estimular a via glicogênica a lipogênica, desta forma atenuando o balanço energético negativo (VAN KNEGSEL et al., 2007), diminuindo as concentrações de β-hidroxibutirato no plasma e o acúmulo de triglicerídeos no fígado, podem indicar diminuição de riscos de doenças metabólicas (ADLER, 1970; VAN KNEGSEL et al., 2005).

Adicionalmente o início da lactação tem sido relatado com o aumento de incidência de doenças infecciosas como mastite, endometrite e laminite (HEUER et al., 1999, COLLARD et al., 2000). Estas doenças tem sido reportadas como consequência de um

funcionamento sub-ótimo do sistema imune de vacas no período de transição (MALLARD et al., 1998), podendo ser ilustrada pela diminuição da proliferação mitogênica induzida de linfócitos (KEHRLI et al., 1989), redução da concentração sérica de IGg e IGm. (DETILLEUX et al., 1995; LACETERA et al., 2005), diminuição da resposta dos anticorpos (MALLARD et al., 1997), diminuição da quimiotaxia e expressão de moléculas de adesão em neutrófilos (KIMURA et al., 1999; Weber et al., 2001), bem como a própria capacidade reativa dos neutrófilos (KIMURA et al., 2002; HAMMON et al., 2006).

Estudos *in vitro* tem mostrado que corpos cetônicos afetam negativamente a capacidade quimiostática e proliferativa dos linfócitos (TARGOWSKI; KLUCINSKI, 1983; NONNECKE et al., 1992; SURIYASATHAPORN et al., 1999). Corpos cetônicos (FRANKLIN et al., 1991) e ácidos graxos não esterificáveis (LACETERA et al., 2004).são responsáveis pela diminuição da secreção mitogênica induzida de IGm pelos leucócitos *in vitro.*

As prostaglandinas são derivadas das membranas fosfolipídicas do ácido aracdônico (C20:4 ω6), que é sintetizado a partir dos ácido linoleico (C18:2 ω6) e ácido linolênico (C18:3 ω3). Nos primeiros 10 dias pós-parto há uma intensa secreção de PGF2α, evidenciado por concentrações plasmáticas de 13,14-dihidro- 15-ceto (um metabólito da PGF2α) (GUILBAULT et al., 1984),quando este metabólito atinge altas concentrações plasmáticas a incidência de doenças infecciosas em vacas no período de transição reduzem consideravelmente (SEALS et al., 2002; SILVESTRE et al., 2009). A síntese de PGF2α uterina promove aumento da quimiotaxia e fagocitose dos neutrófilos (HOEDEMAKER et al., 1992).

Assim dentro desta ótica os ácidos graxos ω6 e ω3 poli-insaturados tem sido demonstrados como importantes moduladores das reações imunes (CALDER et al., 2002). Dietas ricas nestes ácidos graxos modulam as respostas inflamatórias em modelos e em ensaios clínicos (STENSON et al., 1992). Em camundongos comendo dietas ricas em ácidos graxos ω3, as reações inflamatórias foram reduzidas quando comparadas ao ácido graxos ω6 (ALBERS et al., 2002). Mecanismos envolvidos na regulação da resposta imune não estão completamente entendidos, mas existe evidencia que os ácidos graxos ω6 e ω3 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 (CALDER et al., 2002).

O ácido linoleico (C18:2 ω6) pode ser convertido através de reações enzimáticas em ácido aracdônico.o qual é percursor de mediadores pró inflamatórios, e leucotrienos (B_4). A mesma elongase and dessaturase pode também converter o ácido linoleico (C18:3 ω3) em ácido eicosapentanoico (C20:5 ω3).o ácido eicopentanoico é percursor para a síntese de prostaglandina e_3 e o leucotrieno B_5 , que causa uma menor severidade da reação inflamatória do que a prostaglandina E_2 e o leucotrieno B_4 (YAQOOB; CALDER, 1995).

Estes mediadores lipidios agem com reguladores paracrinos e autocrinos através de uma família de receptores de transmembranas encontrados em muitas células, incluindo células imunes e citocinas indutoras pro inflamatórias tais como: TNF-α, interleucina-1 e interleucina- 6 (JAMES et al., 2000).

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 por células hospedeiras. Destruição intracelular subsequente do patógeno gera peptídeos que podem ser apresentadas em conjunto com MHC (complexo maior de histocompatibilidade) às células T, para iniciar a resposta imune adquirida ao patógeno. A fagocitose envolve a ligação do agente patogênico ou de organismos patogênicos por complemento ou anticorpo revestido a receptores na superfície do fagócito e subseqüente invaginação da membrana celular em torno do patógeno em ultima analise, de modo a formar um vacúolo fagocítico. Este é o local de digestão de patógenos com geração de peptídeos a serem apresentados às células T, para induzir a resposta imune adquirida.

Estudos in vitro tem claramente demonstrado que as alterações na composição dos fagócitos ácidos graxos da membrana estão associados com a capacidade fagocítica alterados (CALDER, 1998). Isto pode relacionar-se, em parte, a expressão alterada de receptores envolvidos na fagocitose, mas parece ser mais estreiramente relacionado com a natureza física da membrana, tal como sugerido por estudos in vitro com os macrófagos de murino (CALDER et al., 1990). Estes achados sugerem que os PUFAS, em geral, mas PUFAS altamente insaturados, em particular, vai aumentar a absorção do material do alvo pelos fagócitos. Estudos de dieta de influência do aumento da ingestão de n-3 PUFAS 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. Estudos que investigam o número ou a proporção de fagócitos envolvidos no engolfamento do material alvo não são propensos a ver um efeito de PUFAS, pois é pouco provável que tal manipulação de células irá parar completamente de se envolverem no processo ou para induzir a ação de anteriormente totalmente células inativas. O que pode ser afetada pela exposição de PUFA é a extensão da atividade fagocitária, ou seja, a quantidade de material de alvo envolvido por aquelas células que estão ativas. A citometria de fluxo tornou possível comparar cuidadosamente a atividade fagocítica ou a capacidade das células, enquanto avaliam a percentagem de células ativas. Investigações no sangue humano após absorção de etiquetas fluorescentes com *E. Coli* ao longo de um curto período de tempo indica que a maior parte dos neutrófilos (80% em média) e cerca de 25% (em média) de monócitos são ativos em voluntários saudáveis. A atividade fagocítica das células ("intensidade média de fluorescência" de células envolvidas na fagocitose) foi relacionada com a composição de ácidos graxos de células mononucleadas no sistema imune (KEW et al., 2003a), e foi assumido que este era idêntico ao de ambos os monócitos e neutrófilos (GIBNEY; HUNTER, 1993). Verificou-se que a atividade fagocítica de neutrófilos e monócitos foi negativamente correlacionado com o teor de ácido palmítico e com a proporção de saturação de ácidos graxos poliinsaturados e positivamente correlacionada com o teor de ácidos graxos poliinsaturados individuais, vários PUFAS totais, ω6 ácidos graxos poliinsaturados totais e ω3 (KEW et al., 2003a). É interessante notar que a atividade fagocitária foi negativamente correlacionado com a taxa de ω6 para ω3 PUFAS sugerindo que estas últimas são superiores em termos de aumentar a atividade fagocitária. Se este for o caso, as membranas das células fagocíticas enriquecidas com ω3 PUFAS, por exemplo, por ingestão oral, deve aumentar a atividade dos fagócitos. De fato, a ingestão de 1,5 g de EPA mais DHA/ dia durante 6 meses por voluntários humanos saudáveis foi encontrado para aumentar a atividade fagocítica de neutrófilos em cerca de 40 % e a atividade fagocítica de monócitos por cerca de 200% (KEW et al., 2003b).

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 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-l), CD11b (MAC-1), eCD11c (P150-95). Entre as moléculas de adesão reguladas pelas células endoteliais de superfície em resposta a citocinas e outros estímulos inflamatórios, tais como lipopolissacarídeos e espécies reativas de oxigênio, são células de adesão vascular molécula-1 (VCAM-1), E-selectina, célula de adesão intercelular molécula-1 (ICAM-1). Além disso ICAM-1 é também expressa em monócitos, macrófagos e linfócitos (SILVESTRE, 2008).

A L-selectina (CD62L) expressa na superfície dos neutrófilos sanguíneos é crítica para a saúde animal, porque 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 egressar 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 (WEBERET al., 2001), resultando em neutrofilia 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 neutrofilia.

A aderência de neutrófilos humanos para placas de 96 poços pré-revestidos com soro autólogo foi medida para os neutrófilos pré-incubadas por 30 min com DHA, EPA, ácido araquidonico e dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPC). Cada ácido graxo foi solubilizada em DPC. Na aderência 10 µm de concentração e 5 x 10^5células/ ml, todos os ácidos graxos aumentaram em comparação ao DPC. O ácido araquidônico teve um efeito maior do que o ω-3. Os tempos de incubação foram testados de 0 a 50 minutos em incrementos de 10 minutos. a co-incubação de 80 µM de ácidos graxos com neutrófilos demonstraram que a resposta de adesão obtida

com ácido araquidonico foi semelhante ao TNF-α, uma conhecida citocina pró-inflamatória. o EPA e o DHA tiveram efeitos menores por serem intermediários entre o ácido araquidonico e DPC, e o ácido araquídico (C20:0) e a solução de Hanks balanceada indicou que a família de ácidos graxos ômega induz respostas diferenciadas sobre a adesão de neutrófilos (BATES et al., 1993).

Respostas diferenciadas de ácidos graxos ω-3 podem ser devido a uma 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, um indutor fraco da inflamação e fraco agente quimiostático. No entanto, os efeitos do ácido araquidónico podem ser diretos e independentes da conversão em seus derivados: 1) neutrófilos incubados com derivados do ácido araquidonico hidroperoxi-C20:4 (C20:4 HP), hydroxi-20:4 (C20:4 H) não aumentaram a adesão de neutrófilos em cultura quando comparados com apenas o veículo e teve um efeito menor do que o ácido araquidonico, e 2) a inibição da lipoxigenase com ácido cafeico ou ciclo oxigenase com indometacina com neutrófilos antes da adição de ácido araquidonico não preveniu os efeitos do ácido araquidonico na aderência de neutrófilos (BATES et al., 1995).

Curiosamente, os neutrófilos humanos incubados com ácido araquidonico induziram maior distanciamento das células da veia umbilical humana e induziram uma maior desgranulação de neutrófilos, medidos pela liberação de grânulos azurófilos, do que quando incubadas com veículo sozinho ou com C18:0, C18:1n-9, C18:2n-6, C18:3n-6, C18:3n-3, C18:4n-3. Os efeitos de EPA e DHA não foram testados (BATES et al., 1995).

Resultados similares apresentados em vacas de leite podem estar relacionados ao menor risco de retenção de membranas fetais (KIMURA et al., 2002) e metrite (SEALS et al., 2002) no período pós-parto, que é quando neutrófilos tem maior atividade funcional no pré-parto e quando PGFm, subproduto de oxidação do ácido araquidonico, é alta (SEALS et al., 2002).

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 01 de março a 20 de dezembro de 2011.

Foram utilizadas 56 vacas Holandesas durante o período supracitado, porém visto enfermidades metabólicas ou infecciosas, não relacionadas às dietas experimentais 14 animais foram retirados dos grupos experimentais. Foram selecionadas 42 vacas da raça Holandesa, multíparas e gestantes, com parto previsto para 35 dias após o início da avaliação e fornecimento das dietas experimentais. Os animais foram avaliados durante o período pré-parto, ao parto, e até o 84º dia de lactação. As vacas foram alojadas em estábulo tipo “free-stall”, providos de baias individuais, sendo ordenhadas mecanicamente duas vezes ao dia.

Os animais selecionados apresentaram características semelhantes entre si, para melhor distribuição nos tratamentos avaliados. As variáveis a serem utilizadas para a seleção dos animais são: produção de leite na lactação anterior; peso corporal aos 30 dias pré-parto; ordem de partos; duração do período seco; duração do intervalo de partos; e escore de condição corporal 30 dias antes do parto.

5.2 DIETAS EXPERIMENTAIS E ANÁLISE DE ALIMENTOS

Os animais foram distribuídos aleatoriamente para receber uma dos quatro tratamentos experimentais, fornecidas a partir de 35 antes da data prevista para o parto até 84 dias do pós-parto: controle (n=11) (C): dieta sem adição de gordura; semente de linhaça

(n=10) (SL): inclusão de 60 a 80 g/kg de MS (fonte de ϖ 3); grão de soja cru integral (n=11) (GS): inclusão de 120 a 160 g/kg de MS (fonte de ϖ 6); sais de cálcio de acidos graxos insaturados (Megalac-E) (n=11) (SC): inclusão de 24 a 32 g/kg de MS (fonte comercial de ϖ 6).

As dietas experimentais contendo fontes de gordura apresentaram a mesma concentração de ácidos graxos insaturados, porém o perfil de ácidos graxos das fontes foi diferente.

As dietas experimentais foram fornecidas a partir de 35 dias da data de parto prevista, sendo fornecida até 84 dias após o parto. As dietas foram formuladas conforme as recomendações do NRC (2001) para cada período (pré e pós-parto) e nível de produção de leite estimado durante o início da lactação, sendo esta produção baseada em registros de produção anteriores. As respectivas dietas e água foram fornecidas "*ad libitum*" durante todo período experimental.

Foram realizadas análises químico-bromatológicas dos ingredientes da dieta de acordo com os procedimentos da AOAC, (2000) (Tabelas 1, 2 e 3). As análises químico-bromatológicas foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do LPBL-VNP-FMVZ - USP, em Pirassununga, em seguida, foram formuladas as dietas experimentais. A dieta C foi calculada para oferecer aproximadamente 3,0% de extrato etéreo (%MS), enquanto que a dieta SL, GS e SC foram calculadas para oferecer aproximadamente 4,5% de extrato etéreo (%MS), período pré-parto e 5,5% extrato etéreo nos período pós-parto. O volumoso utilizado no pré-parto foi à silagem de milho, e no período pós-parto a foi utilizado feno de *tifton-85* e silagem de milho como volumoso (Tabelas 4 e 5).

Antes do parto previsto, os animais selecionados foram manejados em estábulo tipo "free-stall" com baias individuais, de acordo com as dietas experimentais. No momento imediatamente anterior ao parto os animais foram alojados em piquetes de *Coast- cross* e, após 24 horas do parto, retornando novamente ao estábulo "free-stall" nas dependências do LPBL. Após o parto, todos os animais foram alojados no mesmo local até o final do período experimental (84 dias pós-parto). O fato dos animais serem manejados em estábulo tipo "free-stall" com baias individuais permite o controle do consumo e a correta administração das dietas experimentais.

Tabela 1 - Composição químico-bromatológica dos ingredientes

Nutrientes[1]	Ingredientes						
	Farelo de soja	Milho fubá	Grão de soja	Semente de linhaça	Sais de cálcio	Feno tifton	Silagem de milho
Matéria seca (%MN)	83,50	84,45	85,30	85,70	97,00	89,78	35,51
Matéria orgânica (%MS)	93,12	97,12	94,72	95,78	79,78	93,61	94,74
Proteína bruta (%MS)	49,97	8,98	38,03	22,21	-	9,40	6,60
NIDN (%NT)	6,02	8,65	12,78	15,16	-	15,16	17,89
NIDA (%NT)	2,26	3,63	6,04	7,22	-	7,22	11,34
Extrato etéreo (%MS)	2,79	3,19	24,18	34,51	84,12	1,97	2,90
CNF (%MS)	29,17	69,58	10,61	20,34	-	8,54	29,73
FDN (%MS)	11,19	10,37	21,90	18,72	-	73,70	55,51
FDA (%MS)	6,78	3,40	7,44	7,16	-	31,10	25,95
Lignina (%MS)	2,22	2,14	3,06	3,89	-	7,35	5,56
FDAi (%MS)	0,40	0,74	0,37	2,78	-	13,76	16,06
Cinzas(%MS)	6,88	8,88	5,28	4,22	20,22	6,39	5,26
NDT[2]	79,85	86,34	115,49	129,27	182,27	52,17	64,14
EL_L(Mcal/kg MS)	2,31	2,20	2,74	3,33	3,94	1,89	1,87

[1]MN = matéria natural; MS= matéria seca; NT= nitrogênio total; [2] Estimado pelas equações do NRC (2001).

Tabela 2 - Composição percentual dos concentrados experimentais

Ingredientes (% MS)	Concentrados experimentais							
	Pré-parto				Pós-parto			
	C[1]	SL[2]	GS[3]	SC[4]	C[1]	SL[2]	GS[3]	SC[4]
Milho moído	61,32	48,48	50,99	52,09	52,67	43,83	45,00	47,21
Farelo de soja	31,22	23,25	-	33,58	40,29	34,51	18,39	41,71
Semente de linhaça	-	20,72	-	-	-	14,61	-	-
Megalac-E	-	-	-	8,42	-	-	-	5,79
Grão de soja	-	-	41,46	-	-	-	29,50	-
Uréia	3,32	3,32	3,32	3,32	0,64	0,64	0,64	0,64
Sulfato de amônia	0,44	0,44	0,44	0,44	0,13	0,13	0,13	0,13
Bicarbonato de sódio	-	-	-	-	1,90	1,90	1,90	1,90
Óxido de magnésio	-	-	-	-	0,31	0,31	0,31	0,31
Fosfato bicálcico	0,37	0,37	0,37	0,37	1,24	1,24	1,24	1,24
Calcáreo	1,37	1,37	1,37	-	1,82	1,82	1,82	-
Premix microminerais[6]	0,82	0,82	0,82	0,82	0,40	0,40	0,40	0,40
Premix vitminico[5]	0,55	0,55	0,55	0,55	-	-	-	-
Sal comum	0,68	0,68	0,68	0,68	0,60	0,60	0,60	0,60

[1]Controle; [2]Semente de linhaça; [3] Grão de soja cru e integral; [4]Sais de cálcio de ácidos graxos insaturados; [5]Composição por kg do produto: Vit, A- 8000UI; vit E – 50000mg; vit D – 2300UI. [6]Composição por kg do produto: Mg-10g; S-9g;; Zn-23,750mg; Cu-5625mg; Mn-18125mg; Fe-5,000mg; Co-125mg; I-312mg; Se-144mg; F (máx,) 900mg; vit, A- 2000UI; vit E – 12500mg; vit D – 5000UI.

Tabela 3 - Composição químico-bromatológica, analisada dos concentrados experimentais

Nutrientes[5]	Concentrados experimentais							
	Pré-parto				Pós-parto			
	C[1]	SL[2]	GS[3]	SC[4]	C[1]	SL[2]	GS[3]	SC[4]
Matéria seca (%MN)	85,18	85,65	85,96	86,20	84,95	85,33	85,50	85,38
Matéria orgânica (%MS)	88,76	88,81	89,02	88,51	88,88	88,92	89,05	89,49
Proteína bruta (%MS)	28,28	27,70	27,58	28,69	25,98	25,60	25,54	26,23
NIDA (%NT)	4,62	3,83	4,26	4,48	5,05	4,48	4,81	4,97
NIDN (%NT)	4,99	3,55	4,08	3,84	4,47	4,31	4,72	4,52
Extrato etéreo (%MS)	2,83	9,35	9,99	9,68	2,80	7,40	7,90	7,54
FDN (%MS)	8,38	10,34	10,66	7,91	8,61	10,01	10,32	8,35
FDA (%MS)	4,20	4,71	4,82	4,05	4,52	4,88	5,06	4,43
Lignina (%MS)	1,75	1,85	1,72	1,61	1,74	1,83	1,63	1,66
FDAi (%MS)	0,58	0,67	0,72	0,52	0,55	0,62	0,65	0,52
Cinzas(%MS)	11,24	11,19	10,98	11,49	11,12	11,08	10,95	10,51
CNF (%MS)	49,28	41,41	40,78	42,23	51,49	45,90	45,29	47,37
NDT	76,26	83,71	84,52	84,54	75,52	81,17	81,58	82,41
EL_L(Mcal/kg MS)	2,07	2,29	2,26	2,25	2,09	2,24	2,22	2,23

[1]Controle; [2]Semente de linhaça; [3] Grão de soja cru e integral; [4]Sais de cálcio de ácidos graxos insaturados;[5] MN = matéria natural; MS= matéria seca; NT= nitrogênio total.

As vacas que receberam a dieta SL, GS e SC foram alimentadas com a dieta Controle durante uma semana anteriormente ao início do período experimental, com substituição parcial da dieta controle pelas dietas com adição de gordura, na proporção de 20% ao dia até chegar a 100% destas dietas. Foi considerado o primeiro dia experimental quando as vacas estiverem comendo 100% da dieta contendo gordura suplementar. As vacas durante o período pré-parto ficaram no mínimo 4 semanas recebendo as dietas experimentais antes do parto previsto.

Os animais foram arraçoados de acordo com o consumo de matéria seca no dia anterior, de forma a ser mantido o porcentual 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 -20º C. Semanalmente as amostras coletadas diariamente foram misturadas e foi retirada amostra composta referente a um período de uma semana. Posteriormente, foram realizadas análises químico-bromatológicas nas amostras armazenadas.

Tabela 4 - Composição percentual das dietas experimentais

Ingredientes (% MS)	Dietas experimentais							
	Pré-parto				Pós-parto			
	C[1]	SL[2]	GS[3]	SC[4]	C[1]	SL[2]	GS[3]	SC[4]
Silagem de milho	70,76	71,14	71,13	71,26	40,13	39,98	40,01	39,99
Feno de tifton	-	-	-	-	5,04	5,06	5,02	5,03
Milho moído	17,90	13,99	14,72	14,97	28,88	24,00	24,41	25,90
Farelo de soja	9,13	6,71	-	9,65	22,09	18,90	9,98	22,89
Megalac-E	-	-	-	2,42	-	-	-	3,18
Semente de linhaça	-	5,98	-	-	-	8,00	-	-
Grão de soja	-	-	11,97	-	-	-	16,01	-
Uréia	0,97	0,97	0,97	0,97	0,35	0,35	0,35	0,35
Sulfato de amônia	0,13	0,13	0,13	0,13	0,07	0,07	0,07	0,07
Bicarbonato de sódio	-	-	-	-	1,04	1,04	1,04	1,04
Óxido de magnésio	-	-	-	-	0,17	0,17	0,17	0,17
Fosfato bicálcico	0,08	0,08	0,08	-	0,68	0,68	0,68	0,68
Calcáreo	0,41	0,41	0,41	-	1,00	1,00	1,00	-
Premix micominerais[5]	0,25	0,25	0,25	0,25	0,22	0,22	0,22	0,22
Premix vitminico[6]	0,16	0,16	0,16	0,16	-	-	-	-
Sal comum	0,24	0,24	0,24	0,24	0,33	0,33	0,33	0,33

[1]Controle; [2]Semente de linhaça; [3] Grão de soja cru e integral; [4]Sais de cálcio de ácidos graxos insaturados; [5]Composição por kg do produto: Vit, A- 8000UI; vit E – 50000mg; vit D – 2300UI.[6]Composição por kg do produto: Mg-10g; S-9g;; Zn-23,750mg; Cu-5625mg; Mn-18125mg; Fe-5,000mg; Co-125mg; I-312mg; Se-144mg; F (máx,) 900mg; vit, A- 2000UI; vit E – 12500mg; vit D – 5000UI ,

Nas amostras de sobras, alimentos fornecidos e fezes foram determinados os teores de matéria seca (MS), matéria orgânica, nitrogênio total (Kjehldal), cinzas e extrato etéreo, de acordo com as metodologias descritas pela AOAC (2000). Nas amostras dos alimentos fornecidos e nas sobras também foram avaliados o nitrogênio insolúvel em detergente neutro, nitrogênio insolúvel em detergente ácido e lignina de acordo com as metodologias descritas pela AOAC (2000). O teor de proteína bruta foi obtido pela multiplicação do teor de nitrogênio total por 6,25. Os teores de fibra detergente neutro (FDN) e fibra detergente ácido foram obtidos conforme método descrito por Van Soest et al. (1991), utilizando-se α-amilase e sem adição de sulfito de sódio na determinação do FDN.

Tabela 5 - Composição químico-bromatológica, das dietas experimentais

Nutrientes[5]	Dietas experimentais							
	Pré-parto				Pós-parto			
	C[1]	SL[2]	GS[3]	SC[4]	C[1]	SL[2]	GS[3]	SC[4]
Matéria seca (%MN)	50,89	51,03	51,13	51,20	65,11	65,32	65,41	65,35
Matéria orgânica (%MS)	93,06	93,07	93,14	92,98	91,52	91,54	91,61	91,85
Proteína bruta (%MS)	13,23	13,10	12,99	13,35	17,47	17,26	17,23	17,61
NIDN (%NT)	10,55	10,12	10,27	10,20	8,31	8,22	8,44	8,33
NIDA (%NT)	5,70	5,47	5,60	5,66	5,57	5,25	5,44	5,52
Extrato etéreo (%MS)	2,88	4,83	4,53	4,93	2,48	5,33	5,60	5,41
CNF (%MS)	38,19	35,79	36,17	36,08	42,39	38,99	38,65	39,80
FDN (%MS)	38,76	39,35	39,45	38,62	29,19	29,96	30,13	29,04
FDA (%MS)	20,34	20,49	20,52	20,29	15,08	15,28	15,38	15,03
Lignina (%MS)	4,78	4,81	4,09	4,05	3,76	3,80	3,70	3,71
FDAi (%MS)	11,40	11,43	11,44	11,64	7,41	7,44	7,46	7,39
Cinzas (%MS)	6,94	6,93	6,86	7,02	8,48	8,46	8,39	8,15
NDT	68,06	70,30	70,54	70,55	70,02	73,13	73,35	73,81
EL_L (Mcal/kg MS)	1,55	1,72	1,71	1,70	1,71	1,89	1,88	1,89

[1]Controle; [2]Semente de linhaça; [3] Grão de soja cru e integral; [4]Sais de cálcio de ácidos graxos insaturados.[5] MN = matéria natural; MS= matéria seca; NT= nitrogênio total.

Os carboidratos totais foram calculados conforme metodologia descrita por Sniffen et al. (1992), os teores de carboidratos não-fibrosos foram calculados como proposto por Hall (2000) e os nutrientes digestíveis totais (NDT) foram calculados segundo Weiss (1999). Foi avaliado o consumo de matéria seca, proteína bruta, fibra, extrato etéreo, carboidratos totais e não-fibrosos, consumo de NDT e energia líquida (calculados segundo o NRC (2001). Por meio da avaliação do consumo de nutrientes, e da estimativa das exigências nutricionais, foi calculado o balanço de energia segundo o NRC (2001).

5.3 DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL

Para a determinação da digestibilidade aparente dos nutrientes foram avaliados diferentes períodos, com concomitante coleta de fezes. No período pré-parto foi coletada amostra de fezes 28 e 14 dias antes da data de parto previsto, e, no período pós-parto, foram coletadas amostras de fezes aos, 21, 42 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 forcada (60ºC/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).

Antes da incubação das amostras, dois novilhos foram adaptadas durante 7 dias com ração a base de farelo de soja e milho moído, e recebendo silagem de milho como volumoso. Posteriormente ao período de adaptação dos animais, as amostras foram incubadas no rúmen por período de 240 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 conduzidos à estufa de ventilação forçada (60º/72 horas). Após este período, os sacos foram submetidos à secagem em estufa não ventilada (105º/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, feno, 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, a silagem de milho e o feno de tifton (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

mantença (ELm) e mudança de peso de corpo vazio (MPCV) foram calculados de acordo com as equações do NRC (2001), a seguir: CEL (Mcal/dia) = 0,703 × EM (consumo) − 0,19 + {[(0,097 × EM (consumo) + 0,19)/97] × [EE − 3]}; EM (consumo) = 1,01 × (ED (consumo) − 0,45] + 0,0046 × (EE − 3) onde: EM = energia metabolizável; EE = extrato etéreo; ED = energia digestível. EL_g = 2,7*MPCV*0,65. EL_G = 0.00318*(240+ dias para o parto)-0.0352)*(peso do bezerro ao nascimento/45)/0.218. ELm =0,08*$PC^{0,75}$.

Os valores de energia metabolizável (EM) foram obtidos pela seguinte fórmula: EM (Mcal/kg) = [1,01 * {(%CNF/100) *4,2+ (%fDN/100) *4,2 + (%PB/100) *5,6 + (%AG/100) * 9,4 - 03)}-0,45] + 0, 0046 * (EE-3,0).

Para o cálculo de energia digestível (ED) dos suplementos de gordura com e sem glicerol foram utilizadas a seguintes fórmulas: com glicerol ED (mcal/dia) = [{9,4 * DAG *0,9*(EE/100)} + (4,3*0,1*(EE/100)}]; sem glicerol ED (mcal/dia) = 9,4 * DAG * (EE/100), onde: DAG = digestibilidade dos ácidos graxos.

Os valores de energia líquida de produção (EL_p) foram calculados segundo a fórmula: EL_p (Mcal/dia) = produção de leite (kg) × (0,0929 × G% + 0,0563 × PV% + 0,0395 × 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* PV. A energia líquida de ganho foi calculada através da fórmula: EL_g = 1,42 em – 0,174*em + 0,0122*em*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 (consumo) – EL (ganho PV) – EL (leite); eficiência lactação = EL produção de leite + EL ganho de PV)/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 10 ml foram retiradas e diluídas imediatamente e armazenadas a –15 ^oC para posteriores análises de nitrogênio total e creatinina.

O volume urinário total diário foi estimado dividindo-se as excreções urinárias diárias de creatinina pelos valores observados de concentração de creatinina na urina, segundo Valadares Filho e Valadares (2001). A excreção urinária diária de creatinina foi estimada a

partir da proposição de 24,05 mg/kg de peso vivo (PV) de creatinina (CHIZZOTTI, 2004). O balanço de compostos nitrogenados (BN) foi obtido pela diferença entre o total de nitrogênio ingerido (N-total) e o total de nitrogênio excretado nas fezes (N-fezes), na urina (N-urina) e no leite (N-leite). A determinação do nitrogênio total nas fezes e na urina foi feita segundo metodologia descrita pela AOAC (2000).

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 composicao 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 6ºC, e encaminhadas para o Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Animal (LBFA) do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (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 3; 4 a 6; 7 a 9 e 10 a 12, totalizando 4 amostras por vaca ao longo das 12 semanas de lactação. Para o processo de extração, as amostras foram centrifugadas a 17.800 x g por 30 minutos a 4 ºC e próximo a 19.300 x g por 20 minutos a 4 ºC, 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 et al. (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 ºC por 4 minutos (13ºC/minuto) até chegar a 175ºC, mantendo por 27 minutos. depois, um novo aumento de 4°C/minuto, foi iniciado até 215°C, mantendo durante 31 minutos. hidrogênio (H_2) 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 a intervalos quinzenais, 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 rpm durante 15 minutos e a 5ºC, para a separação do soro. O plasma obtido foi transferido para tubetes plásticos, identificados e armazenados a -20ºC, até o procedimento das análises laboratoriais.

As análises laboratoriais dos metabólitos plasmáticos foram realizadas por meio de kits comerciais, que utilizam o método enzimático 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 o LPBL-VNP-FMVZ-USP.

5.10 DINÂMICA FOLICULAR

A atividade ovariana foi avaliada em todos os animais do experimento, sendo utilizando um aparelho de ultrassom portátil da marca Mindray (DP – 2200bVet), campus de Pirassununga. A ultra-sonografia foi realizada via transretal, diariamente, iniciando após o 14º dia até o 72º dia pós-parto, pela manhã, antes do fornecimento das dietas.

Foram avaliadas por scaneamento o número total de folículos, folículos de classe 1 (<3mm), classe 2 (3-5mm), classe 3 (6-9mm), classe 4 (10-15mm), classe 5 (>15mm) , numero de corpos lúteo, área do corpo lúteo (mm^2).

5.11 QUALIDADE OOCITÁRIA E EMBRIONÁRIA

O procedimento de OPU foi realizado em dois períodos, uma aspiração foi realizada entre a 35± 7 dias de lactação e outra aspiração por volta da 60±7 dias de lactação, visando à otimização do número de vacas a serem aspiradas em um único dia. As variáveis mensuradas na OPU foram número total de oócitos aspirados, oócitos de grau I, II e III, número de oócitos viáveis, degenerados e atrésicos. Na avaliação da qualidade embrionária foi 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 OPU foram realizadas com aparelho portátil de ultra-som, equipado com transdutor endocavitário micro-convexo mulifrequencial , 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 a 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 l 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 do animal 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 irá variar 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 procederá a remoção manual de fezes da ampla 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 opu. 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 biopsia 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 OPU, 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. Seguir-se-á a aspiração transpassando-se 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 OPU de cada animal o tubo contendo o líquido aspirado foi trocado, identificado com a ordem da aspiração e RGD 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 CCO.

Os critérios considerados para a avaliação dos CCO 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, consequentemente, aproveitados para FIV somente os oócitos classificados como graus I, II e III, enquanto os demais, que não apresentarem 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 FIV.

A fase de produção *in vitro* foi totalmente executada em laboratório de PIVE, 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 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 permanecerão incubados durante 22 a 24 horas a 38,5°C, em atmosfera de 5% de CO_2 em ar e com máxima umidade (WATANABE et al., 1998a,b).

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 $2{,}0x10^6$ espermatozóides/ml e os gametas permanecerão incubados nas microgotas, durante um período de 18 a 20 horas a 38,5°C, em atmosfera de 5% de CO_2 em ar.

Após os procedimentos de MIV e FIV, os possíveis zigotos foram lavados e transferidos para microgotas com 50 µl de meio Cr_2 modificado e suplementado com 10% SFB, 30 mg BSA/ml, acrescido de aminoácidos essenciais e não essenciais (WATANABE et al., 1999), onde permaneceram em desenvolvimento embrionário por sete dias, em incubadora a 38,5°c, com 5% de co_2 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.

5.12 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 a temperatura ambiente. As análises de fagocitose foram agrupadas nos seguintes tempos -28, -21, -7, parto (+ 24 horas), 7, 14, 21, 28, 56 e 84. A quantificação da intensidade da fagocitose e adesão de celular foram agrupadas nos tempos -28, -21, -7, parto (+ 24horas), 7, 14, 21 e 28.

No laboratório, as amostras de foram centrifugadas a velocidade de 1.500 rpm por 30 min para obtenção da camada leucocitária. A camada leucocitária foi coletada e transferida para um tubo cônico de 50 ml. As células vermelhas do sangue foram lizadas pela adição de 30 ml de solução de lise [0.37 g EDTA dissódico; 0.80 g cloreto de amônio (NH_4CL) e 0.84 g bicarbonato de sódio ($NAHCO_3$)] por 5 min.

Em seguida, 15 ml de DPBS (dubelco´s phosphate buffer solution) foram adicionados nos tubos e em seguida centrifugados 1.600 rpm por 15 min. O pellet de células foi coletado a viabilidade e concentração celular foi determinada pela técnica de exclusão de azul de tripan e utilizando um hematocitometro e ajustada para $1x10^6$ células/ml. Específicos protocolos de marcação celular para citometria de fluxo foram utilizados e as amostras foram analisadas no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em Pirassununga São Paulo.

Resumidamente, $5x10^6$ foram pipetadas em tubos de polietileno de 13x100 mm, lavados duas vezes em tampão FACs e ressuspendido em menor volume. As células foram incubadas com o anticorpo primário para análise das células T helper ($CD4^+$); células T citótoxico ($CD8^+$); T reguladora ($CD25^+$); monócito/macrófagos ($CD14^+$) e neutrófilos (CD62L) por 30 min a temperatura ambiente. As células foram lavadas uma vez com 1 ml tampão FACs para a retirada do excesso de anticorpo.

As células foram incubadas com o anticorpo secundário (γδ) marcado com AlexaFluor 488 ou AlexaFluor R-PE por 30 min. Mais uma vez as células lavadas com tampão FACS e fixadas com solução 4% de paraformaldeido.

A análise de capacidade fagocítica dos leucócitos, macrófagos e neutrófilos foiram avaliadas pelo método pHrodo O pHrodo™ é um kit de partículas por citometria de fluxo, que permite a marcação rápida de partículas biológicas, tais como as bactérias e de avaliação da atividade fagocitária em amostras de sangue total por citometria de fluxo. O pHrodo ™ é um ensaio à base de corante que proporciona uma detecção sensível sem a necessidade de reagentes de extinção e passos de lavagem adicionais, poupando tempo e eliminando a incerteza de se os sinais derivam de partículas internalizadas. O kit inclui reagentes necessários para identificar as bactérias que serão fagocitadas, avaliando a ingestão de partículas, e a lise de células vermelhas do sangue, utilizando um corante novo fluorogénico que aumenta drasticamente a fluorescência a medida que o pH do seu ambiente torna-se mais ácido. O sistema pHrodo ™ à base de corante único mede a atividade fagocitária baseado na acidificação das partículas à medida que são ingeridos, eliminando a

lavagem e outra etapas que são necessárias com os indicadores não fluorogénico de absorção bacteriana.

Resumidamente, o pHrodo™ é ensaio de fagocitose fluorescente que investiga a interação, internalização e atividade fagocitária de células em suspensão. A função fagocítica dos leucócitos polimorfos mononucleares e macrófagos foi avaliada no sangue total pela exposição de sangue heparinizado a partículas marcadas de pHrodo™ por pelo menos 15 min a 37ºC. Uma amostra controle contendo todos os reagentes é incubada no gelo. As células vermelhas do sangue foram lizadas com o tampão de lise seguida centrifugação seguida de lavagem dos debris celulares. O pellet celular final contendo as células brancas do sangue é resuspendido em tampão FACS e é analisado por citometria de fluxo equipado com laser de argônio a 488nm.

5.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foi utilizado delineamento inteiramente ao acaso, com os animais distribuídos aleatoriamente, de acordo com as dietas experimentais (controle, semente de linhaça, grao de soja e sais de calcio de acidos graxos insaturados). 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 analizadas pelo procedimento PROC MIXED do SAS (SAS, 2004), utilizando seguinte modelo:

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

Onde: μ = média avaliada, D_i= efeito fixo de dieta; S_j= efeito fixo de semana (semanas); $D_i(T_j)$= interação semana * dieta; 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 -4, -3 -2, -1 semanas em realação ao parto, e no pós parto as semanas 1 a 12 em relação ao parto. O efeito de animal foi considerado como aletotorio em todos os modelos.

Essas variáveis foram analisadas pelos seguintes contrastes ortogonais (C *vs* SL + GS +SC); (GS *vs* SC) e (SL *vs* GS+SC), foram utilizados para as análises entre os tratamentos, utilizando-se o um nível de 5% de significância.

Na análise do peso, mudança de peso corporal a medida realizada aos 35 dias pré-parto e foram utilizados como covariáveis no modelo, em nível de 5% de probabilidade, nos períodos pré e pós-parto, respectivamente.

As análises de dinâmica folicular foram analisadas pelo PROC MIXED do SAS (SAS, 2004) utilizando o seguinte modelo:

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

Onde: μ = média avaliada, D_i= efeito fixo de dieta; T_j= efeito aleatório de tempo (dias de ultrassonografia); $D_i(T_j)$= interação tempo * dieta; e_{ij} =erro aleatório.O modelo acima foi utilizado para as análises do dia 14 ao 72 dias de lactação.

As análises de qualidade oocitária e embrionária e de dinamica folicular foram analisadas de acordo com o PROC MIXED do SAS (SAS, 2004) utilizando o seguinte modelo:

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

Onde: μ = média avaliada, D_i= efeito fixo de dieta; A_j= efeito aleatório de tempo (dias da aspiração folicular); $D_i(A_j)$= interação aspiração folicular * dieta; e_{ij} =erro aleatório.O modelo acima foi utilizado para as análises nos dias das aspirações foliculares dias 35±7 e dias 65±7 dias de lactação.

As variáveis reprodutivas foram analisadas pelos contrastes ortogonais. Foram utilizados para as análises entre os tratamentos, utilizando-se o um nível de 5% de significância.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 CONSUMO DE MATÉRIA SECA E NUTRIENTES

No período pré-parto foi observado efeito (P<0,05) de dieta para o consumo de matéria seca (CMS), orgânica (CMO), EE (CEE) e CNF (CCNF) (kg/dia). Foi observado efeito (P<0,05) de tempo (semanas), para o CMS, CMO, consumo de PB (CPB), CEE, FDN (CFDN), CCNF, NDT (CNDT) (kg/dia) e CMS e CFDN (%PC) (Tabela 6).

Quando foram avaliados os contrastes ortogonais foi observado efeito (P<0,05) do C1 para CEE (Figura 2A) e CCNF (Figura 3A), onde foi observado maior consumo de EE para as dietas suplementadas com as fontes de ácidos graxos em relação dieta a controle. Houve um consumo médio superior de 200 g/dia ou 31,66% de EE, quando foram comparadas as dietas suplementadas em relação a controle. Em relação ao CCNF foi observado maior consumo para a dieta controle em relação às dietas suplementadas com fontes de ácidos graxos, para o CNF foi observado um consumo superior em torno de 16,27%.

Os resultados observados para o CEE e CCNF no pré-parto podem ser justificados pelo conteúdo de extrato etéreo e carboidratos não fibrosos das 4 dietas avaliadas (Tabela 5). A dieta controle analisada no pré-parto contem em média 3 unidades percentuais mais de CNF (Figura 3A) e 2 unidades percentuais a menos de EE, sendo que numericamente o CMS foi superior para a dieta controle em relação as dietas com fontes de ácidos graxos (12,73 *vs* 11,72 kg/dia). O CEE observado para as dietas suplementadas com fontes de ácidos graxos apresentou-se acima dos 600 g/animal/dia desde a semana -4 até a data do parto, enquanto para a dieta C foi observado um consumo médio em torno de 400g/animal/dia, apresentando valores inferiores a 300g na semana anterior ao parto (Figura 2A).

Um dos principais reguladores do consumo de matéria seca é distensão do tracto gastrointestinal. Nos ruminantes, a distensão do retículo-rumen é geralmente considerada o local primário em que a distensão pode limitar o consumo (ALLEN, 1996). O preenchimento do retículo-rumen é afetado tanto pelo teor de FDN da dieta quanto pela taxa de digestibilidade da forragem (OBA; ALLEN, 1999). Hayirli et al. (2002) avaliaram os fatores que afetam CMS durante o período de pré-parto, utilizando um conjunto de dados de 16 experimentos. O Consumo de matéria seca diminuiu linearmente com o aumento dos níveis

de FDN, aparentemente ingestão é limitada em primíparas, mas não em vacas multíparas, no pré-parto.

Foi observado efeito (P<0,05) para o CMS (Figura 1A), CMO, CFDN (Figura 2B) e CNDT (Figura 3B) para o C2, onde foi observado maior consumo para a dieta de semente de linhaça em relação ao grão de soja + sais de cálcio de ácidos graxos. A dieta rica em ácidos graxos ω3 apresentou CMS de 7,44% superior às dietas ricas em ácidos graxos ω6. Quando foi analisado o CFDN esta superioridade foi de apenas 3,86%. Ainda no período pré-parto foi observado efeito (P<0,05) para o C2 em relação ao CMS (Figura 1B) e CFDN (%PC). Para o CMS foi observado aumento de 10,45% para a dieta suplementada com semente de linhaça e de 13,06% em relação ao CFDN (%PC). A dieta SL apresentou superioridade em relação a GS+SC, desde a semana -4 até a data do parto, tanto para o CMS (Gráfico 1A) e para CFDN (Figura 2B), onde para o CMS apresentou valores superiores a 12,50 kg de MS por dia no período em questão, contra valores abaixo de 11,50 kg de MS observado para as dietas GS +SC (Figura 1A).

O maior consumo de matéria seca observado para a dieta SL em relação a GS+SC, foi relatado anteriormente por Petit (2002), numericamente, onde a dieta SL apresentou consumo de 19,4 vs 18,5 kg/dia em relação a GS+SC, porém com vacas em lactação. No período seco resultados comparando o consumo de matéria seca entre ácidos graxos ω3 e ω6 são escassos. A superioridade no consumo pela dieta SL pode estar relacionado com o baixo consumo da dieta SC e não da dieta GS, visto que não há relatos na literatura de diferenças no CMS entre dietas ricas em sementes de oleaginosas como fonte suplementar de ácidos graxos (ALLEN, 2000). No entanto a diferença do CMS entre as dietas GS e SC é irrisória, e desta forma os processos de bio-hidrogenação ruminal entre as fontes ω3 e ω6 poderiam estar envolvidos nesta diferença em um mecanismo regulatório que deve ser investigado com maior detalhe na nutrição de vacas leiteiras em período de transição. Os resultados observados para o CFDN, CNDT (kg/dia) e CMS, CFDN (%PC) estão intimamente ligados ao CMS (kg/dia).

Petit et al. (2007), avaliando o efeito de ácidos graxos ω6 (sais de cálcio de ácido graxo) e ω3 (semente de linhaça) em vacas leiteiras no período de transição observou redução do CMS no pré-parto para a dieta suplementada com ácidos graxos ω6 em relação a ω3 (12,10 *vs* 12,90).Os resultados do presente estudo são semelhantes aos observados por Petit et al. (2007).

No período pós-parto foi observado efeito (P<0,05) de dieta para CEE e CCNF. Foi observado efeito (P<0,05) de tempo (semanas) para as variáveis CMS, CMO, CPB, CEE, CFDN, CCNF CNDT (kg/dia) e CMS e CFDN (%PV). Foi observado efeito (P<0,05) de

interação para o CEE e CFDN. Em relação aos contrastes ortogonais foi observado efeito (P<0,05) para o C1 em relação ao CEE e CCNF (Tabela 6).

Tabela 6 - Médias (± EPM) do consumo de matéria e nutrientes no período pré e pós-parto de acordo com as dietas experimentais

Item	Dietas experimentais[1]				Probabilidades[2]					
	C	SL	GS	SC	Dieta	Tempo	Int	C1	C2	C3
				Consumo Kg/dia						
Matéria seca										
PréP	12,7± 0,43	12,6±0,36	11,2±0,30	11,2±0,35	0,042	<0,001	0,691	0,079	0,030	0,966
PósP	20,8±0,45	19,8±0,43	19,1±0,42	18,5±0,36	0,211	<0,001	0,702	0,073	0,339	0,592
Matéria orgânica										
PréP	11,9±0,40	11,8±0,34	10,5±0,28	10,4±0,32	0,042	<0,001	0,693	0,077	0,031	0,876
PósP	19,1±0,41	18,2±0,39	17,6±0,38	17,0±0,33	0,216	<0,001	0,676	0,074	0,360	0,573
Proteína bruta										
PréP	1,6±0,04	1,5±0,04	1,5±0,04	1,4±0,04	0,106	<0,001	0,672	0,087	0,101	0,502
PósP	3,5±0,02	3,4± 0,02	3,3±0,02	3,2±0,02	0,468	<0,001	0,700	0,173	0,458	0,813
Extrato etéreo										
PréP	0,4±0,01	0,6±0,01	0,6±0,01	0,6±0,01	<0,001	<0,001	0,604	<0,001	0,537	0,977
PósP	0,6±0,01	1,1±0,02	1,0±0,02	1,1±0,02	<0,001	<0,001	0,013	<0,001	0,996	0,228
Fibra em detergente neutro										
PréP	4,8±0,24	4,6±0,24	4,4± 0,17	4,2±0,21	0,096	<0,001	0,814	0,521	0,017	0,733
PósP	5,9±0,14	5,8±0,14	5,6±0,12	5,1±0,10	0,182	<0,001	0,003	0,215	0,180	0,235
Carboidrato não fibroso										
PréP	5,2±0,17	4,6±0,12	4,1±0,13	4,2±0,13	0,010	<0,001	0,466	0,002	0,156	0,778
PósP	9,1±0,19	7,8±0,17	7,6±0,15	7,6±0,16	0,008	<0,001	0,502	0,009	0,573	0,998
Nutrientes digestíveis totais										
PréP	8,9±0,28	9,0±0,22	8,1±0,21	8,0±0,23	0,100	<0,001	0,644	0,207	0,031	0,957
PósP	14,8±0,31	14,7±0,31	14,2±0,32	13,9±0,27	0,613	<0,001	0,766	0,383	0,395	0,619
				Consumo %PC						
Matéria seca										
PréP	1,8±0,09	1,9±0,06	1,5±0,05	1,6±0,06	0,087	<0,001	0,433	0,349	0,030	0,269
PósP	3,4±0,08	3,3±0,06	3,0±0,08	3,1±0,07	0,489	<0,001	0,810	0,315	0,291	0,573
Fibra em detergente neutro										
PréP	0,7±0,04	0,7±0,04	0,6±0,03	0,6±0,02	0,092	<0,001	0,876	0,765	0,015	0,487
PósP	0,9±0,02	1,0±0,02	0,9±0,02	0,8±0,02	0,412	<0,001	0,020	0,439	0,139	0,921

[1]Controle; [2]Semente de linhaça; [3] Grão de soja cru e integral; [4]Sais de cálcio de ácidos graxos insaturados, [2] Efeito de ; interação (INT), Contrastes ortogonais: Controle vs fontes lipídicas (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio de ácidos graxos insaturados (C2); grão de soja vs sais de cálcio (C3).

Analisando o CEE no pós-parto foi observado consumo médio superior de 470 g ou 43,69% de EE quando foram comparadas as dietas ricas em ácidos graxos a dieta controle. Foi observado maior CCNF (Figura 3A) para a dieta controle quando comparada as dietas suplementadas com fontes de ácidos graxos das famílias ω3 e ω6, sendo superior em aproximadamente 18,33%. O maior CEE e o menor CCNF observado para as dietas

suplementadas com fontes de ácidos graxos em relação à dieta controle está relacionado meramente com a diferença do conteúdo de dietético dos nutrientes entre as dietas experimentais.

Em recente meta analise realizada por Rabiee et al. (2012) onde 59 artigos e 86 comparações sobre suplementação de gorduras para vacas leiteiras em lactação foi observado uma diminuição de 0.78 ± 1.20 kg/dia no CMS quando foi comparado as dietas controles as dietas com SCAG e diminuição de 0.33 ± 1.61 kg/dia no CMS quando foi comparado as dietas controles as com sementes de oleaginosas. Os resultados observados no presente estudo são semelhantes ao apresentado pelos autores supracitados visto que a diminuição da dieta SC em relação a C foi de 2,33 kg/dia e das dietas SL e GS em relação a C foi de 1,43 kg/dia. Por outro lado Allen (2000) investigou vários estudos (n = 28), envolvendo o fornecimento de sais de cálcio de óleo de palma na dieta de vacas leiteiras e concluiu que para cada 1% de inclusão sais de cálcio de óleo de palma sobre a dieta de controle, uma depressão de 2,5% em CMS ocorreu.

Avaliando a suplementação de fontes de ácidos graxos ω6 e ω3 em dietas de vacas em lactação pós-parto utilizando semente de linhaça, sais de cálcio e grão de soja integral Petit (2002) não observaram diferença no CMS entre as dietas em questão, onde as médias do CMS foram 19,40; 18,30 e 18,70 kg/dia, respectivamente para semente de linhaça, sais de cálcio de ácidos graxos e grão de soja integral, resultados semelhantes ao observado neste estudo até a 12^{a} semana de lactação. De mesma forma Petit et al. (2007) não observaram diferença no CMS pós-parto no período em transição vacas leiteiras ao compararem a dieta controle a suplementada com semente de linhaça, porém observaram diminuição no CMS da dieta suplementada com sais de cálcio em relação as demais.

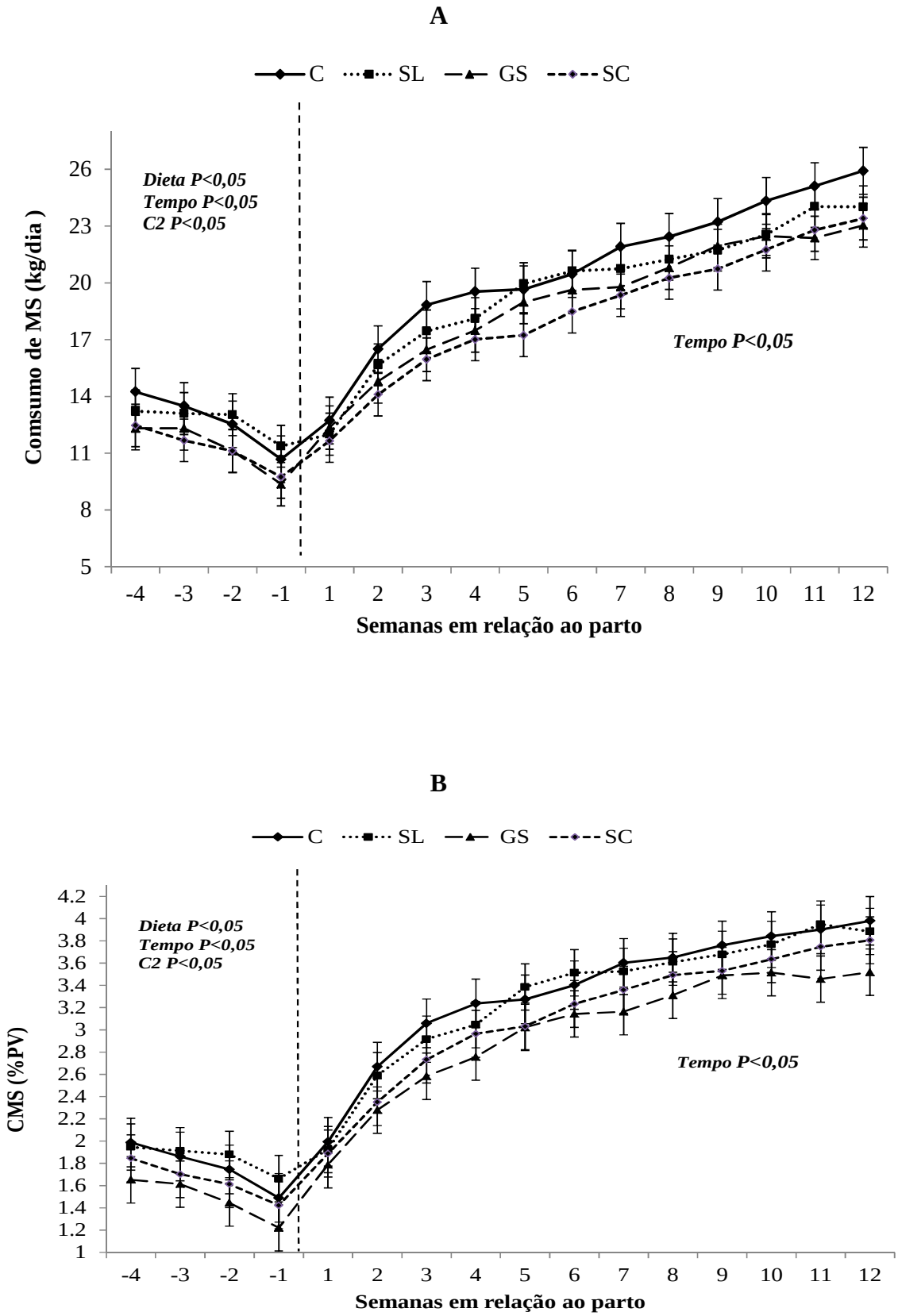
O efeito de interação observado para o CEE e CFDN estão relacionados com o aumento linear do CMS pós-parto observado a partir da 3^{a} semana de lactação (Gráfico1A). A interação observada para o CEE foi estabelecida na 3^{a} semana pós-parto no momento em que a dieta SC supera a dieta SL (Figura 2A). O aumento do CMS da dieta GS no pós-parto contribuiu para a interação observada, visto que a dieta SL apresentou um maior CMS no pré-parto em relação à dieta GS. A interação observada para o CFDN está evidenciada na 2^{a} e 6^{a} semana pós-parto (Figura 2B), onde houve uma superioridade da dieta C em relação à dieta SL, devido ao maior CMS observado para a dieta C em relação à SL, visto que o conteúdo de FDN das dietas pós-parto é semelhante (29,0 %).

O CMS observado pós-parto apresentou aumento constante a partir da 3^{a} semana de lactação, mais evidenciado para a dieta C em relação às dietas suplementadas com fonte de

ácidos graxos. As dietas SL, GS apresentaram pico no CMS entre a 8ª e 10ª semana de lactação, com valores médios por volta de 22,50 kg de MS por dia, enquanto a dieta SC apresentou pico por volta da 10ª semana (21,75 kg de MS) e a dieta C apresentou aumento contínuo até a 12ª semana de lactação, atingindo valores próximos a 26,00 kg de MS por dia. (Figura 1A). Em relação ao CEE no pós-parto foram observados valores crescentes para as dietas suplementadas com ácidos graxos, partindo de aproximadamente 600g/animal/dia na semana posterior ao parto até valores superiores a 1300 g/animal/dia a partir da 10ª semana de lactação (Figura 2A).

Rabiee at al., (2012) apresenta que todas as fontes suplementares de ácidos graxos causam uma diminuição no CMS em média de 880g/vaca/dia, sendo que a diminuição mais drástica é observada quando o SCAG é utilizado como fonte suplementar, onde a redução média de CMS é de 2,11kg/vaca/dia em comparação com dietas livres de fontes suplementares de ácidos graxos e também acrescenta através de regressão multivariada 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.

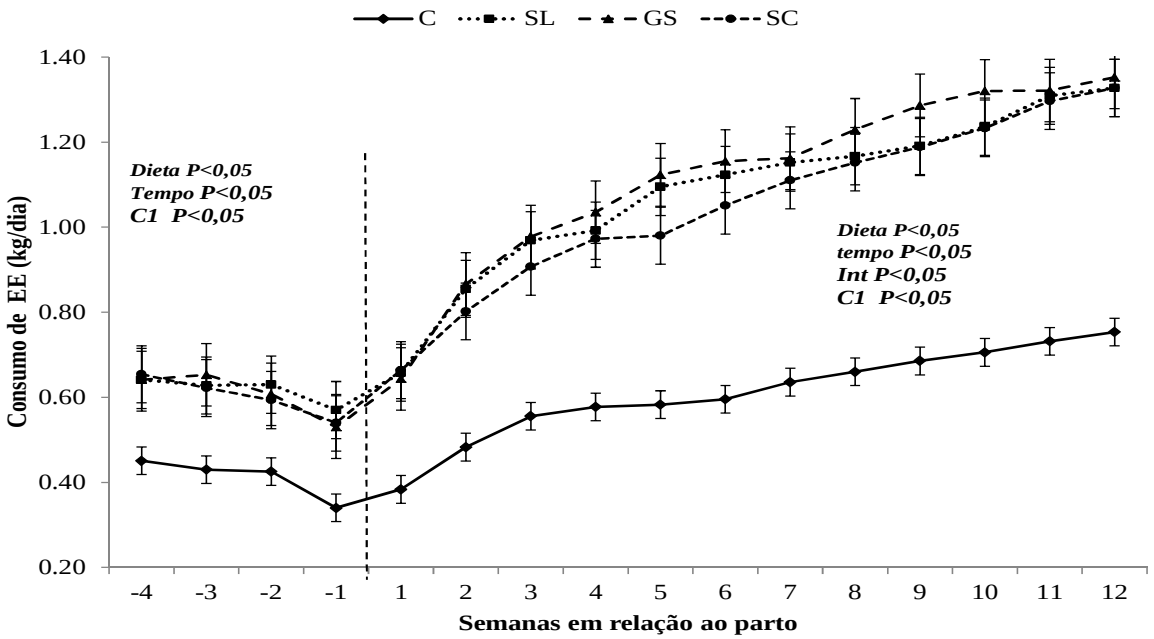
Figura 1 - Consumo de matéria seca (kg/dia) (A) e % peso vivo (B), nos períodos pré e pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3)



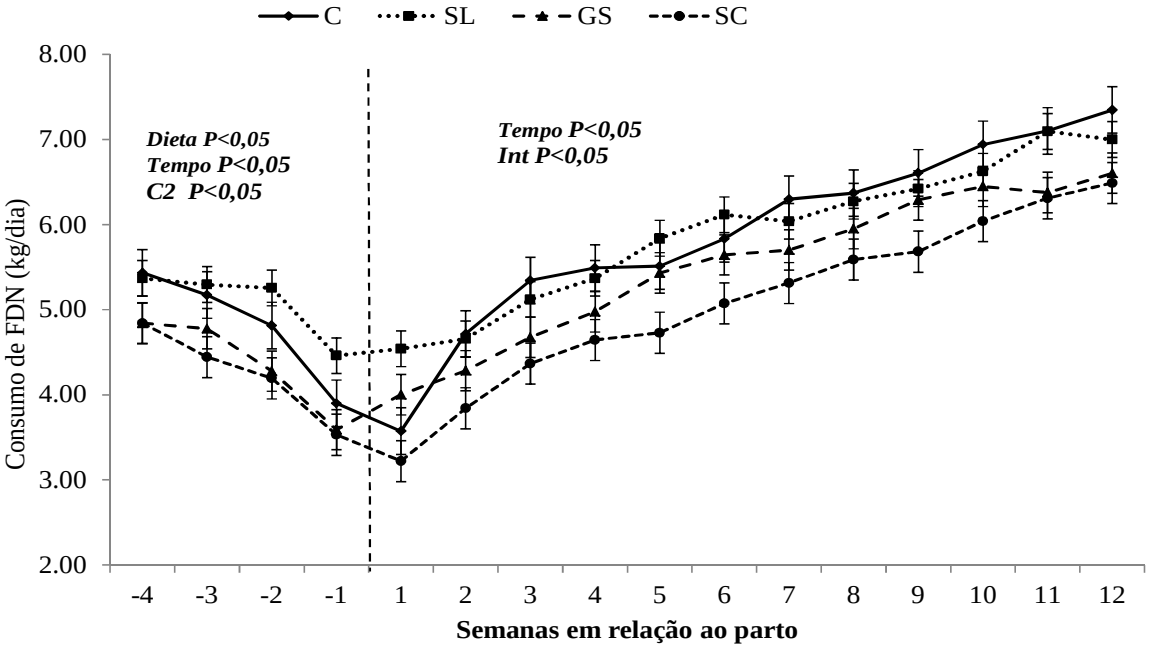
Fonte: (GANDRA, 2012.)

Figura 2 - Consumo extrato etéreo (A) e fibra em detergente neutro (B), nos períodos pré e pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3).

A

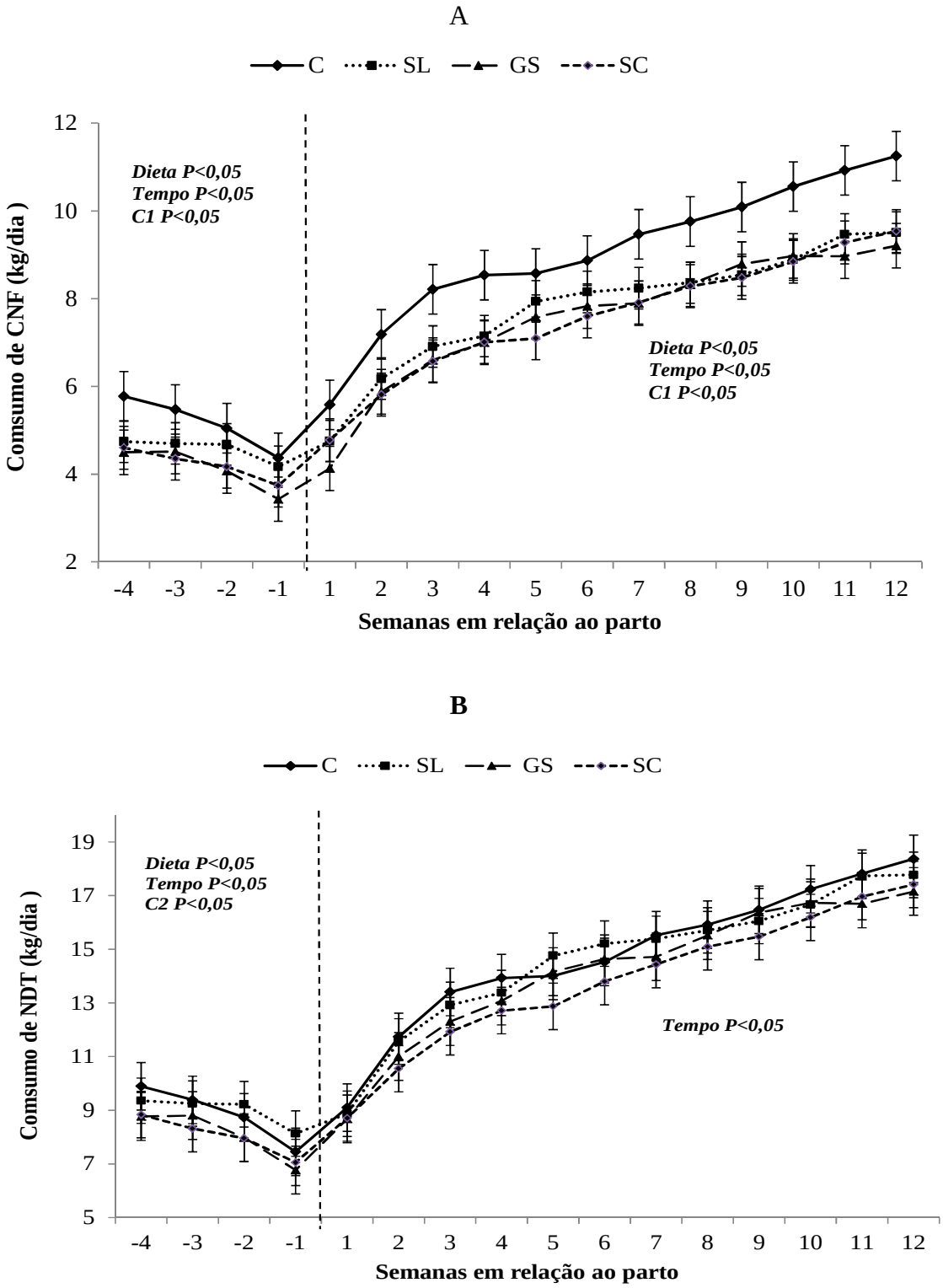


B



Fonte: (GANDRA, 2012).

Figura 3 - Consumo carboidratos não fibrosos (A) e nutrientes digestíveis totais (B), nos períodos pré e pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3).



Fonte: (GANDRA, 2012).

6.2 DIGESTIBILIDADE DA MATÉRIA SECA E NUTRIENTES

No período pré-parto foi observado efeito (P<0,05) de dieta para o coeficiente de digestibilidade da PB (CDPB), da FDN (CDFDN) e CNF (CDCNF). Foi observado efeito (P<0,05) de tempo para o coeficiente de digestibilidade da PB (CDPB), do EE (CDEE), do FDN (CDFDN). Também foi observado efeito (P<0,05) de interação para o coeficiente de digestibillidade da MS (CDMS), MO (CDMO), CDPB, CDEE e CDCNF (Tabela 7).

O CDMS da dieta C apresentou aumento entre as semanas -4 a -1, sendo observado 58,89% na semana -4 e 69,48% na semana -1 em relação ao parto. No entanto as dietas suplementadas com fontes de ácidos graxos apresentaram valores constantes entre as semana -4 a semana -1 (Figura 4A).O CDPB das dietas SL e GS apresentaram redução entre as semanas -4 a -2 em relação ao parto, onde o declínio observado para a dieta SL foi de 5,84 unidades percentuais e da GS de 8,13 unidades percentuais (Figura 4B), já para as dietas C e SC foi observado uma estabilidade em torno de 72,50%. Em relação ao CDEE foi obtidos valores entre 85,00 a 90,00% entre as dietas avaliadas, sendo observados valores estáveis sem reduções ou aumentos bruscos neste período pré-parto (Figura 5A).

Quando foi analisado o C1, somente foi observado efeito (P<0,05) para o CDCNF, onde foi obtido maior digestibilidade para a dieta C em relação às demais, onde foi observado um coeficiente de digestibilidade 5,90% maior para a dieta C em relação as demais. Este resultado pode ser justificado devido ao maior consumo de CNF (Tabela 6) para a dieta C, bem como seu maior conteúdo de CNF (Tabela 5), em relação às dietas como fontes de ácidos graxos. A variação no CDCNF está exclusivamente ligada ao consumo e o conteúdo dietético do nutriente em questão.

Analisando o C2 foi observado efeito (P<0,05) para o CDPB e CDFDN (Figura 5B). Em relação ao CDPB foi obtido maior coeficiente de digestibilidade para as dietas suplementadas com ácidos graxos ω6 em relação à dieta SL, sendo esta superioridade de 5,08 unidades percentuais. O maior CMS no pré-parto para a dieta SL *vs* GS+SC e o fato da semente de linhaça ter sido fornecida integral pode ter indisponibilizado parte da proteína contido em sua matriz, contribuindo para um menor CDPB. Por outro lado foi observado maior CDFDN para a dieta SL em relação às dietas GS+SC, em 5,03 unidades percentuais. Esta diferença esta relacionado ao CDFDN da dieta SC (52,67%), e com as características químico-bromatológicas dos sais de cálcio de ácidos graxos no ambiente ruminal, que podem

interferir na digestibilidade da fibra, visto que a inclusão de altos níveis grão de soja integral em dietas de vacas leiteiras não altera a digestibilidade da FDN (BARLETTA, 2010).

Doreau et al. (2009) avaliaram a digestibilidade ruminal e intestinal em vacas leiteiras secas, onde as dietas foram suplementadas com semente de linhaça, sendo a relação volumoso concentrado de 70:30. Os autores não observaram diferenças no CDMS, CDMO, quando compararam as dietas suplementadas com semente de linhaça à dieta controle, porém observaram diferença numérica de 2,5 unidades percentuais em relação ao CDFDN, resultados semelhantes ao do presente estudo, onde foi observada uma diferença de 2,3 unidades percentuais entre as dietas C e SL, no pré-parto. Cortês et al. (2010) trabalharam suplementando vacas leiteiras com diferentes processamentos de semente de linhaça e também observaram resultados semelhantes ao de Doreau et al. (2009). No entanto, Martin et al. (2008) observaram menor CDMS e CDFDN(Figura 5B) quando suplementaram vacas leiteiras com diferentes formas de processamento de semente de linhaça em relação a dieta controle, porém neste estudo as dietas suplementadas com fontes de gordura apresentaram níveis altos de EE, em torno 7,0%, contra 2,6% da dieta controle.

No período pós-parto foi observado efeito ($P<0,05$) de dieta para o CDPB, CDEE e CDCNF. Foi observado efeito ($P<0,05$) de tempo para CDMS, CDMO, CDPB, CDEE, CDFDN, CDCNF. Foi observado efeito ($P<0,05$) de interação para CDMS, CDMO, CDPB, CDEE, CDFDN, CDCNF (Tabela 7).

Havartine e Allen (2006b), avaliaram digestibilidade aparente total de vacas leiteiras recebendo dietas suplementadas com ácidos graxos saturados, insaturados e uma dieta intermediária. Os autores observaram menor CDMS, CDMO, CDPB e CDFDN para a dieta suplementada, com fonte de ácido graxo saturado em relação às demais. No presente estudo apesar do maior conteúdo de ácidos graxos C18:3 para a dieta SL em relação as demais, não foram observados diferenças no CDMS, CDMO, CDPB e CDFDN entre as dietas contendo ácidos graxos.

Em relação ao CDMS da dieta C no pós-parto foi observada uma forte redução entre a 3^a e 9^a semana de lactação, sendo observado declínio de 6,49 unidades percentuais neste período. Para as dietas SL e SC não foram observadas variações consideráveis no CDMS no pós-parto, sendo apenas apresentado declínio discreto ao longo do período de lactação. Quando foi avaliado o comportamento do CDMS da diets GS ao longo da lactação foi observado forte redução entre a 3^a a 5^a semana de lactação (68,79 vs 59,87), respectivamente.

Após a 5ª semana de lactação o CDMS da dieta GS apresentou-se estável e os valores foram mantidos entre por volta de 58,0% (Figura 4A).

O CDPB das dietas SL e SC no pós-parto apresentaram valores estáveis entre a 1ª a 8ª semana de lactação, sendo observado um declínio discreto entre a 9ª a 12ª semana de lactação. Já para a dieta GS foi observada forte redução entre as semanas 3 a 5, permanecendo constante até a 12ª semana de lactação, onde foi observado valor médio de 75,00% neste período em questão (Figura 4B). Em relação ao CDEE no pós-parto para a dieta C foi observado forte declínio desde a 1ª até a 12ª semana de lactação, para as dietas GS e SC também foi observado declínio ao longo do período de lactação, porém de uma forma mais menos intensa em relação a dieta C. No entanto, o CDEE para a deita SL apresentou-se constante ao longo do período em questão, sendo observado valores médios em torno de 87,0%.

Analisando os contrastes ortogonais no pós-parto foi observado efeito (P<0,05) do CDEE e CDCNF para o C1. Em relação ao CDEE foi obtido (81,39 *vs* 84,97), respectivamente para a dieta C e as dietas SL+GS+SC (Figura 5A). Esta superioridade está relacionada com o maior consumo (Tabela 6) e conteúdo (Tabela 5) de EE para as dietas suplementadas com fontes de ácidos graxos. Comparando os CDCNF das dietas C vs SL+GS+SC foi obtido (88,0 *vs* 84,7), respectivamente. Estes resultados estão relacionados com o maior CCNF observado para a dieta C em relação às demais.

Benchaar et al. (2012), suplementaram vacas leiteiras no início de lactação, com produção média de 27,34 kg/dia, com relação volumoso : concentrado de 50:50, com níveis crescente de óleo de linhaça (0; 2; 3 e 4% da MS total da dieta) nas dietas, não observaram diferenças no CDMS, CDMO, CDPB e CDFDN, quando compararam a dieta controle as suplementadas com óleo de linhaça. Resultado semelhante foi observado por Barletta, (2010), quando suplementou vacas leiteiras no inicio de lactação, com produção média de 30,0 kg/dia, com níveis crescentes de grão de soja cru e integral (0; 8; 16; 24% da MS total da dieta).

Weiss et al. (2011) suplementaram vacas leiteiras, com produção média de 42,10 kg/dia, recebendo silagem de milho como volumoso base, com fontes de ácidos graxos saturados (C18:0), triacilglicerois (C16:0) e SCAG (C18:2). Os autores não observaram diferenças para o CDMS, CDMO, CDPB, CDFDN quando compararam as dietas suplementadas com fontes de ácidos graxos em relação à dieta controle, no entanto de forma

semelhante ao presente estudo foi observado maior CDEE para as dietas suplementadas com fontes de ácidos graxos.

Em estudo avaliando vacas leiteiras por 12 semanas Petit (2002) suplementou os animais com semente de linhaça, SCAG e grão de soja integral micronizado, não observou diferença entre as dietas em relação ao CDPB, porém obteve maior CDMS, CDFDN e CDEE para a dieta suplementada com grão de soja em relação à semente de linhaça (68,7*vs* 66,1) ; (49,5 *vs* 45,5) e (88,0 *vs* 80,0), respectivamente para MS, FDN e EE. Os resultados observados são adversos ao presente estudo devido ao grau de processamento do grão de soja, visto que não foi observadas diferenças para os coeficientes da matéria seca e nutrientes entre as dietas com semente de linhaça e SCAG. Apesar destes resultados os valores médios dos CDMS, CDPB, CDEE são semelhantes aos do presente estudo.

Em relação ao C2 foi observado efeito ($P<0,05$) para o CDEE, onde foi observado melhor digestibilidade para a dieta SL em relação às dietas GS+SC de 3,74 % (Figura 5A). Este resultado pode estar relacionado com o número de insaturações presentes na fonte de ácido ω3, visto que quando maior o número de insaturações maior seria a digestibilidade das fontes de ácidos graxos. Quanto maior o número de saturações maior a solubilidade do ácido graxo no intestino, ficando mais fácil a formação das micelas no intestino delgado para absorção através da luz do intestino delgado (DRACKLEY et al., 1992).

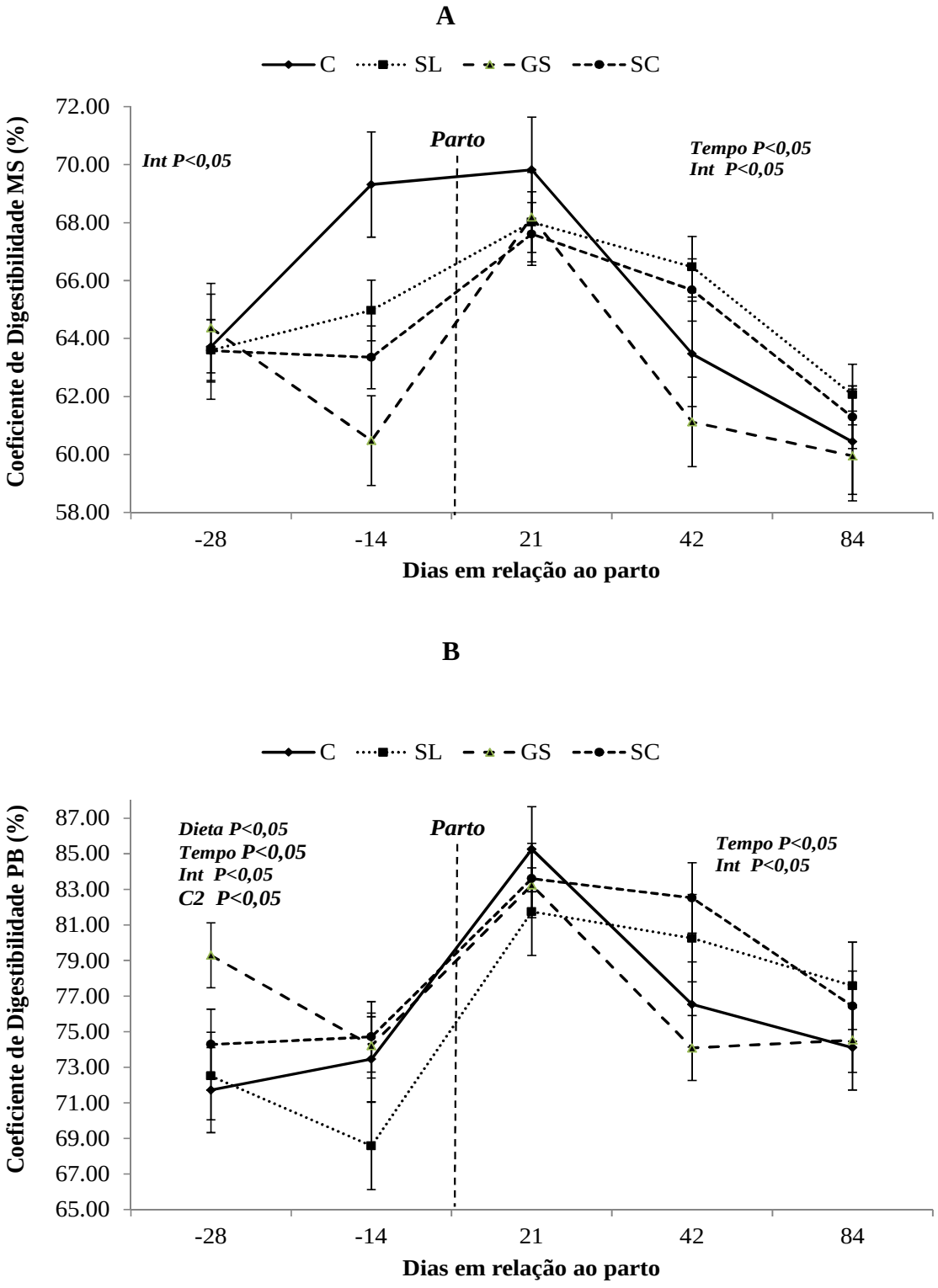
A interação observada para o CDMS está evidenciada na 3ª semana de lactação com o declínio do CDMS da dieta C em relação às demais dietas suplementadas com fontes de ácidos graxos (Figura 4A). Em relação à interação observada para o CDPB também pode ser observada na 3ª semana de lactação com o declínio do CDPB pra dieta C em relação às demais (Figura 4B). O declínio do CDEE apresentado para a dieta GS a partir da 4ª semana justifica a interação observada para esta variável (Figura 5A).

Tabela 7 - Média (±EPM) da digestibilidade aparente total da matéria seca e nutrientes no período pré e pós-parto de acordo com as dietas experimentais

Item	Dietas experimentais[1]				Probabilidades[2]					
	C	SL	GS	SC	Dieta	Tempo	Int	C1	C2	C3
	Coeficiente de Digestibilidade (%)									
Matéria seca										
PréP	66,5±1,22	64,3±0,47	62,4±0,94	63,5±1,08	0,311	0,448	<0,001	0,766	0,111	0,210
PósP	65,5±0,54	66,8±048	63,8±0,68	65,3±0,52	0,251	<0,001	<0,001	0,073	0,339	0,592
Matéria orgânica										
PréP	68,3±1,08	64,8±0,46	65,5±0,82	64,3±1,09	0,249	0,609	<0,001	0,083	0,969	0,598
PósP	66,2±0,54	68,730,45	64,3±0,56	66,4±0,48	0,243	<0,001	<0,001	0,872	0,244	0,966
Proteína bruta										
PréP	72,6±0,77	70,5±0,58	76,7±0,81	74,5±1,13	0,023	0,004	<0,001	0,401	0,005	0,257
PósP	77,7±0,47	79,5±0,30	76,6±0,47	77,0±0,35	0,008	<0,001	<0,001	0,251	0,210	0,202
Extrato etéreo										
PréP	89,4±0,57	88,7±0,42	88,7±0,47	88,6±0,41	0,872	0,009	<0,001	0,413	0,931	0,947
PósP	81,4±0,51	87,1±0,20	84,4±0,49	83,4±0,43	0,004	<0,001	<0,001	0,007	0,004	0,417
Fibra em detergente neutro										
PréP	56,4±0,84	58,7±0,99	54,7±0,99	52,7±0,92	0,019	0,006	0,430	0,368	0,015	0,991
PósP	55,2±0,46	58,2±0,56	55,8±0,60	56,8±0,47	0,458	<0,001	<0,001	0,286	0,269	0,610
Carboidrato não fibroso										
PréP	86,7±1,20	82,2±0,56	81,8±0,90	80,7±1,20	0,034	0,692	<0,001	0,013	0,647	0,669
PósP	88,1±0,77	85,8±0,67	84,6±0,72	83,6±0,72	0,024	<0,001	<0,001	0,021	0,189	0,460

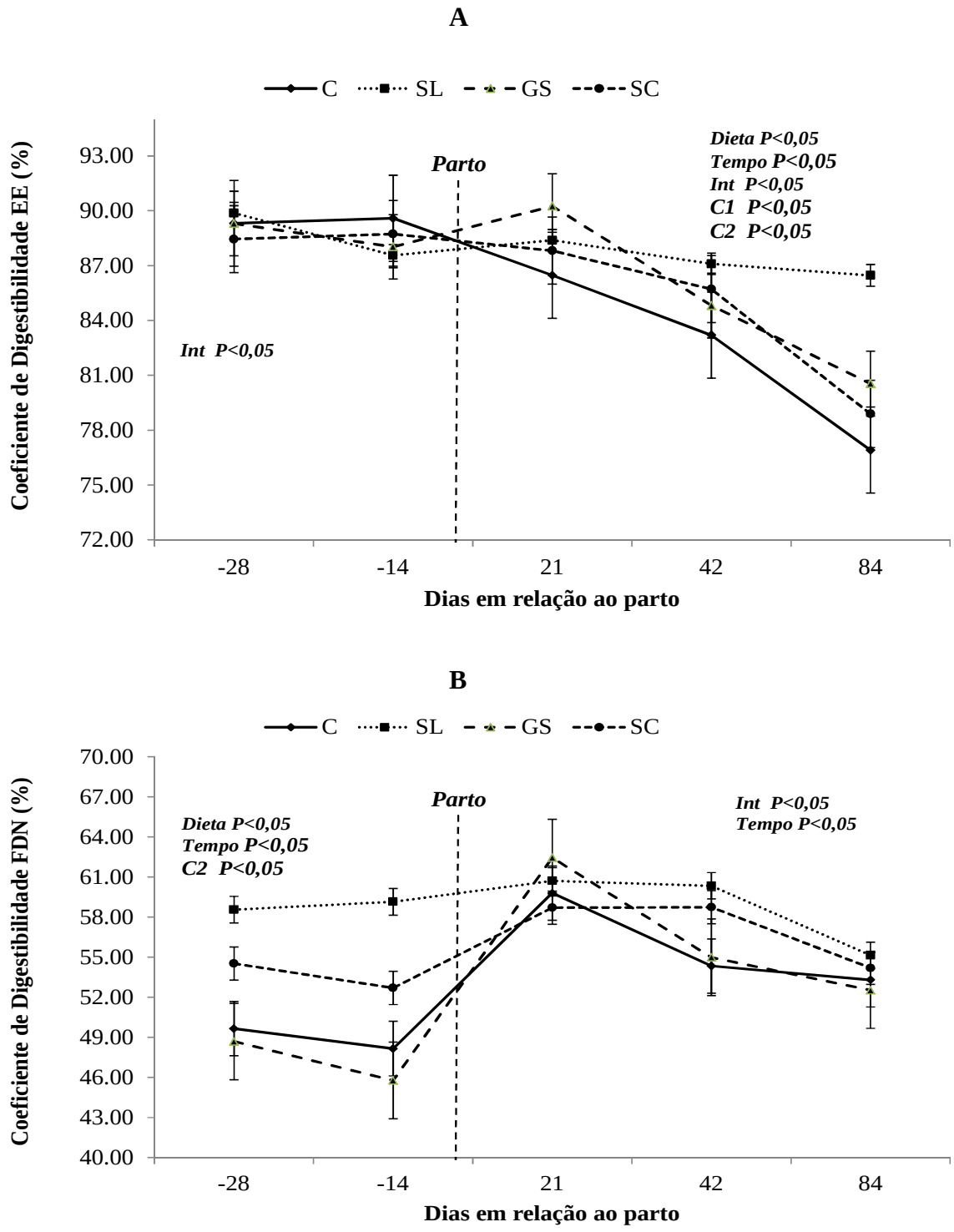
[1]Controle; [2]Semente de linhaça; [3] Grão de soja cru e integral; [4]Sais de cálcio de ácidos graxos insaturados, [2] Efeito de ; interação (INT), Contrastes ortogonais: Controle vs fontes lipídicas (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio de ácidos graxos insaturados (C2); grão de soja vs sais de cálcio (C3).

Figura 4 - Coeficiente de digestibilidade da matéria seca (A), da proteína bruta (B), nos períodos pré e pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3).



FONTE: (GANDRA, 2012)

Figura 5 - Coeficiente de digestibilidade do extrato etéreo (A), da fibra em detergente neutro (B), nos períodos pré e pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3).



FONTE: (GANDRA, 2012)

6.3 BALANÇO DE ENERGIA

No pré-parto foi observado efeito (P<0,05) de dieta para o consumo de energia bruta (CEB), energia digestível (CED), energia metabolizável (CEM), energia líquida de lactação (CEL_L). Foi observado efeito (P<0,05) de tempo para todas as variáveis mensuradas CEB, CED, CEM, CEL_L, produção de energia liquida de ganho (ELg), mantença (ELm), gestação (ELG), balanço de energia (BE) e eficiência energética (ELG/CED). Houve interação (P<0,05) entre o tempo e as dietas experimentais para o CED e CEM (Tabela 8).

Na avaliação dos contrastes ortogonais foi observado efeito (P<0,05) para o C2 em relação ao CEB, CED, CEM, CEL_L. Nesta avaliação foi observado maior consumo de energia para a dieta SL em relação à GS+ SC. A dieta SL apresentou um CEB 11,60 % maior que as dietas GS+SC, para CEB, CEM, CEL_L (Figura 6B), a dieta suplementada com fonte de ácido graxo ω3 apresentou consumo 13,30% superior às dietas suplementadas com ácidos graxos ω6. Estes resultados são justificados elo maior CMS apresentado pela dieta SL em relação às dietas GS+SC no pré-parto (Tabela 6).

Caldari-Torres et al. (2011) suplementaram vacas leiteiras no período de transição com fontes de ácidos graxos saturados, ω 6 ω3 e não observaram diferença no balanço de energia no pré-parto quando comparam as dietas enriquecidas com ácidos graxos ω6 e ω3, obtendo em média balanço de energia positivo em torno de 3,7 Mcal/d.. Em outro estudo Hayirli et al. (2011), suplementaram vacas no período de transição com fontes de ácidos graxos oleico (canola), linoleico (linola), linolênico (linhaça) e também não observaram diferenças para o balanço de energia no pré-parto.

No pós-parto apenas foi observado efeito (P>0,05) de dieta para as variáveis CEL_L e BE. No entanto foi observado efeito (P<0,05) de tempo para todas as variáveis CEB, CED, CEM, CEL_L, produção de energia líquida de líquida de lactação (EL_L), ELg, ELm, BE e eficiência de utilização da EL_L (EL_L/CED) e EL_L + ELg/CED. Foi observado efeito (P<0,05) de interação no pós-parto para as variáveis CED, CEM e EL_L (Tabela 8).

Tabela 8 - Média (±EPM) do balanço de energia de acordo com as dietas experimentais.

Item	Dietas experimentais[1]				Probabilidades[2]					
	C	SL	GS	SC	Dieta	Tempo	Int	C1	C2	C3
Consumo de Energia (Mcal/dia)										
Energia bruta										
PréP	54,0±1,74	55,5±1,36	49,1±1,41	49,0±1,41	0,037	<0,001	0,711	0,237	0,017	0,961
PósP	87,6±1,89	86,6±1,87	82,6±1,95	80,8±1,60	0,459	<0,001	0,449	0,289	0,264	0,709
Energia digestível										
PréP	35,9±1,31	35,5±0,97	30,7±1,08	30,9±1,01	0,049	<0,001	0,011	0,075	0,029	0,950
PósP	54,7±1,12	55,4±1,07	49,1±0,96	50,5±0,94	0,232	<0,001	<0,001	0,302	0,079	0,701
Energia Metabolizável										
PréP	29,8±1,09	29,5±0,80	25,5±0,90	25,6±0,84	0,049	<0,001	0,012	0,075	0,029	0,950
PósP	45,4±0,93	46,0±0,89	40,8±0,80	41,9±0,78	0,232	<0,001	<0,001	0,302	0,079	0,701
Energia líquida de Lactação										
PréP	17,9±0,87	20,0±0,64	18,1±0,72	17,9±0,67	0,049	<0,001	0,312	0,352	0,037	0,895
PósP	27,4±0,74	31,4±0,71	30,9±0,64	30,0±0,62	0,032	<0,001	0,760	0,017	0,510	0,565
Produção de Energia (Mcal/dia)										
Energia líquida de lactação										
PósP	20,1±0,46	19,9±0,56	20,8±0,60	20,1±0,47	0,959	<0,001	0,026	0,893	0,717	0,692
Energia líquida de ganho										
PréP	0,2± 0,27	0,5± 0,33	0,8±0,35	0,7± 0,34	0,437	<0,001	0,660	0,165	0,408	0,762
PósP	-1,5±0,43	-1,2±0,37	-1,4±0,35	-1,2±0,38	0,796	<0,001	0,188	0,891	0,755	0,491
Energia líquida de mantença										
PréP	11,3±0,19	10,8±0,14	11,7±0,17	10,8±0,14	0,145	<0,001	0,211	0,483	0,291	0,249
PósP	10,1±0,08	9,7±0,07	10,4±0,09	9,7±0,07	0,331	<0,001	0,141	0,622	0,454	0,105
Energia líquida de gestação										
PréP	5,92±0,02	5,92±0,02	5,93±0,02	5,92±0,02	0,562	<0,001	0,182	0,762	0,265	0,485
Balanço de Energia (Mcal/dia)										
Balanço										
PréP	1,3±1,03	1,8±0,89	1,0± 0,96	1,6± 0,82	0,246	<0,001	0,282	0,288	0,106	0,507
PósP	-5,2±0,58	-0,4±0,53	-2,5±0,62	-2,2±0,54	0,001	<0,001	0,905	0,046	0,272	0,598
Eficiência										
EL_L/CED										
PósP	0,38±0,01	0,37±0,01	0,43±0,01	0,41±0,01	0,452	<0,001	0,151	0,568	0,159	0,565
EL_L+EL_G/CED										
PósP	0,29± 0,01	0,32±0,01	0,34±0,01	0,33±0,01	0,561	<0,001	0,686	0,207	0,188	0,937

[1]Controle; [2]Semente de linhaça; [3] Grão de soja cru e integral; [4]Sais de cálcio de ácidos graxos insaturados, [2] Efeito de ; interação (INT), Contrastes ortogonais: Controle vs fontes lipídicas (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio de ácidos graxos insaturados (C2); grão de soja vs sais de cálcio (C3).

Na avaliação dos contrastes ortogonais foi observado efeito para C1 em relação aos variáveis CEL_L e BE, onde foi obtido maior CEL_L e melhor BE para as dietas suplementadas com fontes de ácidos graxos ω3 e ω6 em relação a dieta controle, sendo (28,05 *vs* 31,60 Mcal/dia) para CEL_L e (-2,92 *vs* 0,84 Mcal/dia) para o BE.O efeito de interação observada para o EL_L, ao longo da lactação foi obtido principalmente entre a 3ª e 4ª semana de lactação devido ao aumento do EL_L para a dieta C e uma diminuição para a dieta GS. Entre a 8ª e 9a

semana foi também observado interação devido forte declínio da produção de EL_L para a dieta C (Figura 7A).

As dietas GS e SC permaneceram em BE negativo até a 6ª semana de lactação, restabelecendo o BE positivo a partir da 7ª semana, onde foi observado $BE_{(nadir)}$ entre a 1ª e 3ª semana de lactação sendo -11,62 e -10,29 Mcal/dia, respectivamente para as dietas GS e SC. Em relação às dietas SL foi observado BE negativo até a 4ª semana de lactação e sendo restaurado a partir da 5ª semana. O $BE_{(nadir)}$ apresentado por esta dieta foi observado entre a 1ª a 2ª semana de lactação, sendo de -8,26 Mcal/dia (Figura 6A). A dieta C apresentou maior BE negativo (7ª semana) sendo restaurado apenas na 8ª semana, apresentando $BE_{(nadir)}$ de -13,42 Mcal/dia. Estes resultados são justiçados devido ao CEL_L (Figura 6B) e produção de EL_L (Figura 7A) apresentados pelas dietas experimentais ao longo do período de lactação.

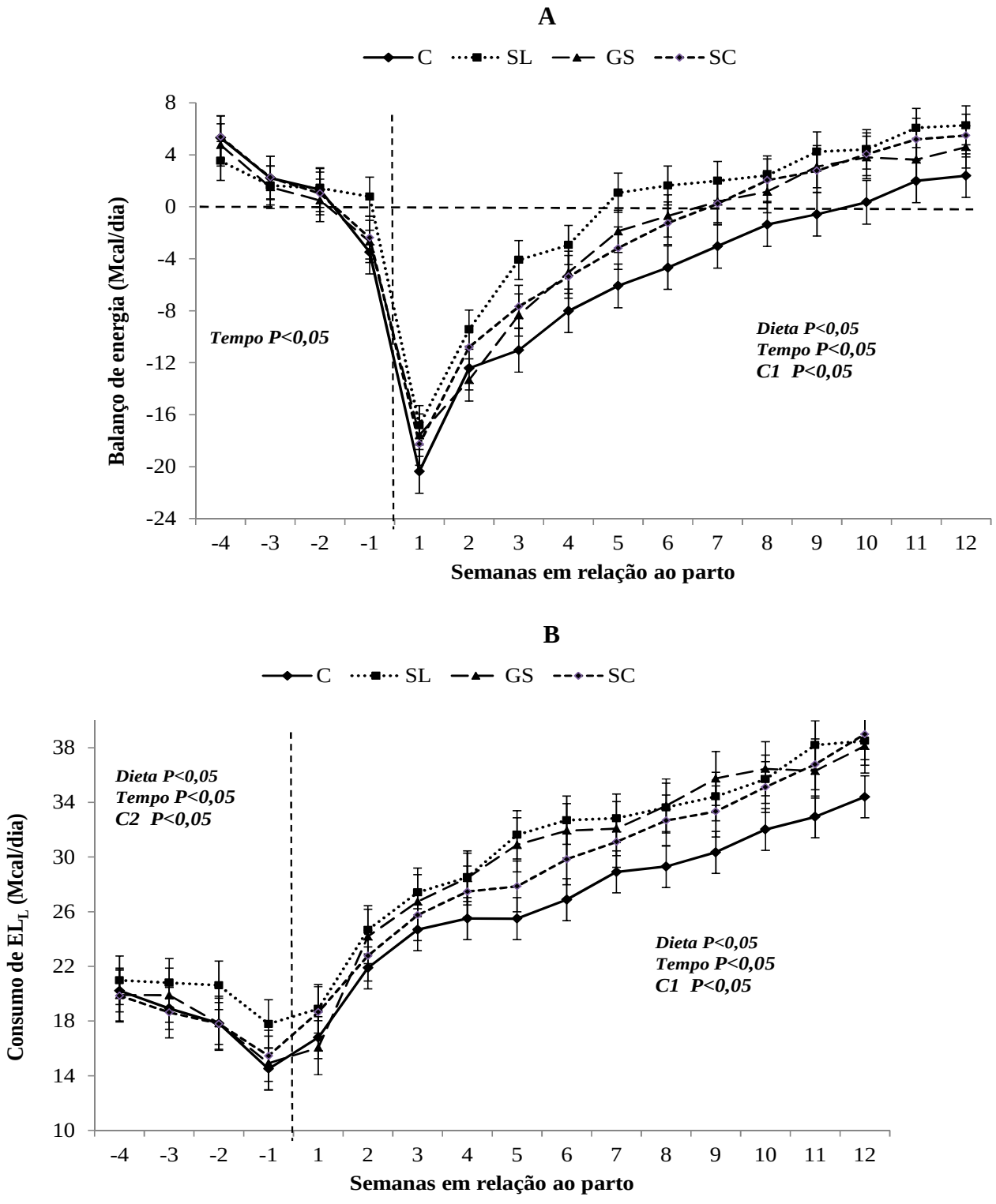
Quando foi avaliada a eficiência da utilização da energia para a produção de leite (EL_L/CED) (Figura 7B) não se obteve efeito da adição das fontes de ácidos graxos ω6 e ω3, porém foi observado uma melhor eficiência para a dieta GS (43,0%) em relação as demais (41,0; 38,0 e 37,0%) , respectivamente para SC, C e SL. Em relação ao C2 foi observado melhor eficiência para GS+SC em relação à SL, sendo esta superioridade de aproximadamente de 11,90%. Estes resultados são justificados exclusivamente pelo maior CED apresentado pela dieta SL, visto que não foi observado diferenças para a produção de leite (kg/dia) (Tabela 10) e para a EL_L (Mcal/dia).

Petit et al. (2007), avaliaram o efeito de ácidos graxos ω6 (sais de cálcio de ácido graxo) e ω3 (semente de linhaça) em vacas leiteiras no período de transição, observaram maior BE negativo para a dieta suplementada com sais de cálcio em relação a dieta controle e a com semente de linhaça, sendo que a dieta suplementada com sais de cálcio permaneceu em BE negativo ao longo do período experimental, e as outras dietas retornaram ao BE positivo entre a 3 e 4 semana em relação ao parto.

Avaliando a suplementação de ácidos graxos ω3 em vacas no período de transição Zachut et al. (2010a), observara melhor balanço de energia para a dieta suplementada com semente de linhaça em relação a controle (2,3 *vs* 0,8 Mcal/dia), porém quando avaliou o BE_{nadir}, observou (-7,7 *vs* -3,6) respectivamente para semente de linhaça e controle. No estudo conduzido por Caldari-Torres et al. (2011) ,onde foram suplementadas vacas leiteiras no período de transição com fontes de ácidos graxos saturados, ω6 e ω3, observaram também melhor BE, no pós-parto para a dieta suplementada com fonte de ácidos graxos ω3 em relação

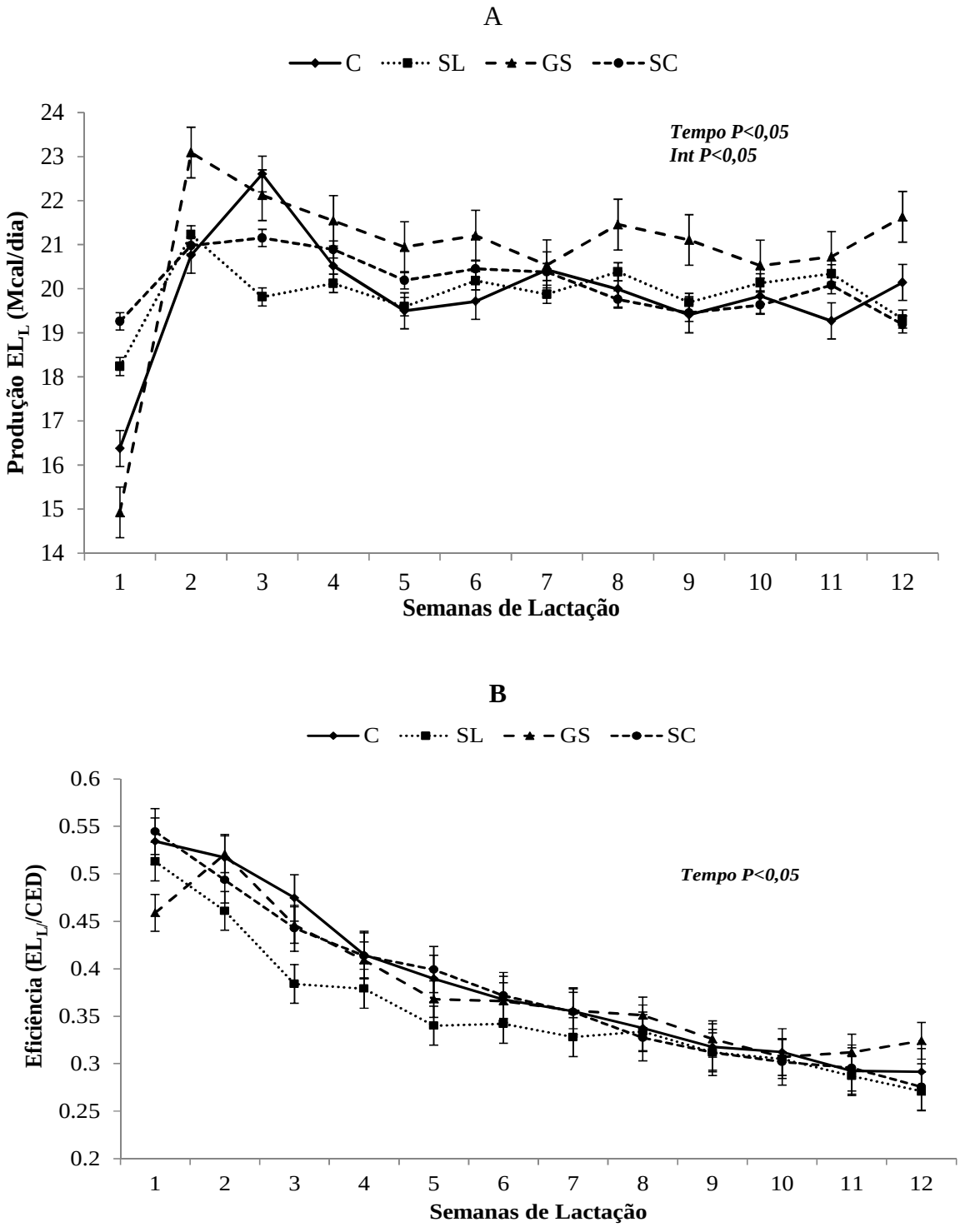
as demais, sendo os valores obtidos em 7 semanas de lactação (2,10; -0,10 e 4,70 Mcal/dia), respectivamente para as fontes de ácido graxos saturados, ω6 e ω3.

Figura 6 - Balanço de energia (A) consumo de EL_L (B), nos períodos pré e pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3).



FONTE: (GANDRA, 2012)

Figura 7 - Produção de EL_L (A), eficiência de utilização da EL_L (B) ao longo da lactação de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3).



FONTE: (GANDRA, 2012)

D'Angelo (2009) suplementando vacas leiteiras no período de transição e início de lactação com óleo de soja ou sais de cálcio de ácidos graxos insaturados, durantes -28 a 84 dias em relação ao parto com média de produção em torno de 31,0 kg/dia, também observou

melhor BE para as dietas suplementadas com fontes de ácidos graxos em relação à dieta controle, sendo (-1,32 vs -2,00) respectivamente, para óleo de soja + sais de cálcio *vs* controle, contudo neste estudo D'Angelo (2009) observou maior CMS para a dieta controle em relação as dietas suplementadas com ácidos graxos.

O efeito das fontes de ácidos graxos ω3 e ω6 para vacas no período de transição e inicio de lactação influenciou de maneira positiva o BE ao longo do período de lactação, comprovando a eficácia do aumento da densidade energética em dietas de transição, porém o efeito destas fontes energéticas estão além de meramente um aporte energético, visto que não foi observado diferenças nas concentrações de ácidos graxos não esterificado (AGNE), β-hidroxibutirato (BHBA) (Tabela 12) entre as dietas suplementadas e a controle.

6.4 BALANÇO DE NITROGÊNIO

No período pré-parto foi observado efeito (P<0,05) de dieta para excreção de nitrogênio nas fezes (ENF) em (g/dia) e (% NT), e nitrogênio absorvido (Nabs) (%NT). Foi observado efeito (P<0,05) de tempo para consumo de nitrogênio total (CNT), ENF (g/dia) e (%NT), Nabs (g/dia) e (%NT), nitrogênio retido (Nret) em (g/dia) e (%NT) e excreção de nitrogênio na urina (ENU) em (%NT). Foi observada interação (P<0,05) para ENF (g/dia) e (% NT) e Nabs (%NT) (Tabela 9).

Na avaliação dos contrastes, foi observado efeito (P<0,05) no C1 em relação à ENF (g/dia). Foi obtido menor ENF (g/dia) para as dietas suplementadas com fontes de ácidos graxos em relação à dieta C, sendo observado excreção de 9,2 g/dia ou 13,06% menor para as dietas ricas em ácidos graxos ω6 e ω3 em relação a dieta controle. Estes resultados estão de acordo com os CDPB apresentados pelas dietas suplementadas com ácidos graxos que apresentaram maiores em relação à dieta controle (Tabela 7 e Figura 4B) e podem ter interferido nesta variável.

Em relação ao C2 foi observado efeito (P<0,05) para ENF em (g/dia) e (% NT) e Nabs em (%NT). Foi obtido menor ENF (g/dia e % NT) para as dietas GS+ SC em relação à dieta SL, sendo observada excreção de 18,9 g/dia ou 25,6% menor para as dietas suplementadas com fontes de ácidos graxos ω6 em relação a ω3. Para o Nabs (%NT), foi

observada maior absorção também pata as dietas GS+SC em relação à dieta SL, em cerca de 5,0% unidades percentuais. Os resultados apresentados em relação ao C2 são justificados pelo CDPB apresentado pelas dietas GS+ SC em relação à dieta SL, que foi 6,72% maior para as dietas suplementadas com fontes de ácidos graxos ω6 em relação a ω3 (Tabela 7 e Figura 4B).

O Nabs (g/dia), médio no período pré-parto manteve-se em 177,55 g/dia, esta quantidade de nitrogênio absorvido equivale aproximadamente a 11,09 % de PB absorvida diariamente, sendo que as dietas foram balanceadas para 13,0% de PB, cerca de 2,0% de PB estariam excedendo a exigência diária de proteína para vacas de leite no pré-parto. Estes resultados estão de acordo com os relatados por GRUMMER (1995), onde constatou a perda dos mesmo 2,0% de proteína bruta na urina e fezes ao longo do pré-parto.

No período pós-parto foi observado efeito (P<0,05) de dieta para ENU (g/dia). Foi observado efeito (P<0,05) de tempo para CNT, ENF (g/dia) e (% NT), ENU (g/dia) e (% NT), excreção de nitrogênio no leite (ENL) (g/dia e % NT) (Figura 9A), Nabs e Nret (g/dia) e (% NT) e eficiência de utilização do nitrogênio para a produção de leite (N excretado no leite/ N consumido) (Figura 9B). Houve interação (P<0,05) entre as dietas experimentais e as semanas de lactação para CNT, ENF (g/dia e % NT), ENU (g/dia), Nabs (g/dia e % NT) e Nret (g/dia) (Tabela 9). No período de lactação apenas foi observado efeito (P<0,05) para o C3, em relação a variável ENU (g/dia), onde foi obtida maior excreção de N na urina para a dieta GS em relação a SC de aproximadamente 33,4 g/dia ou 13,6%.

Petit (2002), suplementou vacas no inicio da lactação com produção média de 33,50 kg/dia, com semente de linhaça integral, SCAG e grão de soja integral micronizado, avaliando o metabolismo de nitrogênio dos animais por 12 semanas de lactação não observou diferenças entre as dietas estudadas para consumo de nitrogênio total e excreção de nitrogênio no leite (g/dia), sendo que encontrou média de 537, 465 e 492 g/dia para CNT e 157, 142 e 150 g/dia, respectivamente para semente de linhaça, SCAG e grão de soja integral micronizado, resultados semelhantes aos obtidos neste estudo. No entanto a mesma autora observou maior excreção de nitrogênio nas fezes e urina para a dieta suplementada com semente de linhaça em relação às demais, resultados que diferem do presente estudo. Porém, no estudo de Petit (2002), a dieta suplementada com grão de soja integral sofreu intenso processamento, o que pode ter sido preponderante para a diferença observada entre os estudos. Já em estudo realizado por Cortês et al. (2010) não foram observados diferenças para CNT, ENF, ENU e

ENL (g/dia), quando vacas leiteiras, com produção média de 32,2 kg/dia foram suplementadas com semente ou óleo de linhaça em relação a dieta controle.

Tabela 9 - Média (±EPM) do balanço de nitrogênio de acordo com as dietas experimentais

Item	Dietas experimentais[1]				Probabilidades[2]					
	C	SL	GS	SC	Dieta	Tempo	INT	C1	C2	C3
				Consumo de nitrogênio (g/dia)						
Nitrogênio total										
PréP	255,6±6,5	249,5±5,3	234,8±7,3	225,7±6,9	0,992	<0,001	0,800	0,931	0,831	0,851
PósP	569,8±12,1	548,3±11,8	558,5±12,9	523,4±10,3	0,445	<0,001	0,258	0,163	0,424	0,889
				Excreção de nitrogênio (g/dia)						
Fezes										
PréP	70,4±2,8	73,8±1,8	53,5±1,9	56,3±2,2	<0,001	<0,001	0,011	0,011	<0,001	0,516
PósP	132,7±4,8	115,1±3,6	118,8±4,8	107,8±3,6	0,470	<0,001	<0,001	0,068	0,760	0,356
Urina										
PréP	96,5±8,4	87,8±5,3	91,5±6,0	75,8±5,6	0,609	0,988	0,060	0,385	0,770	0,340
PósP	258,7±10,0	228,9±11,1	246,5±14,3	213,1±6,2	0,043	0,004	<0,001	0,941	0,585	0,030
Leite										
PósP	151,4±3,4	152,8±3,0	150,5±3,3	159,7±3,1	0,900	<0,001	0,420	0,791	0,851	0,503
				Balanço de nitrogênio (g/dia)						
Nitrogênio absorvido										
PréP	185,7±4,8	175,3±4,4	180,4±6,5	169,9±6,1	0,564	<0,001	0,689	0,308	0,941	0,335
PósP	437,0±8,4	433,47±8,7	439,7±8,3	416,1±7,4	0,460	<0,001	0,006	0,322	0,265	0,535
Nitrogênio retido										
PréP	86,9±11,0	87,8±7,2	92,0±8,9	85,7± 9,5	0,992	<0,001	0,800	0,931	0,831	0,851
PósP	27,0±11,5	51,5±14,1	42,7±15,2	33,2±11,2	0,628	<0,001	<0,001	0,537	0,819	0,734
				Excreção de nitrogênio (% nitrogênio total)						
Fezes										
PréP	27,4±0,7	29,7±0,6	21,2±0,8	25,5±1,1	0,017	<0,001	<0,001	0,433	0,003	0,260
PósP	22,4±0,5	20,5±0,3	21,3±0,4	19,9±0,3	0,218	<0,001	<0,001	0,236	0,267	0,605
Urina										
PréP	39,2±3,2	36,6±2,1	40,9±3,2	38,3±4,4	0,975	0,022	0,187	0,934	0,714	0,784
PósP	48,4±2,2	54,2±3,3	44,4±3,1	45,4± 2,1	0,702	<0,001	0,207	0,659	0,827	0,284
Leite										
PósP	27,6±0,6	28,9±0,5	30,0±0,7	31,4±0,6	0,469	<0,001	0,817	0,225	0,417	0,579
				Balanço de Nitrogênio (% nitrogênio total)						
Nitrogênio absorvido										
PréP	72,5±0,7	70,2±0,6	76,7±0,8	74,4±1,1	0,017	<0,001	0,008	0,433	0,003	0,260
PósP	77,5±0,5	79,4±0,3	78,7±0,4	80,0± 0,3	0,318	<0,001	<0,001	0,236	0,267	0,705
Nitrogênio retido										
PréP	32,3±4,2	32,6±2,6	35,1±3,9	35,3±5,0	0,985	0,001	0,477	0,812	0,771	0,984
PósP	1,4±2,4	9,4± 3,5	7,6±3,1	3,1±2,3	0,602	<0,001	0,088	0,564	0,952	0,218
Eficiência *(N leite/N consumido)*										
PósP	0,27±0,01	0,29±0,02	0,30±0,01	0,31±0,02	0,564	<0,001	0,847	0,227	0,582	0,427

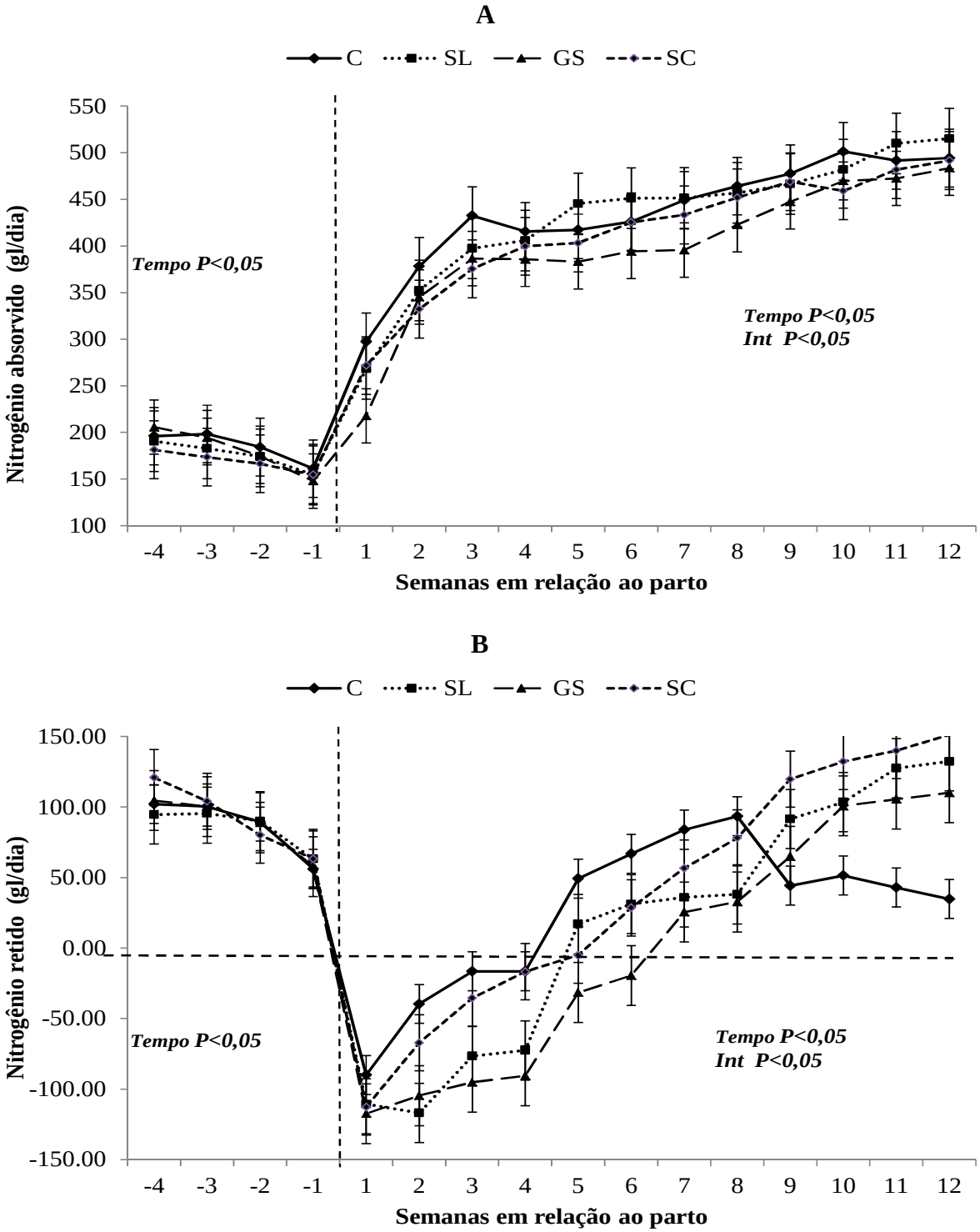
[1]Controle; [2]Semente de linhaça; [3] Grão de soja cru e integral; [4]Sais de cálcio de ácidos graxos insaturados, [2] Efeito de ; interação (INT), Contrastes ortogonais: Controle vs fontes lipídicas (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio de ácidos graxos insaturados (C2); grão de soja vs sais de cálcio (C3).

A interação observada para Nabs (g/dia) no pós-parto foi estabelecida a partir da 4ª semana de lactação com declínio na absorção de nitrogênio para a dieta C em relação ás demais dietas e aumento do Nabs para a dieta SL entre as semanas 4 a 7 do período pós-parto (Figura 8A). Já para o Nret (g/dia) a interação foi observada entre as semanas 8 e 9 do período de lactação com um forte declínio na retenção de nitrogênio da dieta C em relação as dietas suplementadas com fontes de ácidos graxos ω6 e ω3 (Figura 8B).

O Nret (g/dia) das dietas apresentou-se equivalente ao longo do período pré-parto, já no pós-parto foram observadas diferenças evidentes entre as dietas experimentais, visto que as dietas C e SL restabeleceram o balanço de nitrogênio positivo na 5ª semana de lactação, a dieta SC na 6ª semana e a dieta GS na 7ª semana de lactação. Estes resultados são justificados pela maior ENU (g/dia) da dieta GS (Tabela 9), bem como o menor CDPB (Tabela 7) desta mesma dieta, visto que não foi observado diferenças no CPB (Tabela 6) entre as dietas.

No estudo de Petit (2002) não foi observado diferença para Nret (g/dia) e (%NT), sendo obtidos 9,1; 11,2 e 11,0 (%NT) e 47,0; 52,0 e 54,0 (g/dia), respectivamente pra semente de linhaça, SCAG e grão de soja integral micronizado, resultados semelhantes ao do presente estudo com suplementação dos animais também por 12 semanas de lactação. Em outro estudo Petit et al. (2004) suplementaram vacas no início de lactação (DEL = 38) e produção média de 28,6 kg/dia, com semente de linhaça (C18:3), semente de girassol (C18:2) e SCAG e não observaram diferenças no Nret (g/dia) e (%NT), mesmos resultados obtidos por Cortês et al. (2010).

Figura 8 - Nitrogênio absorvido (A) nitrogênio retido (B), nos perídos pré e pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3).

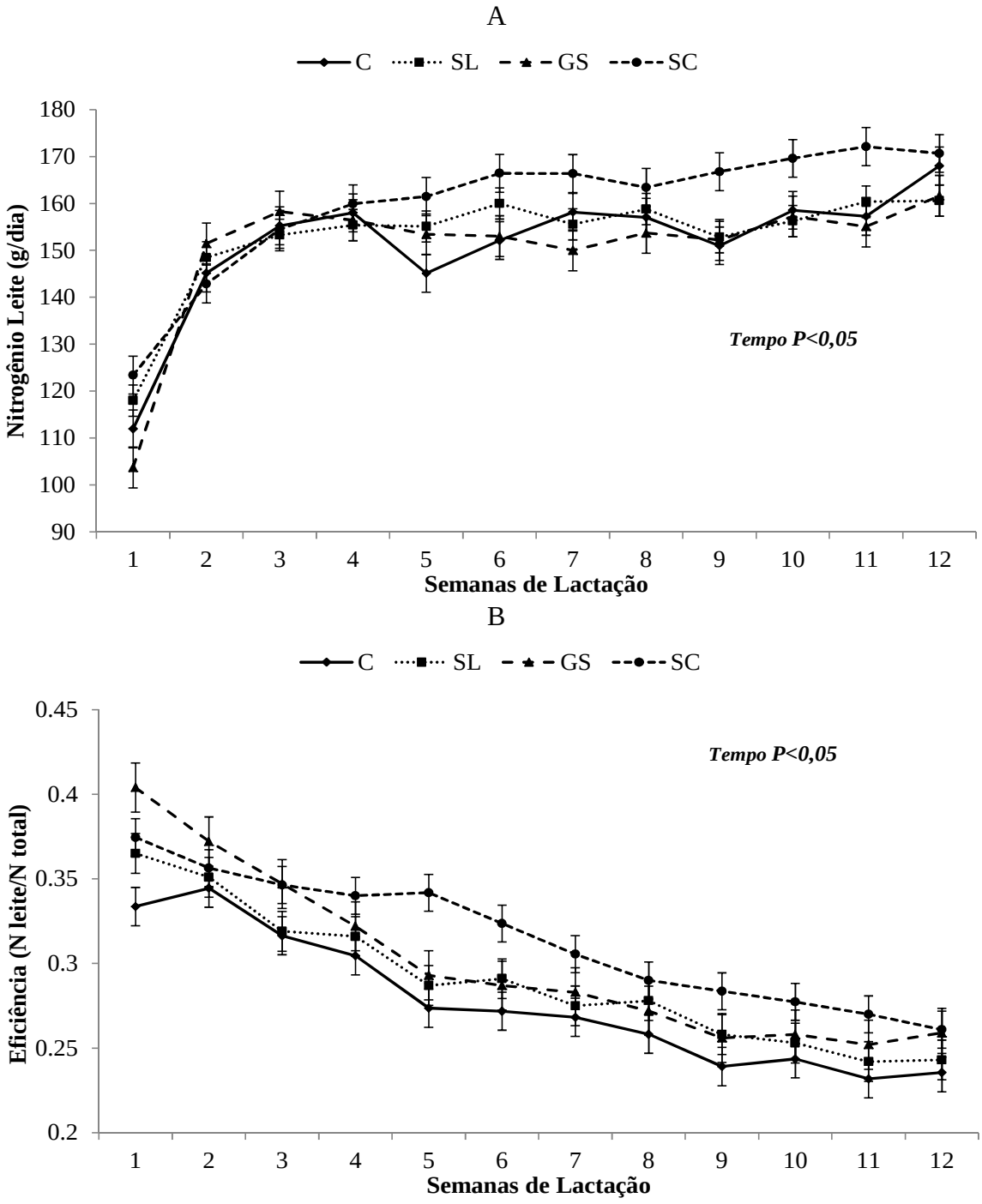


FONTE: (GANDRA, 2012)

As fontes de ácidos graxos ω6 e ω3 parecem não interferir no metabolismo de nitrogênio de vacas leiteiras no período de transição e inicio de lactação notadamente no nitrogênio retido (g/dia ou (%NT), somente influenciam variáveis intermediárias ao balanço

final de nitrogênio que são dependentes de variáveis como consumo e digestibilidade de proteína bruta.

Figura 9 - Nitrogênio no leite (A) eficiência de utilização do nitrogênio para a produção de leite (B), no pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3).



FONTE: (GANDRA, 2012)

6.5 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE

Não foi observado efeito (P>0,05) das fontes de ácidos graxos sobre a produção de leite (PL), produção de leite corrigida (PLC) (Figura 10B), proteína (Figura 12A e 12B) e lactose (kg/dia e %). Foi observado efeito (P<0,05) de tempo para PL, gordura, proteína e lactose (kg/dia e %). Não foi observado efeito de interação entre dieta e semanas de lactação para as variáveis avaliadas PL, PLC, gordura, proteína e lactose (kg/dia e %). A produção média de leite foi de 32,27 kg/dia, onde as dietas C; SL; GS e SC apresentaram (31.80, 31.43, 31.81 e 33,57kg/dia), respectivamente (Tabela 10).

Houve efeito (P<0,05) para o contraste C3 para gordura (kg/dia e %) sendo observado maior teor e produção de gordura (Figura 11A e 11B) para a dieta GS *vs* SC (3,52% *vs* 2,88%) ; (1,09 *vs* 0,92) respectivamente. A dieta GS apresentou maior produção e teor de gordura (Figura 10B) em relação às demais dietas experimentais (Tabela 10).

Na literatura é retratado o aumento do teor de gordura com a suplementação de grão de soja cru e integral na dieta de vacas leiteiras. Barletta et al. (2012) suplementaram vacas leiteiras no terço inicial de lactação, com média de 31,0 kg de leite/dia com níveis crescentes de grão soja cru e integral 0; 8, 16 e 24% na MS total da dieta, observando maior teor de gordura para o nível de 16% de inclusão sendo (2,96; 3,00; 3,30 e 3,06 %) respectivamente para 0; 8; 16; e 24% de inclusão de grão de soja. De maneira semelhante Venturelli et al.(2011) suplementaram vacas no final de lactação com média de produção de 23,0 kg/dia com níveis crescente de grão de soja cru e integral 0, 9, 18 e 27% na MS total da dieta, sendo observado efeito linear crescente com a inclusão (3,59, 3,95, 4,07 e 4,20 %), respectivamente. O maior valor percentual apresentado pela dieta grão de soja pode estar relacionado com a proteção que a matriz proteica exerce sobre a porção lipídica do grão, liberando lentamente a gordura no rúmen, minimizando os efeitos negativos da biohidrogenização incompleta sobre o teor de gordura do leite. Outro fato que poderia fundamentar a maior teor de gordura apresentado por esta dieta seria o grande conteúdo de FDN efetivo presente no grão de soja.

Para a produção de leite somente foi observado efeito (P<0,05) de semanas de lactação, onde a dieta SC apresentou a partir da 5ª semana de lactação uma produção numericamente superior às demais dietas e por outro lado foi observado persistência de produção pelas dietas C, SL e GS, a partir do mesma semana (Figura 5A). A produção de leite

das dietas SL e GS apresentaram-se sempre equilibradas ao longo de todo o período de lactação, havendo ligeira superioridade para a dieta GS, principalmente na 2ª, 5ª e 10ª semana de lactação, sendo (29,4 *vs* 28,5) ; (33,0 *vs* 31,4) e (33,2 *vs* 31,9), respectivamente para GS *vs* SL na 2ª, 5ª e 10ª semana de lactação. Por outro lado a dieta C apresentou produção intermediária, sendo observados valores superiores às dietas GS e SL, principalmente entre a 6ª e 8ª semana de lactação e inferiores a dieta SC a partir da 5ª semana (Figura 10A).

Petit et al. (2004) suplementaram vacas no início de lactação com semente de linhaça (C18:3), semente de girassol (C18:2) e sais de cálcio de ácidos graxos, os autores não observaram diferenças na produção de leite entre as dietas suplementadas com semente de linha (32,0 kg/dia) e sais de cálcio (31,5 kg/dia), porém observaram menor produção para dieta suplementada com girassol (25,9 kg/dia) em relação as anteriores. No entanto não observaram efeito das fontes de ácidos graxos ω6 e ω3 no teor de gordura do leite.

A suplementação com fontes de ácidos graxos ω3 parece não atuar negativamente na produção e composição do leite de vacas leiteiras no início de lactação, visto que Benchaar et al. (2012) suplementaram vacas leiteiras com níveis crescente de linhaça (0; 2; 3 e 4% de inclusão de óleo de linhaça na MS total da dieta), na dieta e não observaram diferenças para produção de leite e teores de gordura e proteína entre as dietas suplementadas a dieta controle. As fontes de ácidos graxos ω3 e ω6 utilizadas no presente estudo na forma de sementes não influenciaram negativamente a produção e composição do leite de vacas leiteira no período de transição e inicio de lactação. As dietas suplementadas com semente de linhaça ou grão de soja não foram superiores a dieta controle. Estes resultados são contrários aos apresentados por (PETIT et al., 2007; CHILLIARD et al., 2009; ZACHUT et al., 2010a). A divergência dos resultados observados é dependente do processamento sofrido pelas sementes de oleaginosas como a linhaça e o grão de soja.

Analisando o teor de gordura ao longo do período de lactação foi observado forte redução no teor de gordura para todas as dietas até a 4ª semana de lactação e a partir da 5ª semana a suplementação com ácidos graxos ω6 e ω3 influenciaram de maneira contundente o conteúdo de gordura do leite (Figura 11A). O teor de gordura do leite tende a ser mais elevada nas primeiras semanas de lactação, ficando estável no terço médio da lactação e aumentado novamente no terço final da lactação. A adição de fontes lipídicas pode deprimir a teor da gordura do leite dependendo da fonte utilizada pela formação de intermediários do processo de biohidrogenização incompleta de ácidos graxos na fermentação ruminal, onde a presença

de determinados ácidos graxos na glândula mamária inibe a ação da enzima Δ_9-desaturase responsável pela síntese de gordura do leite.

Foi observado maior conteúdo de gordura pela dieta GS em relação às demais, principalmente a partir da 5ª semana de lactação. Foi observada também uma forte redução no teor de gordura a partir da 4ª semana de lactação para a dieta SC, sendo esta redução contínua até a 10ª semana de lactação. O teor de gordura das dietas C e SL permaneceram constantes a partir da 5ª semana de lactação até o final do período experimental (Figura 11A e 11B).

Tabela 10 - Média (±EPM) da produção e composição do leite de acordo com as dietas experimentais

Item	Dietas experimentais[1]				Probabilidades[2]					
	C	SL	GS	SC	Dieta	Tempo	INT	C1	C2	C3
Kg/ dia										
PL	31,8±0,70	31,4±0,52	31,8±0,63	33,5±0,67	0,852	<0,001	0,242	0,827	0,596	0,517
PLC	29,9±0,64	28,9±0,52	31,6±0,61	29,5±0,56	0,752	0,284	0,647	0,957	0,462	0,412
Gordura	1,0±0,02	0,9±0,02	1,1±0,02	0,9±0,02	0,012	<0,001	0,598	0,932	0,376	0,049
Proteina	0,9±0,02	0,9±0,01	1,0±0,02	1,0±0,01	0,918	<0,001	0,759	0,702	0,750	0,636
Lactose	1,4±0,03	1,4 0,02	1,4±0,03	1,5±0,02	0,872	<0,001	0,485	0,684	0,646	0,592
Teor (%)										
Gordura	3,2±0,08	3,0±0,08	3,5±0,07	2,8±0,09	0,001	<0,001	0,102	0,622	0,285	0,001
Proteína	3,0±0,01	3,1±0,02	3,1±0,02	3,1±0,09	0,851	<0,001	0,404	0,484	0,642	0,783
Lactose	4,5±0,02	4,6±0,02	4,6±0,02	4,6±0,02	0,787	<0,001	0,171	0,322	0,954	0,806

[1]Controle; [2]Semente de linhaça; [3] Grão de soja cru e integral; [4]Sais de cálcio de ácidos graxos insaturados, [2] Efeito de ; interação (INT), Contrastes ortogonais: Controle vs fontes lipídicas (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio de ácidos graxos insaturados (C2); grão de soja vs sais de cálcio (C3).

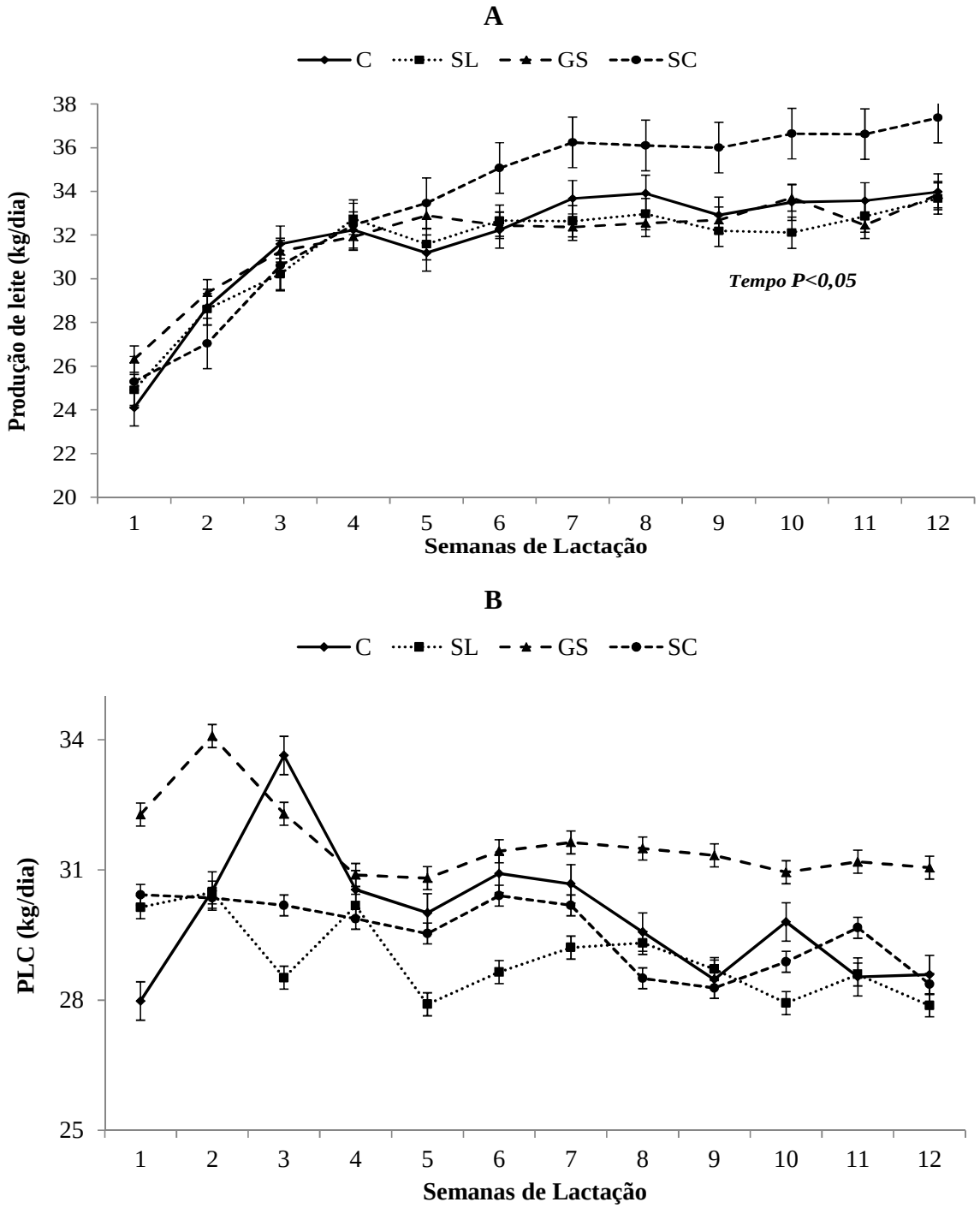
Analisando a influencia de ácidos graxos ω3 e ω6 nas variáveis PL e gordura (%), conjuntamente, ao longo do período de lactação foi observado um maior equilibro para as dietas GS e SL em relação a dieta GS. A forte depressão nos teores de gordura do leite pra dietas suplementadas com sais de cálcio podem estar relacionados com a eficiência do processo de proteção do produto no ambiente ruminal, que aumenta a formação de ácidos graxos intermediários da biohidrogenação no rúmen já que não houve redução do consumo de matéria seca (Tabela 6) e digestibilidade de fibra (Tabela 7).

Na literatura é amplamente discutido o poder de redução da gordura no leite em dietas de vacas leiteiras suplementadas com sais de cálcio de ácidos insaturados. Freitas Junior et al. (2010) avaliaram a inclusão de óleo de soja, SCAGi e grão de soja em dietas com

5,5 % de EE na matéria seca total, da dietas em vacas no terço médio de lactação com média de produção de 25,0 kg/vaca/dia. Estes autores observaram que os animais que consumiram a ração com sais de cálcio de ácidos graxos apresentaram menor teor de gordura no leite em relação às demais rações experimentais. De forma semelhante em estudo suplementando vacas leiteiras no período de transição e inicio de lactação com produção média de 30,0 kg/dia, com óleo de soja e SCAGi D'Angelo, (2009), observou também forte depressão dos teores de gordura do leite quando avaliou a dieta suplementada com sais de cálcio, sendo o teor médio de gordura observado em 12 semanas de lactação de 2,81% e semelhante a dieta com óleo de soja.

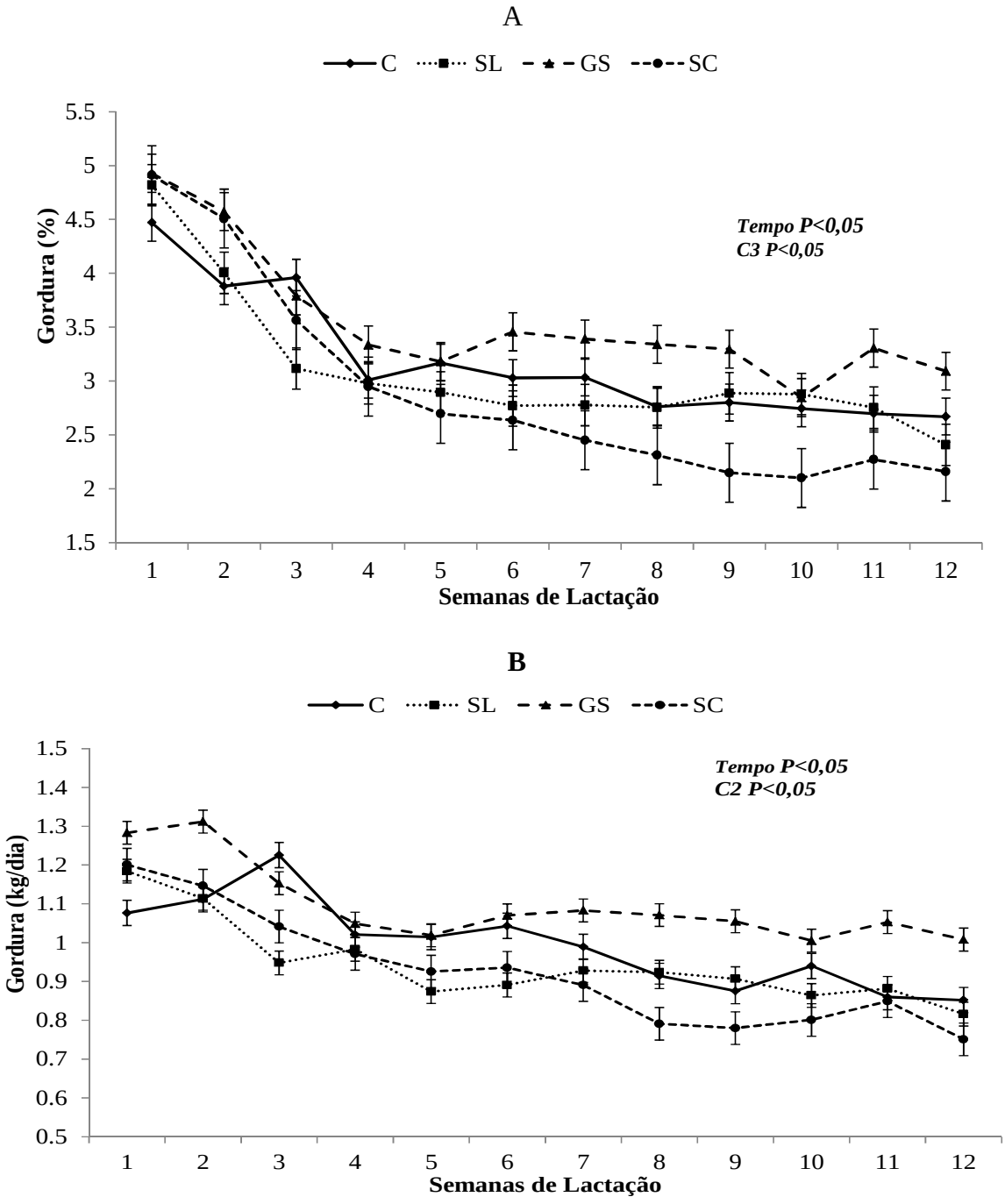
Por outro lado em recente estudo de Freitas Junior (2012), onde suplementou vacas leiteiras canuladas no rumem e abomaso com dieta controle, óleo de soja, grão de soja cru integral e SCAGi, mensurou o fluxo abomasal de ácidos graxos e bio-hidrogenação ruminal, não observou menor teor de gordura e maior concentração de C18:2 *trans*-10,*cis*-12 no leite para a dieta suplementada com sais de cálcio, concluindo que o grão de soja cru e integral e os sais de cálcio de ácidos graxos insaturados, reduz a taxa de biohidrogenação ruminal e aumentam o fluxo dos ácidos insaturados linoléico e linolênico no intestino delgado em comparação ao óleo de soja e a dieta controle. No entanto neste estudo o autor trabalhou com vacas no terço médio de lactação e com produção de leite inferior ao obtido neste, fato que pode ser preponderante para os teores de gordura no leite.

Figura 10 - Produção de leite (A) produção de leite corrigida (B), no pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3).



FONTE: (GANDRA, 2012)

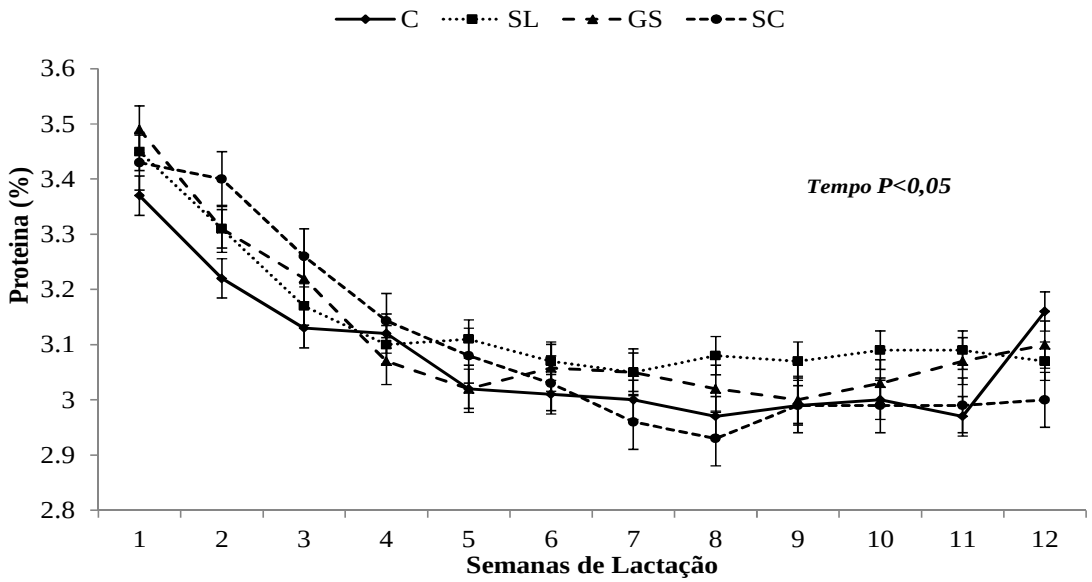
Figura 11 - Teor gordura (A) produção de gordura (B), no pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3).



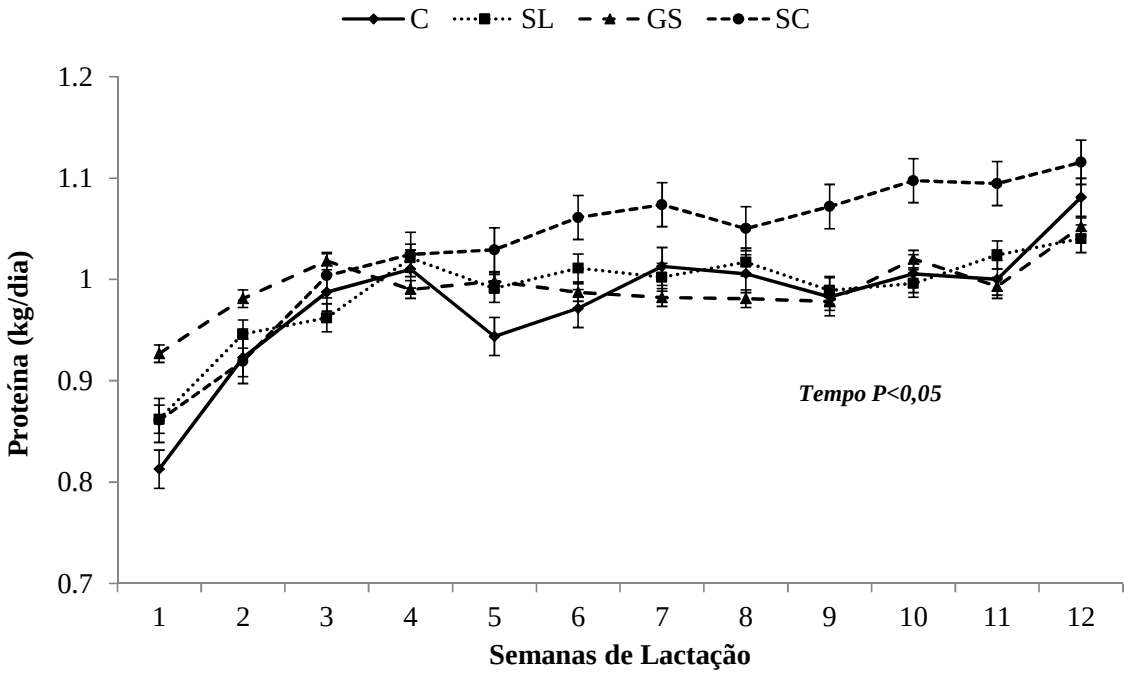
FONTE: (GANDRA, 2012)

Figura 12 – Teor de proteína (A) produção de proteína (B), no pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3).

A



B



FONTE: (GANDRA, 2012)

Em relação aos teores de proteína no leite ao longo do período de lactação foi observada uma forte redução em todas as dietas experimentais até a 4ª semana de lactação e após a 5ª semana foi observada uma equivalência nos teores de proteína até a 12ª semana para todas as dietas analisadas (Figura 12A). Foi observada maior concentração de proteína entre a 1ª e a 4ª semana de lactação para a dieta SC e entre a 5ª e a 11ª maior teor para a dieta SL. Em relação as dieta C e GS foi observada uma igualdade em todo o período de lactação (Figura 12A). Estes resultados contrariam a teoria de que o uso de alguns tipos de gorduras suplementares diminuem os teores de proteína, devido há substituição de carboidratos disponíveis no rúmen pelo lipídio, esse tem efeito tóxico sobre os microganismos 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.

6.6 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS NO LEITE

Foi observado efeito (P<0,05) de dieta para a maioria dos ácidos graxos avaliados, exceto para $C_{4:0}$, $C_{6:0}$, $C_{10:0}$, $C_{14:1}$, $C_{18:1cis\ 9}$. Foi observado efeito (P<0,05) de tempo também para a grande maioria dos ácidos graxos avaliados excetuando-se $C_{4:0}$, $C_{16:0}$, $C_{18:1trans\ 11}$; $C_{18:2}$ (Figura 14A)., $C_{18:3}$ e CLA $_{cis\text{-}9,\ trans\text{-}11}$ (Tabela 12). Foi observado efeito (P<0,05) de interação entre tempo e dieta para $C_{18:1trans\ 11}$ (Figura 13A)., $C_{18:3}$ (Figura14B). e CLA $_{cis\text{-}9,\ trans\text{-}11}$ (Figura 13B).

Os ácidos graxos de 4 a 16 carbonos são provenientes da glândula mamária através da síntese de novo sendo cerca de 45 a 60% do conteúdo total de ácidos graxos da gordura do leite. Através da síntese de novo são sintetizado todos os ácidos graxos de 4 a 14 carbonos e metade dos de 16 carbonos. Os ácidos graxos saturados são responsáveis por aproximadamente 70% do conteúdo total, sendo o mais abundante o C16, sendo seu conteúdo de 30% aproximadamente. Aproximadamente 25% são mono-insaturados sendo o mais abundante o C18:1 (23,8%). Os poli-insaturados correspondem aproximadamente 2,3%, sendo os mais importantes o C18:2 (1,7%) e C18:3 (0,7%) (CHILLIARD et al., 2007).

Na avaliação dos contrastes ortogonais foi observado efeito (P<0,05) para o C1 em relação aos ácidos graxos saturados de cadeia média ($C_{8:0}$, $C_{10:0}$, $C_{11:0}$, $C_{12:0}$,$C_{14:0}$) e ácidos graxos de 16 cadeia média ($C_{16:0}$ e $C_{16:1\ cis}$), onde foi observado maior concentração para a dieta controle em relação as dietas suplementadas com o fontes de ácidos graxos ω3 e ω6. Foi observado ainda efeito do C1 para os ácidos graxos de cadeia longa($C_{18:0}$, $C_{18:1\ trans-11}$, $C_{18:3}$, C18 $_{sat}$ e C18 $_{ins}$), porém para estes ácidos graxos foi observado maior concentração para as dietas SL, GS e SC em relação a dieta C (Tabela 12). Estes resultados podem ser explicados pelo conteúdo de ácidos graxos presentes na semente de linhaça, no grão de soja e no SCAGi e também pelo processo de bio-hidrogenação em nível ruminal, que pode mudar a configuração e a saturação dos ácido graxos de cadeia longa como o C18.

Foi observado efeito da dietas experimentais sobre o total de ácidos graxos de cadeia curta(<C16) e média (C16) (P<0,05), sendo as maiores concentrações obtidas para a dieta C em relação as dietas SL, GS e CS (C1). Diferentemente as concentrações de ácidos graxos de cadeia longa (>C16) foram maiores para as dietas SL, GS e CS em relação à dieta C.

Em relação ao C2 foi observado feito (P<0,05) para $C_{18:1\ trans-11}$ (Figura 13A)., $C_{18:2}$ (Figura 14B)., >C16, C18 $_{ins,}$ relação C18 insat/sat e total de ácido graxos insaturados, onde foi observado maior concentração para as dietas suplementadas com fontes de ácidos graxos ω6 (GS e SC) em relação a dieta suplementada com ácido graxo ω3. Somente foi observado maior concentração (P<0,05) para a dieta suplementada com semente de linhaça em relação às dietas GS e SC para o ácido graxo $C_{18:3}$ (Figura 14B). Estes resultados estão de acordo com o conteúdo do ácido graxo linoleico (grão de soja cru e no Megalac-E) e do linolênico (semente de linhaça) presente nas dietas experimentais.

Os resultados apresentados neste estudo em relação a concentrações de ácido graxos C18:2 e C18:3 no leite em função das suplementações de dietas ricas em ácidos graxos ω3 e ω6 estão de acordo com (PETIT , 2002; PETIT et al., 2002; PETIT et al., 2004; PETIT et al., 2007; ZACHUT et al., 2010a, b; BENCHAAR et al., 2012), sendo as fontes mais utilizadas: semente de linhaça, grão de soja , sais de cálcio de óleo de girassol e óleo de palma.

Os resultados observados para as concentrações dos ácidos graxos C18:2 e C18:3 ao longo do período de lactação evidenciam os dados já descritos na literatura , visto que foi observado maiores concentrações de C18:2 para as dietas suplementadas com grão de soja e sais de cálcio em relação as demais, principalmente a dieta SC (Figura 14A). A interação observada para as concentrações de C18:3 pode estar relacionada como aumento das

concentrações do ácido graxo apresentado pela dieta SL a partir do 21^{o} dia de lactação até o final do período experimental (Figura 14B)

Foi observado efeito (P<0,05) do C3 para a concentração dos ácidos graxos $C_{18:1\ trans-11}$ e CLA $_{cis-9,\ trans-11,}$ onde foi observado maior concentração para a dieta suplementada SCAGi em relação a com grão de soja cru e integral. Foi observada concentração 2,25 e 2,35 vezes maior para a dieta SC em relação à dieta GS, respectivamente para $C_{18:1\ trans-11}$ e CLA $_{cis-9,\ trans-11.}$ Estes resultados estão intimamente ligados com os teores de gordura do leite apresentados pela a dietas SC e GS (2,88 *vs* 3,55), respectivamente (Tabela 11 e Figura 11A). Estes resultados sugerem maior intensidade de bio-hidrogenação incompleta em ambiente ruminal por parte do SCAGi em relação ao grão de soja cru e integral.

Quando se avalia o processo de inclusão e digestão de gordura em ruminantes, a maioria dos ácidos graxos é modificada através do metabolismo ruminal, dessa forma a bio-hidrogenação normalmente não é completa, resultando em ampla variedade de ácidos graxos (BYERS; SCHEHING, 1993). Assim, quando ocorre bio-hidrogenação incompleta de ácidos graxos poliinsaturados, aumenta o fluxo duodenal de ácidos graxos C18:1 trans e ácido linoléico conjugado CLA cis-9, trans-11 e CLA trans-10, cis-12, apresentando comprovado efeito inibidor sobre a síntese de gordura do leite (BAUMAN; GRIINARI, 2003; PETERSON et al., 2003).

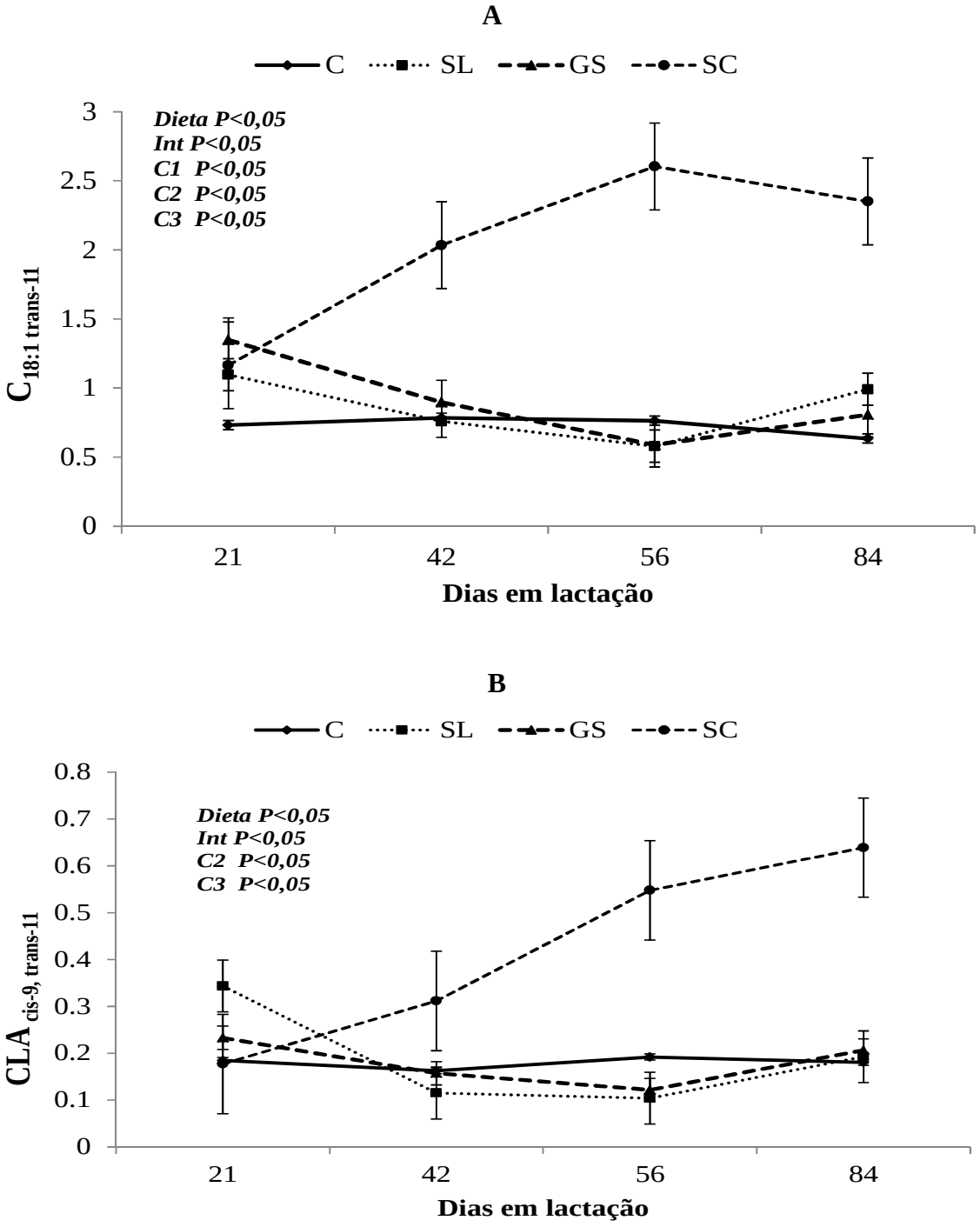
Segundo Doreau (2011) ácidos graxos livres são mais rapidamente e mais intensamente bio-hidrogenados no rúmen. À rápida ação das lipases ocorre separando o glicerol dos ácidos graxos tornando os disponiveis para adição de hidrogênio gerando os isômeros $C_{18:1\ trans-11}$ (Figura 13A) e CLA $_{cis-9,\ trans-11}$ (Figura 13B). Assim os resultados observados com maiores concentrações dos intermediários do processo de bio-hidrogenação para as dietas suplementadas com fontes de ácidos graxos ω3 e ω6 devido à grande quantidade de gordura disponível no rúmen, estão de acordo com os resultado de Chilliard et al. (2007), visto as concentrações principalmente de ácido vacênico ($C_{18:1\ trans-11}$). Pode-se então questionar o possível poder de proteção contra a bio-hidrogenação ruminal principalmente dos sais de cálcio de ácidos graxos em vacas leiteiras modernas de alta produção.

Tabela 11 - Média (±EPM) do perfil de ácidos graxos do leite de acordo com as dietas experimentais

Item	Dietas experimentais[1]				Probabilidades[2]					
	C	SL	GS	SC	Dieta	Tempo	INT	C1	C2	C3
			g/100g total AG							
C4:0	1,43±0,06	1,30±0,06	1,29±0,06	1,43±0,03	0,285	0,216	0,480	0,262	0,455	0,172
C6:0	1,36±0,07	1,24±0,07	1,10±0,05	1,15±0,07	0,166	0,028	0,573	0,054	0,723	0,265
C8:0	0,93±0,06	0,83±0,05	0,69±0,05	0,71±0,06	0,047	0,002	0,491	0,025	0,132	0,853
C10:0	2,16±0,18	1,94±0,13	1,52±0,14	1,63±0,16	0,123	0,004	0,727	0,060	0,710	0,139
C11:0	0,18±0,02	0,14±0,01	0,11±0,01	0,10±0,01	0,038	0,002	0,785	0,012	0,487	0,163
C12:0	2,55±0,22	2,20±0,15	1,72±0,16	1,94±0,18	0,038	0,003	0,860	0,035	0,525	0,189
C14:0	8,92±0,53	8,16±0,45	6,79±0,41	7,54±0,52	0,025	0,008	0,779	0,040	0,388	0,160
C14:1	0,38±0,04	0,36±0,03	0,32±0,02	0,34±0,02	0,653	0,006	0,743	0,339	0,656	0,497
C16:0	29,23±1,10	25,84±1,13	25,75±1,10	27,54±0,42	0,009	0,259	0,538	0,036	0,292	0,563
C16:1, *c*	1,34±0,08	1,01± 0,07	1,18±0,06	1,08±0,07	0,042	0,004	0,729	0,043	0,533	0,320
C18:0	13,12±0,56	16,40±0,76	15,85±0,49	16,82±0,80	0,001	0,001	0,365	0,001	0,316	0,941
C18:1*t11*	0,72±0,07	0,85± 0,12	0,90±0,17	2,03±0,20	0,001	0,932	0,004	0,020	0,008	0,002
C18:1*c* 9	29,33±1,43	29,35±1,47	31,55±0,81	33,27±1,49	0,189	0,006	0,602	0,218	0,086	0,416
C18:2	2,79±0,14	2,37±0,20	3,38±0,11	3,08±0,13	0,001	0,599	0,342	0,348	0,001	0,162
C18:3	0,14±0,01	0,30±0,02	0,20±0,01	0,18±0,01	0,001	0,651	0,004	0,005	0,001	0,369
cis-9,*trans*11	0,17±0,01	0,18±0,02	0,17±0,02	0,41±0,06	0,003	0,099	0,001	0,153	0,062	0,001
Total										
<C16	18,11±1,15	16,39±1,08	13,72±0,93	14,99±0,84	0,023	0,001	0,754	0,039	0,179	0,489
C16	30,58±1,13	26,86±1,15	26,94±0,44	28,62±1,17	0,032	0,267	0,540	0,027	0,333	0,523
>C16	46,75±2,04	49,61±2,30	52,51±2,32	56,48±1,04	0,004	0,008	0,603	0,004	0,029	0,128
C18										
Insaturado	33,18±1,59	32,93±1,65	36,23±1,67	39,15±0,83	0,018	0,024	0,570	0,085	0,010	0,175
Saturado	13,12±0,56	16,40±0,76	15,85±0,49	16,82±0,80	0,001	0,001	0,365	0,001	0,316	0,941
Insat/Sat	2,44±0,11	1,93±0,12	2,19±0,07	2,38±0,11	0,025	0,295	0,376	0,062	0,025	0,374
Total										
Saturados	60,41±2,33	58,68±2,41	55,32±0,85	59,27±2,61	0,521	0,253	0,570	0,367	0,293	0,652
Insaturados	35,03±1,66	34,40±1,72	37,85±1,74	40,62±0,85	0,031	0,024	0,587	0,143	0,012	0,218

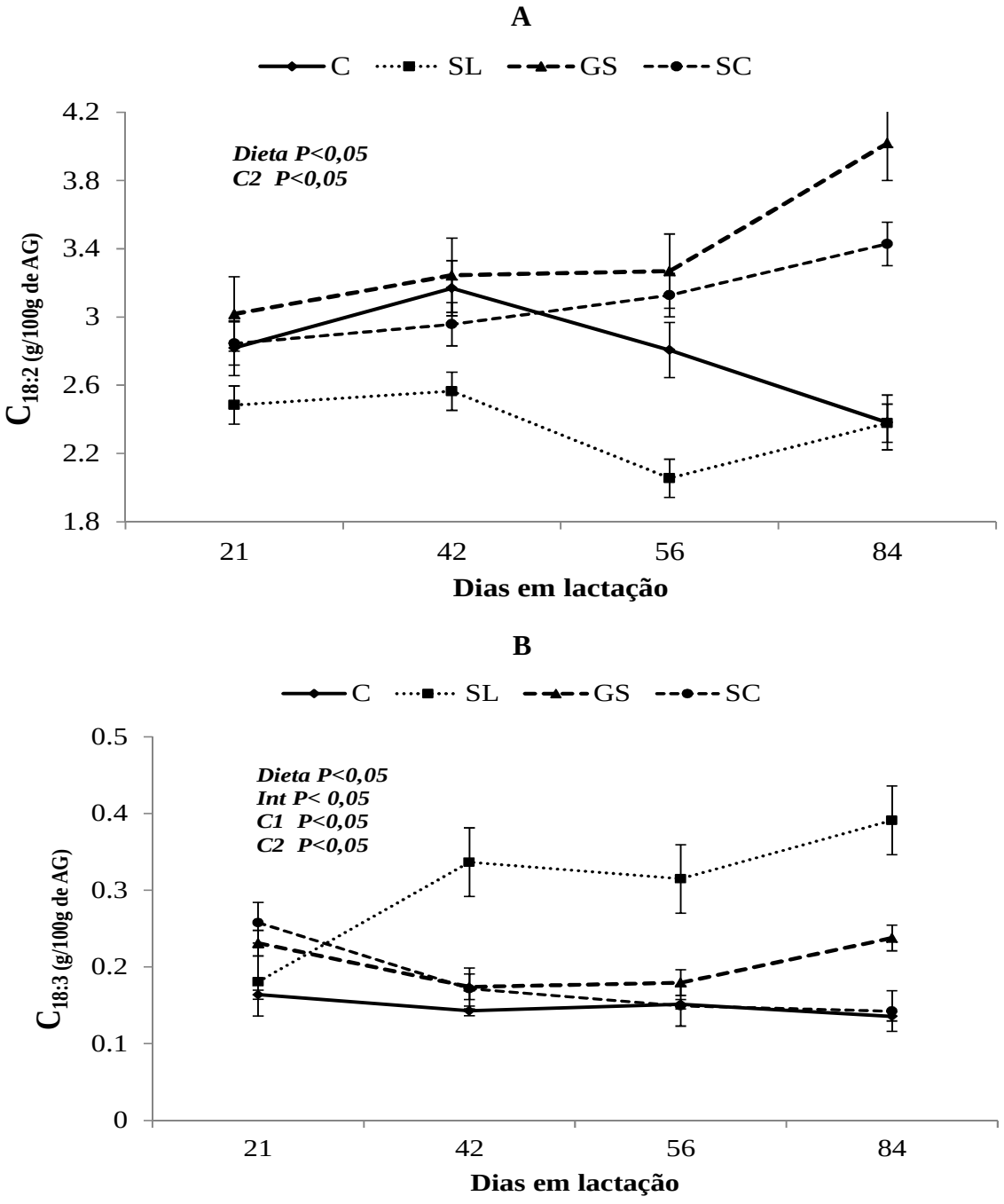
[1]Controle; [2]Semente de linhaça; [3] Grão de soja cru e integral; [4]Sais de cálcio de ácidos graxos insaturados, [2] Efeito de ; interação (INT), Contrastes ortogonais: Controle vs fontes lipídicas (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio de ácidos graxos insaturados (C2); grão de soja vs sais de cálcio (C3).

Figura 13 - Concentração de C18:1*trans-11* (A) CLA cis-9 trans-11 (B), no período pós-parto de acordo com as dietas experimentais Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3).



FONTE: (GANDRA, 2012)

Figura 14- Concentração de $C_{18:2}$ (A) $C_{18:3}$ (B), no período pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3).



FONTE: (GANDRA, 2012)

6.7 PESO E ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL

No pré-parto não foi observado efeito (P>0,05) de dieta para o peso corporal (PC), escore de condição corporal (ECC) e movimentação de peso corporal (MPC). Foi observado efeito (P<0,05) de tempo (semanas) para PC, ECC e MPC. Não houve interação (P>0,05) para as variáveis avaliadas PC, ECC e MPC (Tabela 12). Não foi observado efeito (P>0,05) para nenhum dos contrastes avaliados. No pós-parto não foi observado efeito (P>0,05) de dieta, interação e contrastes para PC, ECC e MPC. Foi observado efeito (P<0,05) de tempo para PC e MPC (Tabela 12). Os resultados obtidos para o pré e pós-parto estão de acordo com o CMS (Tabela 6, Figura 1A), BE (Tabela 8, Figura 6A) e as concentrações de ácidos graxos não esterificados (AGNE) (Tabela 13 e Figura 18A).

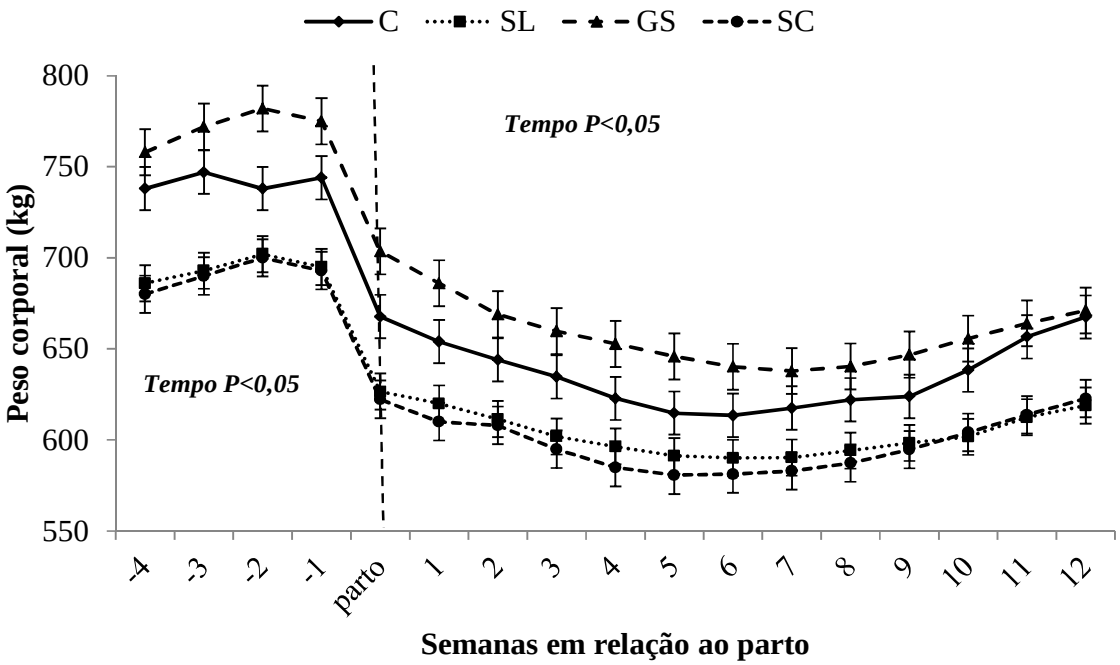
Tabela 12 - Média (±EPM) do peso corporal (PC), escore de condição corporal (ECC) e mudança de peso corporal (MPC) no período pré e pós-parto de acordo com as dietas experimentais

Item	Dietas experimentais[1]				Probabilidades[2]					
	C	SL	GS	SC	Dieta	Tempo	INT	C1	C2	C3
Peso corporal (kg)										
PréP	742±16,9	694±12,6	762±15,1	691±12,4	0,244	<0,001	0,198	0,476	0,291	0,105
PósP	635±7,21	602±6,64	657± 8,33	598±6,64	0,299	<0,001	0,599	0,574	0,423	0,098
Escore de condição corporal										
PréP	2,8±0,04	2,9±0,04	3,1±0,02	2,8±0,03	0,233	0,005	0,606	0,320	0,744	0,332
PósP	2,5±0,01	2,5±0,02	2,6±0,01	2,5±0,01	0,784	0,145	0,667	0,972	0,489	0,777
Mudança de peso corporal (kg)										
PréP	1,2±1,34	2,5±1,66	4,1±1,77	3,5±1,69	0,169	0,007	0,419	0,169	0,767	0,419
PósP	-7,5±2,21	-6,0±1,75	-7,1±1,91	-6,2±1,90	0,008	<0,001	0,401	0,169	0,210	0,402

[1]Controle; [2]Semente de linhaça; [3] Grão de soja cru e integral; [4]Sais de cálcio de ácidos graxos insaturados, [2] Efeito de ; interação (INT), Contrastes ortogonais: Controle vs fontes lipídicas (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio de ácidos graxos insaturados (C2); grão de soja vs sais de cálcio (C3).

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 (PETIT et al., 2007; MOALLEM et al., 2007; ZACHUT et al., 2010ª; HAYIRLI et al., 2011), que avaliaram a suplementação de fontes de ácidos graxos ω6 e ω3 em vacas no período de transição e inicio de lactação também não observaram diferenças no PC, ECC e MPC.

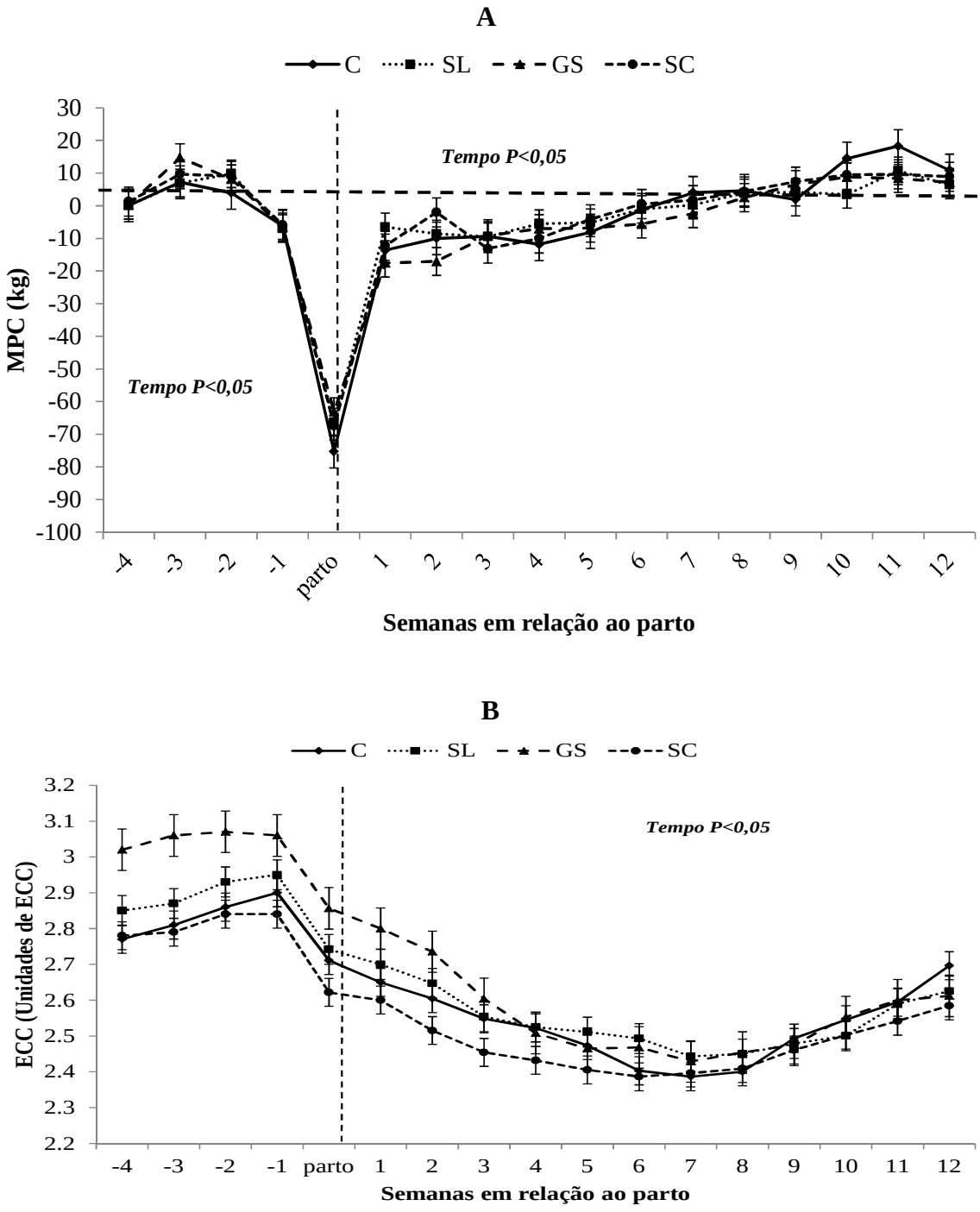
Figura 15 - Peso corporal nos períodos pré e pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3).



FONTE: (GANDRA, 2012)

Avaliando o PC (Figura 15) e MPC (Figura 16A) ao longo de todo o período experimental, foi observado um discreto ganho de peso entre as semanas – 4 a -2 em relação ao parto para todas as dietas avaliadas . 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 18A) e consequente mobilização de reservas corporais (GRUMMER, 1995; DRACKLEY, 1999; OVERTON; WALDRON, 2004). 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).

Figura 16 - Mudança de peso corporal (A) e escore de condição corporal (B) nos períodos pré e pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3).



FONTE: (GANDRA, 2012)

Da semana posterior ao parto até o final do período experimental foi observado redução de PC para todas as dietas experimentais, sendo observado um declínio suave até a 7ª

semana de lactação e um aumento no PC a partir da 8ª semana (Figura 15). Este comportamento está de acordo com os resultados obtidos por Rennó et al. (2006), quando avaliaram vacas multíparas, de alta produção com ECC ≥ 3,25.Em relação à MPC ao longo do período de lactação, foi observado igualdade na movimentação corpórea para todas as dietas avaliadas, sendo que foi obtido melhor BE (Tabela 8) para as dietas suplementadas com ácidos graxos ω6 e ω3 e não foi observado efeito a PL (Tabela 10), CMS (Tabela 6) e concentração de AGNE (Tabela 12), pode-se inferir que a MPC não é um parâmetro confiável para predição de mobilização de tecido adiposo em vacas no período de transição concordando com as conclusões elaboradas por Rennó et al. (2006). As dietas C e SC apresentaram movimentação positiva na 6ª semana de lactação, já a dieta SL na 7ª semana e a dieta GS apresentou retorno à movimentação positiva apenas na 8ª semana de lactação (Figura 16A).

No pré-parto foi observado variação positiva de 0,1 unidades de ECC entre as dietas experimentais da semana -4 até a semana anterior ao parto. O escore de condição corporal médio no momento do parto (± 24 horas) foi de aproximadamente 3,00. A variação negativa máxima do ECC no pós-parto ocorreu do dia do parto (± 24 horas) a 7ª semana de lactação (0,6 unidades de ECC) (Figura 16B). Entre a 8ª e 12ª semana de lactação foi observada variação positiva de aproximadamente 0,2 unidades de ECC. As experimentais apresentaram perda 0,61; 0,55; 0,64 e 0,50 unidades de ECC do momento do parto a 7ª semana de lactação, respectivamente para as dietas C, SL, GS e SC e variação positiva de ECC de 0,29; 0,18; 0,16 e 0,18 respectivamente para as dietas C, SL, GS e SC (Figura 16B).

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 condições nutricionais, sanitárias e manejo adequadas para vacas leiteiras no período de transição.

6.8 PARÂMETROS SANGUÍNEOS

No período pré-parto foi observado efeito de dieta (P<0,05) na concentração de glicose (GLI), colesterol total (COL), triglicerídeos (TRI). Também foi observado efeito de tempo (P<0,05) na concentração de GLI e COL, bem como na concentração dos ácidos graxos não esterificados (AGNE). Houve interação entre dieta e tempo (P<0,05) para COL (mg/dL) (Tabela 13).

Foi observado (P<0,05), efeito para o C1, onde os animais que consumiram dietas suplementadas com fontes de ácidos graxos (SL, GS ou SC) apresentaram em média, mais 15,05 mg/dL de TRI em relação aos que consumiram dieta controle (Tabela 12). Estes resultados estão de acordo com o CEE (Tabela 6 e Figura 2A) observado para as dietas suplementadas com fontes de ácidos graxos ω6 e ω3 .

Houve efeito de C2 (P<0,05) em GLI no período pré-parto, em que a dieta rica em ω3 (SL) proporcionou aumento de 8,21 mg/dL em relação às dietas ricas em ω6 (GS e SC), o que representa uma diferença de 11,61%, neste período (Tabela 12). Estes resultados podem ser justificados pelo maior CMS (Tabela 6 e Figura 1A) no pré-parto observado para a dieta SL em relação as dieta GS+SC.

Também foi observado efeito (P<0,05) de C3 para a concentração de COL no pré-parto, com maior concentração em vacas que consumiram GS, sendo 34,87 mg/dL ou 25,28% maior em relação às que consumiram SC (Tabela 13). Este resultado pode estar relacionado com a extensão da bio-hidrogenação ruminal do grão de soja cru integral e do Megalac-E, para vacas secas e com a quantidade de ácidos graxos ω6 e ω3 que foram absorvidos em nível de intestino delgado, pois se a dieta GS tem menor bio-hidrogenação em relação a dieta SC a quantidade de ácidos graxos ω6 e ω3 absorvido vai ser maior para GS em relação a SC e sendo estes ácidos graxos percussores diretos da síntese de colesterol, este resultado seria justificado.

A dieta SL apresentou maiores concentrações de glicose ao longo do pré-parto em relação às demais, mesmo sendo observada uma queda considerável na concentração sanguínea entre os dias -21 a – 7. Comportamento também observado para as dietas GS e SC. No momento do parto houve um pico nas concentrações plasmáticas de GLI (67,5 mg/dL) para todas as dietas avaliadas. Este comportamento esta relacionado com o gasto energético dos animais durante o parto (Figura 17A). Este comportamento da concentração de GLI no

momento do parto também foi observado por Hayirli et al. (2011), quando suplementaram vacas leiteiras no período de transição com sementes de linhaça (C18:3), linola(C18:2) e canola(C18:1) que obteve um pico de GLI em torno de 75,0 mg/dL.

A interação observada para a concentração de COL no pré-parto ocorreu devido a queda abrupta das concentrações de COL apresentada pela dieta GS entre os dias -21 a -7 em relação ao parto (Figura 17B). As concentrações de COL se mantiveram elevadas ao longo do pré-parto para a dieta GS em relação às demais, mesmo tendo ocorrido esta queda abrupta mencionada anteriormente, visto que após o dia -7 houve um aumento continuo na concentração sanguínea de COL até o momento do parto. Esta queda abrupta também foi observada para a dieta SL entre os dia -21 a -7 em relação ao parto, porém a dieta SL não apresentou aumento contínuo até a data do parto, mantendo-se constante após este declínio. As dietas C e SC apresentaram concentrações semelhantes e constantes ao longo do período seco (Figura 17B).

Analisando a concentração de AGNE no pré-parto foi observado aumento gradativo para todas as dietas até o momento do parto, sendo este aumento mais pronunciado para as dietas suplementadas com fonte de ácido graxo ω6 em relação a dieta SL (ω3) ou a dieta C. A dieta SL manteve concentrações constantes de AGNE entre os dias -21 a -14 em relação ao parto, sendo observado aumento abrupto a partir do dia -7 ao momento do parto. A concentração média de AGNE no momento do parto foi de 0,884 mmol/L (Figura 18A).

Bertics et al. (1992) relatou que o CMS é inversamente proporcional à concentração de AGNE e β-hidroxibutirato (BHBA) no plasma. Os dados do presente estudo concordam com esta observação visto que foi observado menor CMS (Tabela 6 e Figura 1A) no pré-parto para as dietas GS e SC em relação à dieta SL, visto que numericamente foi observado menor concentração de AGNE (Figura 18A) e BHBA (Figura 18B) para a dieta SL em relação as dietas GS e SC no pré-parto.

O CMS no pré e pós-parto contribui para um aumento da lipidose hepática, devido à maior concentração plasmática de AGNE e hepática de TRI (Van Den Top et al., 1996) e a capacidade limitada das vacas de leite para exportar TRI hepáticos como VLDL (GRUMMER, 1993). Além disso, elevadas concentrações plasmáticas de AGNE e BHBA estão associadas com uma baixa taxa de aumento de CMS precoce no pós-parto (VAZQUEZ-ANON et al., 1994).

Tabela 13 - Média (±EPM) dos parâmetros sanguíneos nos períodos pré e pós-parto, de acordo com as dietas experimentais

Item	Dietas experimentais[1]				Probabilidades[2]					
	C	SL	GS	SC	Dieta	SEM	INT	C1	C2	C3
				mg/dL						
Glicose										
PréP	64,3±1,04	70,7±1,06	60,0±1,11	64,9±1,01	0,043	0,014	0,701	0,799	0,043	0,284
PósP	62,0±1,09	67,2±1,07	57,4±1,05	59,4±1,04	0,020	0,038	0,955	0,845	0,041	0,663
Colesterol total										
PréP	95,8±1,01	118,9±0,90	137,9±1,02	103,1±1,04	0,015	0,001	0,037	0,287	0,157	0,042
PósP	142,0±1,82	148,3±1,77	184,4±1,96	162,7±1,94	0,011	<0,001	0,022	0,018	0,123	0,311
Triglicerídeos										
PréP	25,4±1,39	50,3±0,89	41,0±0,85	30,1±0,81	0,014	0,987	0,959	0,007	0,159	0,185
PósP	28,6±1,23	34,7±1,19	41,1±1,10	37,1±1,08	0,041	0,499	0,228	0,874	0,116	0,569
				mmol/L						
Ácidos graxos não esterificados										
PréP	0,39±0,03	0,36±0,02	0,45±0,05	0,41±0,05	0,566	0,009	0,202	0,744	0,211	0,525
PósP	0,63±0,06	0,67±0,03	0,72±0,04	0,74±0,07	0,791	<0,001	0,797	0,422	0,573	0,865
β-hidroxibutirato										
PréP	0,55± 0,07	0,45± 0,03	0,55±0,05	0,65± 0,04	0,305	0,127	0,991	0,982	0,104	0,363
PósP	0,61±0,03	0,64±0,07	0,83± 0,05	0,77±0,08	0,209	0,162	0,325	0,149	0,740	0,116

[1]Controle; [2]Semente de linhaça; [3] Grão de soja cru e integral; [4]Sais de cálcio de ácidos graxos insaturados, [2] Efeito de ; interação (INT), Contrastes ortogonais: Controle vs fontes lipídicas (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio de ácidos graxos insaturados (C2); grão de soja vs sais de cálcio (C3).

No período pós-parto foi observado efeito de dieta (P<0,05) na concentração de glicose (GLI), colesterol total (COL), triglicerídeos (TRI). Também foi observado efeito de tempo (P<0,05) na concentração de GLI e COL, bem como na concentração dos ácidos graxos não esterificados (AGNE). Houve interação entre dieta e tempo (P<0,05) para COL (mg/dL) (Tabela 13). Na avaliação dos contrastes ortogonais foi observado efeito do C1 para as variáveis COL e TRI, onde as dietas suplementadas com fontes de ácidos graxos apresentaram maiores concentrações em relação à dieta controle. Foi obtido concentrações 23,15 e 8,98 mg/dL, (respectivamente para COL e TRI) superiores para as dietas suplementadas com ácidos graxos ω3 e ω6 em relação a dieta controle. Estes resultados estão também de acordo como o maior CEE (Tabela 6 e Figura 2A) apresentados pelas dietas SL, GS e SC. Os resultados obtidos estão de acordo com para asa concentrações de COL estão de acordo com (GARCIA-BOJALIL et al., 1998; PETIT et al., 2004)

Houve efeito de C2 (P<0,05) em GLI no período pós-parto, em que a dieta rica em ω3 (SL) proporcionou aumento de 8,81 mg/dL ou de 5,92% em relação às dietas ricas em ω6 (GS e SC), o que representa uma diferença de 11,61%, neste período (Tabela 13). Petit et al. (2007), avaliaram o efeito de ácidos graxos ω6 (sais de cálcio de ácido graxo) e ω3 (semente de linhaça) em vacas leiteiras no período de transição, observaram menor concentração de GLI no pós parto para a dieta suplementadas com ácidos graxos ω6.

A dieta SL apresentou maiores concentrações de GLI que as demais ao longo do período de lactação. As dietas GS e C apresentaram concentração e comportamento para a GLI semelhante ao longo do período de lactação. Após o parto a concentração de GLI das dietas experimentais apresentou um declínio até o dia 7 pós-parto, em média de 11,75 mg/dL, sendo que para dieta SC este declínio prosseguiu até o dia 21 pós-parto (Figura 17A). Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por Hayirli et al. (2011).

A interação observada para a concentração de COL no período de lactação esta relacionada com um aumento considerável desta variável para a dieta GS, principalmente a partir do 14^{o} dia de lactação, onde a dieta GS supera as demais até o final do período experimental (Figura 17B). A concentração de COL para as dietas GS e SL apresentaram semelhantes do momento do parto até o 42^{o} dia de lactação, onde foi observado um aumento para a dieta SC (Figura 17B).

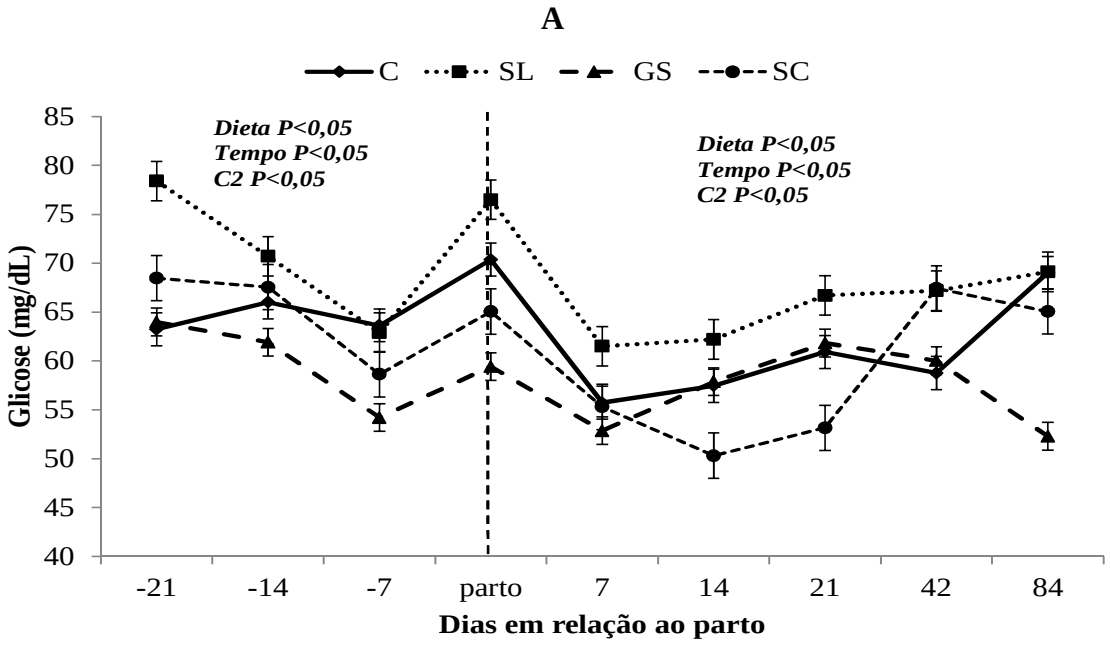
Foi observado pico (0,936 mmol/L) na concentração de AGNE no 7^{o} dia de lactação para todas as dietas experimentais, sendo que a dieta SC apresentou maior concentração (1,071 mmol/L) em relação às demais. Após o 7^{o} dia de lactação todas as dietas experimentais apresentaram constante diminuição nas concentrações de AGNE até o final do período experimental, sendo observado menores concentrações para a dieta SL, principalmente entre os dias 7 a 21 do período de lactação (Figura 18A).

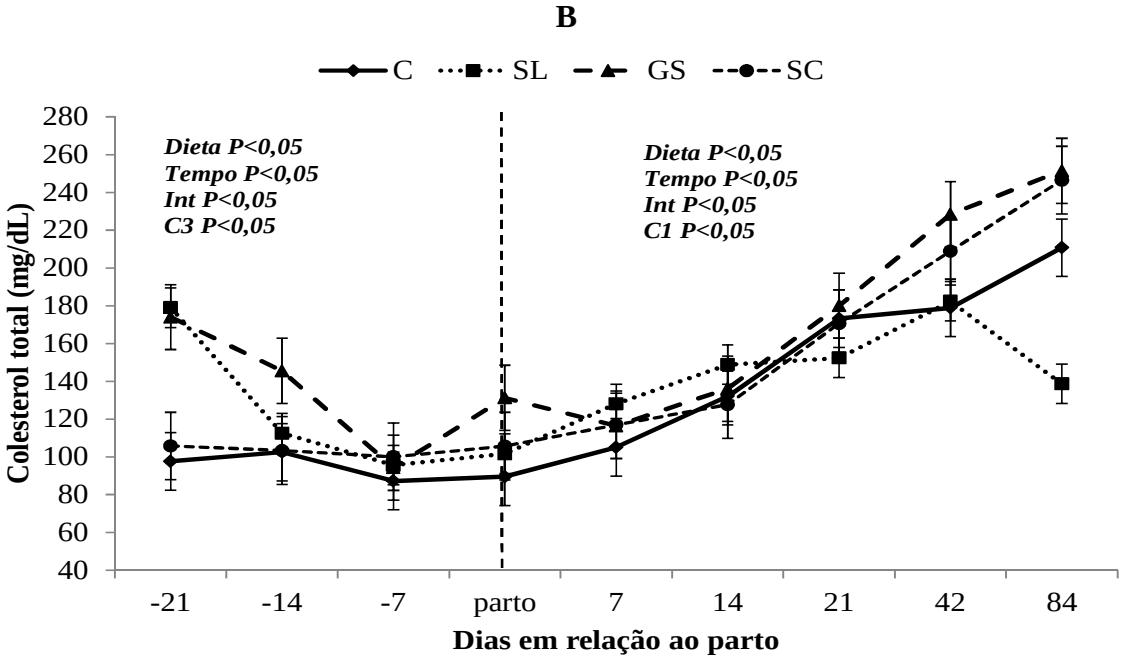
A concentração plasmática de AGNE é um índice de mensuração da magnitude da mobilização do tecido adiposo (BOBE et al., 2004). De acordo com Mashek, Bertics e Grummer (2005), a infusão de emulsão de sebo resultou em maiores concentrações plasmáticas de AGNE e glicose, enquanto a infusão de óleo de linhaça resultou em concentrações mais baixas AGNE e BHBA. Além disso, Mashek, Bertics e Grummer (2005) relataram que o conteúdo de TRI hepático foi menor para as vacas infundidos com óleo de linhaça em comparação com aqueles com infusão de emulsão de sebo, o que pode sugerir que as vacas que receberam o óleo de linhaça seriam menos susceptíveis ao desenvolvimento de fígado gorduroso.

Apesar de não ter sido observado efeito na concentração de BHBA (mmol/L) para nenhum dos fatores analisados (dieta, tempo, interação e contrastes) foi observado diferenças numéricas importantes, entre as dietas ao longo do pré e pós-parto (Figura 18B). Entre os dias -21 a -7 a dieta SC apresentou maior concentração em relação as demais e aa dieta SL apresentou menor concentração ao longo de todo o período pré-parto até omomento do parto. A dieta GS apresentou um aumento consideravel na concentração de BHBA do dia – 7 até o dia 7 em relação ao parto (Figura 18B). Ao longo da lactação as concentrações de BHBA entre as dietas experimentais foram semelhantes. Este comportamento está de acordo com o CMS (Tabela 6 e Figura 1A), BE (Tabela 8 e Figura 6A) ECC (Figura 16B) constatados neste estudo.

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 para 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 suplementação com fontes de ácidos graxos ω6 e ω3 em vacas leiteiras o período de transição parece contribuir para a diminuição dos riscos de doenças metabólicos no pós-parto.

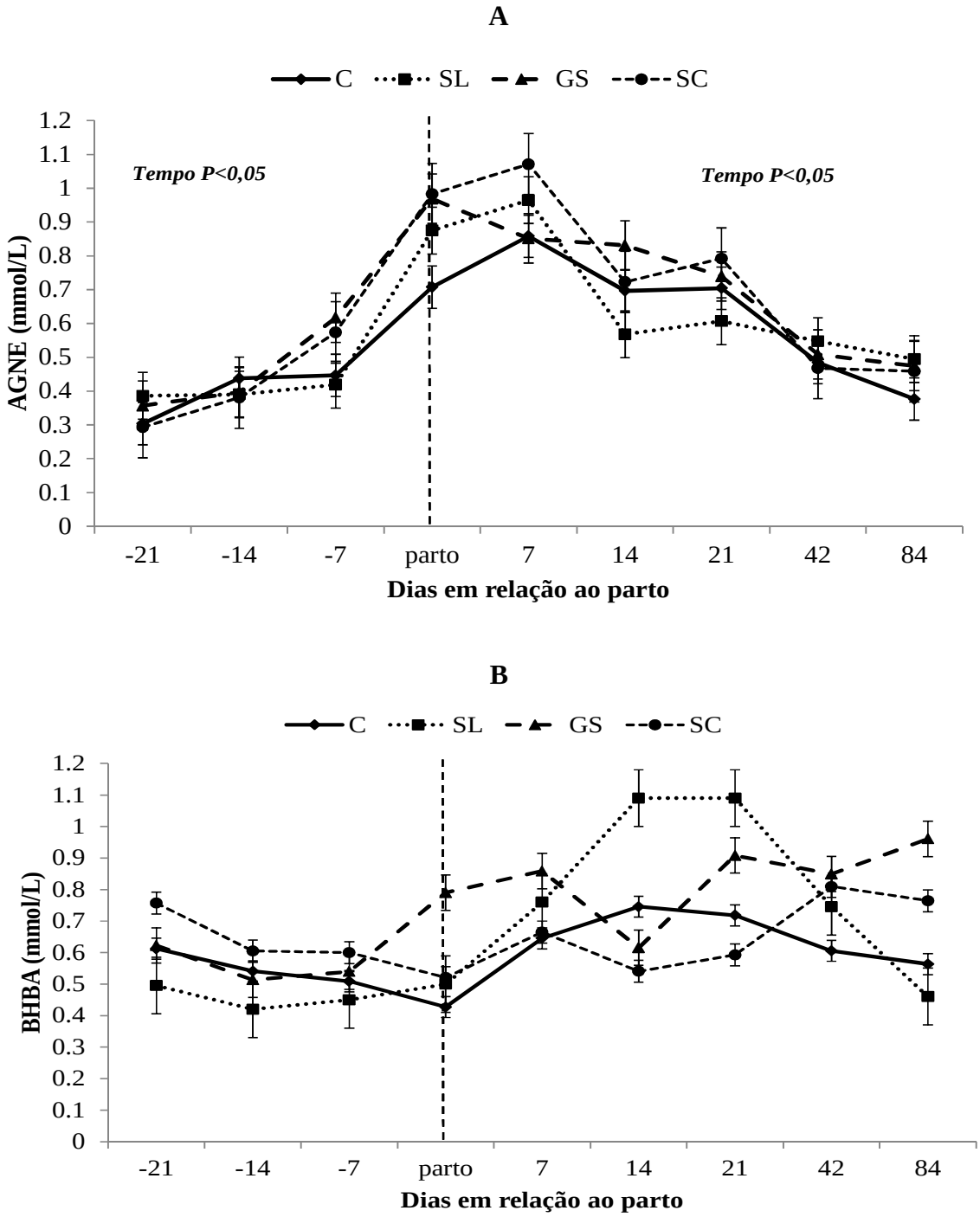
Figura 17 - Concentração de glicose (A) colesterol total (B), no pré e pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3).





FONTE: (GANDRA, 2012)

Figura 18 - Ácidos graxos não esterificados (A) e β-hidroxibutirato (B) no pré e pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3).



6.9 DINÂMICA FOLICULAR

Foi observado efeito (P<0,05) de dieta apenas para o número total de folículos (NTF) e para os folículos de classe 1 (<3mm) (CLA1). Foi observado efeito de tempo para NTF, folículos de classe3 (6-9mm) (CLA3) e de classe 5 (>15mm) (CLA5). Houve interação entre tempo e dieta para NTF, folículos de classe 2 (3-5mm) (CLA2) e CLA3. Não foi observado efeito para nenhum dos fatores avaliados (dieta, tempo, interação ou contrastes) para folículos de classe 4 (10-15mm) CLA4, número ou área do corpo lúteo (CL).

Petit et al. (2002) ao suplementarem vacas no início de lactação com quatro fontes de gordura não encontroaram diferença em relação ao número de folículo de classe1 classe2, classe3, área do corpo lúteo, porém o número total de folículos de classe1, classe2 e classe3, foi semelhante ao observado neste estudo .Resultados semelhantes podem ser observados em (PETIT et al., 2004; BILBY et al., 2006b; GARNSWORTHY et al., 2008).

Analisando os contrastes ortogonais foi observado efeito para o C1 em relação às variáveis NTF e CLA1, onde as dietas suplementadas com fontes de ácidos graxos ω3 e ω6 apresentaram maior NTF e CLA1 em relação a dieta controle. Em média foram observados 28,3% de folículos a mais para as dietas (SL, GS e SC) em relação a controle ao longo de aproximadamente 56 dias de avaliação. Em relação a CLA1 foi observado (1,27 vs 4,21),respectivamente para a dieta controles *vs* fontes de gordura, sendo esta diferença de aproximadamente de 69,8 % . Estes resultados estão relacionados de acordo com o BE (Tabela 8) apresentado pelas dietas suplementadas com fontes de ácidos graxos em relação a controle.

De forma semelhante Maturana Filho (2009) suplementando vacas leiteiras no período de transição e início de lactação com óleo de soja ou SCAGi, durante -28 a 84 dias de lactação com média de produção em torno de 31,24 kg/dia, observou maior NTF para as dietas suplementadas com fontes de ácidos graxos em relação à dieta controle sendo (15,12 vs 13,97), respectivamente para dietas suplementadas com fontes de graxos e dieta controle.

Os efeitos observados, podem estar relacionados ao maior aporte de ácidos graxos para os ovários das vacas suplementadas com ácidos graxos ω3 e ω6, que é capaz de alterar a expressão do mRNA para a codificação de fatores intra-foliculares como ativinas, inibinas e IGF-1, diferenciar o crescimento de folículos pré antrais, sugerindo que um aumento da absorção de ácidos graxos no intestino pode melhorar o aporte de colesterol total (Tabela 12,

gráfico 7B) no fluido folicular plasmático e refletir na modulação de mecanismos voltados ao recrutamento de foliculos antrais ou pré-iniciais, que também podem melhorar a qualidade do oócito (LEROY et al., 2010) (Tabela 15 e Figura 20B).

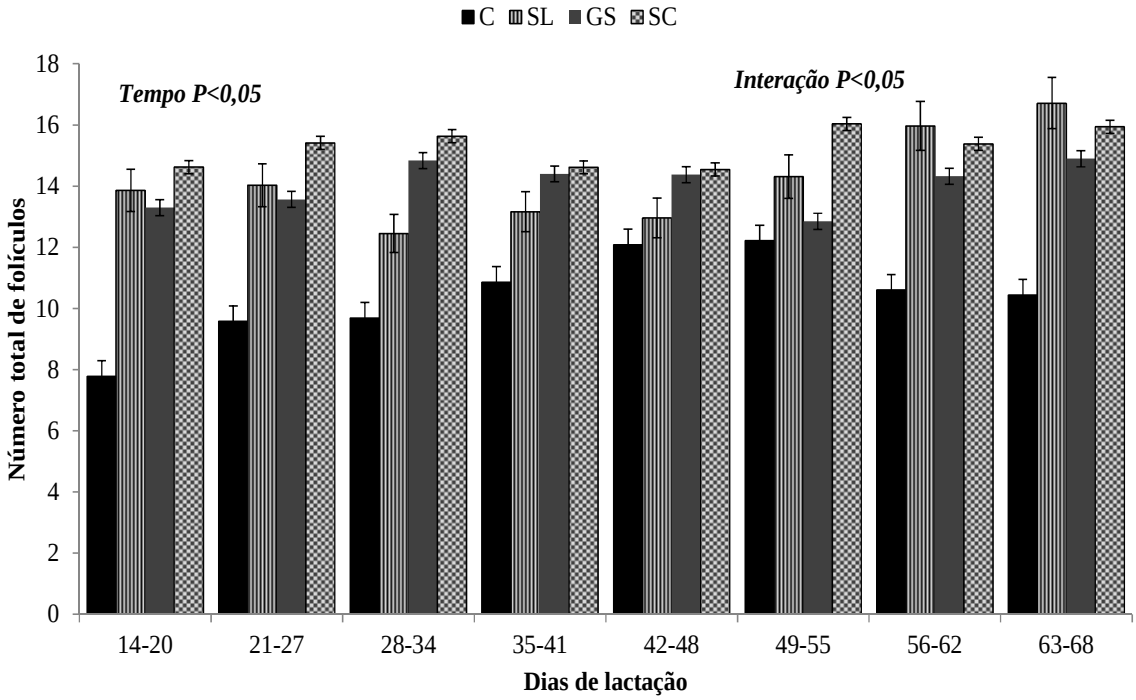
Tabela 14 - Média (±EPM) da dinâmica folicular de acordo com as dietas experimentais

Item	Dietas experimentais[1]				Probabilidades[2]					
	C	SL	GS	SC	Dieta	Tempo	INT	C1	C2	C3
				Folículos						
Total	10,4±0,22	14,1±0,19	14,1±0,24	15,3±0,28	0,021	0,002	0,050	0,036	0,494	0,432
Classe1	1,3±0,18	4,7±0,16	4,5±0,12	3,4±0,19	0,039	0,708	0,274	0,033	0,404	0,194
Classe2	5,0±0,16	4,5±0,16	5,5±0,18	4,9±0,15	0,670	0,110	0,050	0,914	0,326	0,457
Classe3	3,4±0,05	3,8±0,02	3,7±0,07	4,0±0,01	0,784	0,009	0,015	0,412	0,917	0,544
Classe4	0,9±0,04	1,2±0,06	1,2±0,07	2,0±0,05	0,204	0,760	0,740	0,966	0,079	0,228
Classe5	0,4±0,02	0,9±0,06	1,0±0,04	1,0±0,03	0,492	0,027	0,424	0,175	0,984	0,464
				Corpo lúteo						
CL (n)	0,6±0,04	0,9±0,02	1,0±0,04	1,5±0,04	0,062	0,588	0,594	0,261	0,671	0,419
CL(mm^2)	2,0±0,08	3,7±0,03	4,3±0,07	4,3±0,08	0,380	0,103	0,088	0,399	0,504	0,151

[1]Controle; [2]Semente de linhaça; [3] Grão de soja cru e integral; [4]Sais de cálcio de ácidos graxos insaturados, [2] Efeito de ; interação (INT), Contrastes ortogonais: Controle vs fontes lipídicas (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio de ácidos graxos insaturados (C2); grão de soja vs sais de cálcio (C3).

Os efeitos (P<0,05) de tempo e interação observados para NTF está relacionado diretamente com o BE apresentado pelas dietas experimentais ao longo do período de lactação. As dietas suplementadas com fontes de ácidos graxos ω6 e ω3 apresentaram maior NTF (P<0,05) em relação a dieta controle em todos os períodos avaliados (Figura 19). Entre as dietas suplementadas com fontes de ácidos graxos, a dieta SC apresentou maior NTF (P<0,05) até o período de 39-55 dias. Nos períodos de 56-62 e 63-68 dias foi observado maior NTF (P<0,05) para dieta SL (ω3). Estes resultados podem ser explicado pelo numero variável de ondas de crescimento folicular em vacas leiteiras no inicio de lactação, decorrente de fatores relacionados ao controle do crescimento folicular, do controle endócrino, metabólico e nutricional dos mecanismos relacionados à seleção do folículo dominante, que pode ter influenciado o numero de ondas de crescimento folicular, além disso, pode haver uma associação destes fatores aos efeitos do balanço energético negativo na pulsatilidade LH (WILTBANK et al., 2006).

Figura 19 - Número total de folículos scaneados por ultrassonografia agrupados por período ao longo da lactação. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3).



FONTE: (GANDRA, 2012)

Crescimento do folículo ovariano pode ser influenciado pelo estado nutricional metabólico (Gutiérrez et al., 1997; Diskin et al., 2003). Este efeito é mediado por alterações nos metabólitos plasmáticos (Tabela 12) e hormônios metabólicos, tais como a insulina e fator de crescimento semelhante a insulina-1 (IGF-1) (Armstrong et al. (2001) e Ferguson et al. (2006) e / ou fatores de hormônios de crescimento presentes no fluido folicular (Landau et al., 2000). A suplementação com ácidos graxos ω3 e ω6 influencia positivamente o crescimento e a população folicular por estes nutraceuticos constituirem a maior parte do conteúdo ácidos graxos do fluido folicular de folículos grandes e pequenos (Homa e Brown, 1992). Alterando o teor de ácidos graxos total da dieta há uma importante redistribuição de ácidos graxos nos tecidos reprodutivos (Bilby et al., 2006b e ZACHUT et al., 2010b), que podem auxiliar a explica restes resultados.

6.10 QUALIDADE OOCITÁRIA E EMBRIONÁRIA

Foi observado efeito de dieta para o número (n) e de embriões viáveis (EV). Foi observado efeito de aspiração para oócitos viáveis (OV) e degenerados (OD). Houve interação apenas para EV(n). As dietas experimentais não influenciaram (P<0,05) o número total de oócitos aspirados e também qualidade oocitária. Não foi observado diferença no número de oócitos, de grau I, II e III, além do total de viáveis e oócitos degenerados (Tabela 15).

Fouladi-Nashta et al. (2007), avaliaram a qualidade oocitária e embrinária com rações alto e baixo teor de lipídios em vacas leiteiras de alta produção no início de lactação e não observaram diferenças para o número de oócitos de grau I, II, III e na taxa de clivagem dos embriões, resultados semelhantes ao deste estudo. Em outro estudo Fouladi-Nashta et al. (2009), utilizaram 3 fontes de ácidos graxos, sendo: sais de cálcio (39% de C16:0), grão de soja (48% de C18:2c9,c12 ω6), semente de linhaça (48% de C18:3c9,c12,c15 ω3), para 12 vacas leiteiras com média de 45 pós parto, sendo suplementadas 25 dias com cada fonte de gordura em quadrado latino 3x3. Os autores não observaram não encontrando efeitos satisfatórios das diversas fontes de ácidos graxos sobre o número e qualidade de oócitos aspirados, bem como nos embriões.

Na avaliação dos contrastes ortogonais, foi observado efeito de C2, com maior EV(n) para a dieta suplementada com ácidos graxos ω3 (SL) em relação às dietas suplementadas com ω6 (GS e SC), sendo (1,27 vs 0,73), respectivamente para as dietas SL e GS+SC. Estes resultados podem estar relacionados com o metabolismo do ácido linolênico, presente em abundância na dieta SL, que parece inibir a síntese de prostaglandinas pelo útero e diminuir a sensibilidade do corpo lúteo a PGF2.

Zachut et al. (2010b) trabalharam com vacas leiteiras com média de 114 dias de lactação, onde compararam a influencia de dois produtos comerciais um rico em ácido graxo ω3 (E-FLAX 31,06% de C18:3); outro rico em ácido graxo ω6 (E- SUN 33,38% de C18:2), com uma dieta sem adição de ácidos graxos, e avaliaram a quantidade e qualidade oócitária e embrionária. Os autores supracitados observaram um maior número de oócitos aspirados e uma maior taxa de clivagem dos embriões para a dieta contendo ácido ω3 em relação a controle, todavia observaram um menor número de oócitos de grau I para a dieta contendo ω6 em relação ao controle. Outros estudos também retratam a influencia positiva dos ácidos

graxos ω3 na qualidade embrionária (ZERON et al., 2002; BILBY et al., 2006b; MAREI et al., 2009).

Trabalhando com um período maior (-25 a 80 dias pós-parto) de suplementação de fontes de ácidos graxos ω3 e ω6, com vacas de alta produção (38,45 kg/dia) Cerri et al. (2009b), observaram melhor qualidade oócitaria e embrionária para as vacas que receberam fonte de ácido graxo ω3 em relação a ω6, sendo os índices obtidos sobre a qualidade embrionária satisfatórios para vacas leiteiras de alta produção.

Alguns estudos têm examinado os possíveis efeitos do BE negativo sobre baixa concentração de glicose associado à elevadas concentrações de BHBA e AGNE sobre a qualidade do oócito. Porque além dos efeitos indiretos da hipoglicemia em vacas leiteiras no período de transição (através de efeito sobre a secreção de LH ou de resposta ovariana às gonadotrofinas), as condições de hipoglicemia (cetose clínica) são refletidas no microambiente do ovócito pré-ovulatório e pode comprometer a capacidade de desenvolvimento oocitário, pois a glicose é uma molécula indispensável para a maturação de adequada oócitos (LEROY et al., 2010). No presente estudo foram observados maiores concentrações de GLI (Tabela 12 e Figura 17A) para a dieta suplementada com ácido graxos ω3 (SL) em relação as suplementadas com ω6, tanto no pré como no pós-parto, fato este que pode ter sido primordial para a maioria do número de embriões viáveis pela dieta SL em relação a GS+SC.

Estudo realizado por Hochi et al. (1999ab), embriões cultivados em 0,3% de BSA+C18:2 tiveram um desenvolvimento reduzido para o estádio de mórula e desenvolvimento reduzido na sequência da fase de blastocisto comparado com embriões cultivados em BSA 0,3%. Possivelmente aumentando C18:2 na dieta teriam aumentado a quantidade de C18:2 no oócito, subsequentemente, reduzindo o desenvolvimento embrionário in vitro. Homa e Brown (1992) cultivaram oócitos bovinos provenientes de ovários de matadouro com C18:2 e notou uma redução na quebra da vesícula germinal espontânea comparado com oócitos cultivados sem ácidos graxos. Além disso, o fluido folicular de folículos pequenos versus grandes foram analisados para as concentrações de ácidos graxos, e o C18:2 era o único ácido graxo reduzido em folículos grandes mas não pequenos. Apenas depois que o folículo cresce na fase pré-ovulatória avançada que a influência inibitória sobre a retomada da meiose em oócitos é concluida, sob a influência da LH (BILBY et al., 2006b). No entanto no presente estudo não foram observadas diferenças importantes na qualidade oocitária e embrionária entre as dietas suplementadas com fontes de ácidos graxos ω3 e ω6.

Tabela 15 - Médias (±EPM) da qualidade oocitária e embrionária em função das dietas experimentais

Item	Dietas experimentais[1]				Probabilidades[2]					
	C	SL	GS	SC	Dieta	ASP	INT	C1	C2	C3
				Oocitos aspirados						
Total	9,86±1,47	12,72±1,36	10,62±1,54	13,77±2,03	0,485	0,885	0,515	0,282	0,838	0,277
Grau I	0,43±0,14	0,28± 0,13	0,31± 0,13	0,36±0,12	0,890	0,597	0,544	0,486	0,763	0,807
Grau II	1,04±0,37	1,23± 0,45	0,42± 0,17	1,04±0,25	0,393	0,148	0,563	0,708	0,256	0,197
Grau III	3,78±0,84	4,29±1,05	3,21± 0,48	5,22±0,92	0,553	0,089	0,650	0,697	0,954	0,172
Viáveis	5,29±0,96	5,75±1,23	3,89± 0,53	6,27±1,08	0,551	0,050	0,381	0,990	0,660	0,168
Degenerados	2,33±0,73	2,26±0,56	2,63± 0,42	2,35±0,62	0,971	0,041	0,182	0,909	0,763	0,738
Atrésicos	3,23±0,58	4,55±0,78	4,33± 1,05	4,77± 0,77	0,157	0,776	0,326	0,226	0,999	0,723
				Embriões						
Clivados (n)	3,86±0,92	3,83±0,99	2,72±0,51	5,04±0,89	0,483	0,319	0,566	0,999	0,971	0,122
Clivados (%)	64,4±9,59	66,3±9,04	68,9±9,36	74,0±6,79	0,911	0,173	0,233	0,648	0,689	0,723
Viáveis(n)	1,13±0,40	1,27±0,34	0,52±0,23	0,95±0,24	0,005	0,203	0,045	0,505	0,012	0,367
Viáveis(%)	16,3±5,42	27,9±9,55	13,8±6,40	22,7±6,36	0,532	0,885	0,253	0,529	0,295	0,381

[1]Controle; [2]Semente de linhaça; [3] Grão de soja cru e integral; [4]Sais de cálcio de ácidos graxos insaturados, [2] Efeito de ; interação (INT), Contrastes ortogonais: Controle vs fontes lipídicas (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio de ácidos graxos insaturados (C2); grão de soja vs sais de cálcio (C3).

Quando foram avaliados o número de oócitos viáveis (OV) e degenerados (OD) ao longo das duas aspirações, foi observado maior (n) de OV para a 2ª aspiração (ASP2) (65±7 dias) em relação a 1ª aspiração (ASP1) (35±7 dias), com (4,12 vs 6,45); (4,30 vs 7,20); (3,60 vs 4,20) e (6,18 vs 6,36) de OV, respectivamente, para as dietas C, SL, GS e SC em ASP1 e ASP2 (Figura 20B). Contrariamente, para OD, foi observado maior (n) para ASP1, com (3,49 vs 1,18); (3,50 vs 1,02); (2,80 vs 1,90) e (3,00 vs 2,20) de OD, respectivamente, para as dietas C, SL, GS e SC (Figura 21A). Estes resultados podem ser justificados pelo BE (Figura 6A) apresentado no momento das duas aspirações, visto que o BE médio em ASP1 foi de -2,52 Mcal/dia e, em ASP2, 3,15 Mcal/dia.

As mudanças endócrinas e bioquímicas associadas ao BEN (balanço energético negativo) refletem no microambiente do ovário, em relação ao crescimento e à maturação dos oócitos; efeito este comprovado por modelos in vitro, que mostraram a toxicidade destas alterações ao oócito. Ainda, inadequada função do corpo lúteo, associada à redução de progesterona e, provavelmente, baixo IGF-1, pode acarretar em um microambiente uterino desfavorável que o incapacita de manter a vida embrionária (LEROY et al., 2008).

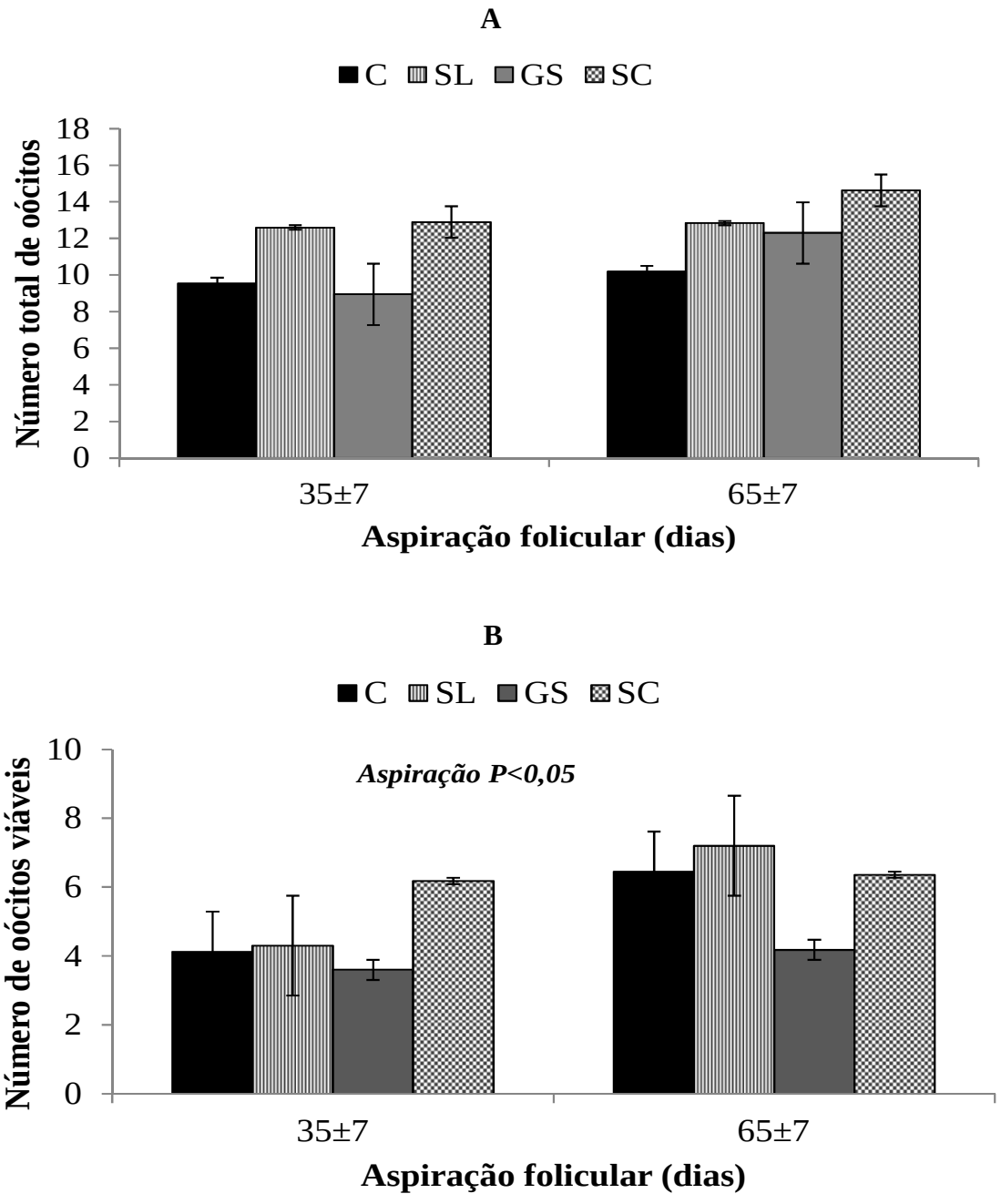
A interação observada entre aspiração e as fontes de ácidos graxos ω3 e ω6 está relacionada com o comportamento da dieta SC em relação às demais, visto que somente esta dieta apresentou menor número de EV na ASP2 (Figura 21B). Este resultado pode estar

relacionado com a influência negativa do ácido linoleico (ω6) na qualidade oocitária retratado por (BILBY et al., 2006b; WONNACOTT et al., 2010). O efeito negativo do ácido linoleico no desenvolvimento embrionário está ligado na fase de blastocisto, porém os mecanismos e rotas metabólicas relacionadas a este acontecimento ainda não está definidos.

Apesar de não ter sido observado efeito para nenhum dos fatores avaliados (dieta, tempo (aspiração), interação e contrastes) é importante ressaltar algumas diferenças numéricas obtidas para o número total de oócitos aspirados (Figura 20A). Foi observado maior número de oócitos para a ASP2 em relação a ASP1 para todas as dietas avaliadas, principalmente para as dietas suplementadas com fontes ω6 (GS e SC), em relação as demais. Ainda é importante ressaltar que esse maior número de oócitos apresentados pelas dietas GS e SC na ASP2 são em sua grande maioria estruturas de menor medida (3 a 6 mm), ou seja de menor capacidade de fertilização e viabilidade, sendo (0,33; 0,44 e 3,46) e (0,18; 1,18 e 5,36) respectivamente número de oócitos de classe 1, 2 e 3 para as dietas GS e SC na ASP2. A incorporação ácido linolênico (ω3) ao meio de maturação de oócitos aumentou a expansão do cumulus e desenvolvimento de células dos oócitos para methafase II (MAREI et al., 2009). Estes efeitos estimulatórios aumentaram as taxas de clivagem subsequentes, melhoraram o desenvolvimento do blastocisto e aumentaram o número de células em ambas as massas, sendo as células do interior do blastocisto.

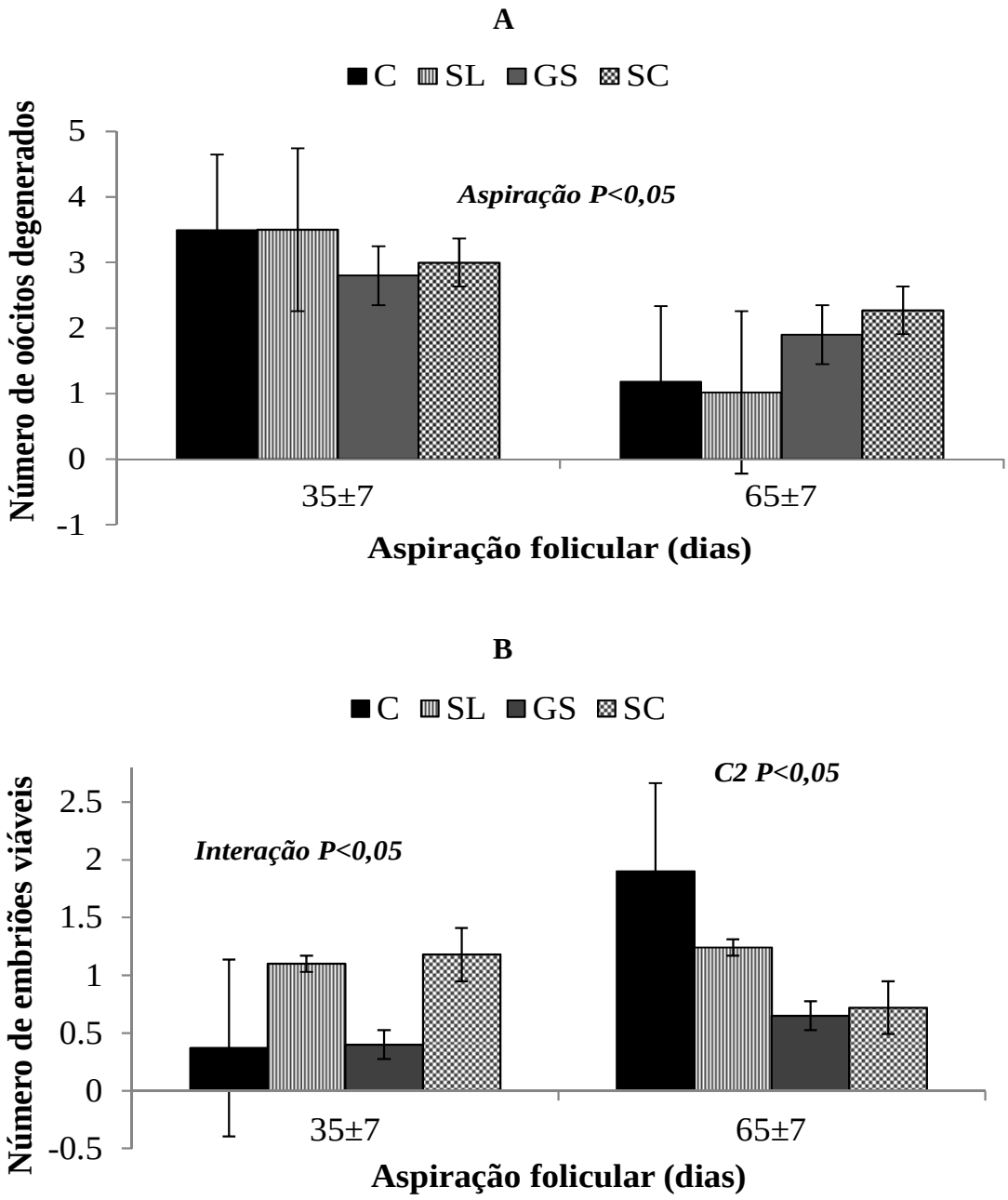
Em relação às células positivas aptas a fagocitose e sua intensidade, foi observado efeito ($P<0,05$) de dieta e tempo para todas as células avaliadas leucócitos, monócitos e neutrófilos, nos períodos pré e pós-parto. Houve interação ($P<0,05$) somente para leucócitos positivos para fagocitose no pós-parto e monócitos positivos no pré e pós-parto.

Figura 20 - Total de oócitos (A) oócitos viáveis (B), no período de lactação de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3).



FONTE: (GANDRA, 2012).

Figura 21 - Oócitos degenerados (A) e embriões viáveis (B) no período de lactação de acordo com as dietas experimentais Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3).



FONTE: (GANDRA, 2012).

6.11 FAGOCITOSE (CÉLULAS POSITIVAS E INTENSIDADE)

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 por células hospedeiras. Destruição intracelular subsequente do patógeno gera peptídeos que podem ser apresentadas em conjunto com MHC (complexo principal de histocompatibilidade) às células T, para iniciar a resposta imune adquirida ao patógeno. A fagocitose envolve a ligação do agente patogênico ou de organismos patogênicos por complemento ou anticorpo revestido a receptores na superfície do fagócito e subseqüente invaginação da membrana celular em torno do patógeno em ultima analise, de modo a formar um vacúolo fagocítico. Este é o local de digestão de patógenos com geração de peptídeos a serem apresentados às células T, para induzir a resposta imune adquirida (Tizard, 2002). A citometria de fluxo tornou possível comparar cuidadosamente a atividade fagocítica ou a capacidade das células, enquanto avaliam a percentagem de células ativas.

Quando foi avaliado o C1 foi observado efeito ($P<0,05$) para leucócitos e monócitos positivos para fagocitose no pré e pós-parto, onde foi obtido maior % de células positivas para as dietas suplementadas com fontes de ácidos graxos ω3 e ω6 em relação a dieta controle. No pré-parto foi obtido 35,58% de leucócitos e 43,70% de monócitos positivos a mais para as dietas SL, GS e SC em relação à dieta C. Já no pós-parto foi obtido a diferença de leucócitos positivos a fagocitose foi menor cerca de 0,38% para as dietas suplementadas em relação a controle e para os monócitos a diferença apresentado ficou em torno de 15,11%. Ainda analisando o C1 foi observada maior intensidade da capacidade de fagocitose ($P<0,05$) mensurada pela luminescência das células (leucócitos, monócitos e neutrófilos) no citômetro de fluxo (*mean fluorescence intensive)* (MFI) para as dietas suplementadas com fontes de ácidos graxos ω3 e ω6 em relação a dieta controle. No pré-parto para os leucócitos foi obtido índice de MFI de (494 *vs* 354) e de (554 *vs* 528) para os monócitos positivos, respectivamente para as dietas (SL, GS e SC) *vs* a dieta C. No pós-parto somente foi observado efeito somente para os monócitos positivos,onde o índice MFI foi de (496 vs 489).

Estudos in vitro tem claramente demonstrado que as alterações na composição dos ácidos graxos da membrana das células fogocíticas estão associados com a capacidade fagocítica aumentada (CALDER , 1998). Isto pode relacionar-se, em parte, a expressão intensificada de receptores envolvidos a fagocitose. Estes achados sugerem que em geral,

ácidos graxos altamente insaturados, em particular, aumentam a absorção do material do alvo pelos fagócitos.

Tabela 16 - Média (±EPM) das células positivas para fagocitose e intensidade da fagocitose de acordo com as dietas experimentais

Item	Dietas experimentais[1]				Probabilidades[2]					
	C	SL	GS	SC	Dieta	Tempo	INT	C1	C2	C3
				% células positivas						
Leucócitos										
PréP	21,3±1,04	36,0±1,06	33,1±1,11	30,2±1,01	0,001	<0,001	0,231	0,006	0,115	0,341
PósP	32,6±1,09	37,2±1,07	31,4±1,05	29,5±1,04	0,001	<0,001	0,001	0,045	0,115	0,459
Monócitos										
PréP	32,7±1,01	64,6±0,90	61,4±1,02	48,2±1,04	0,010	0,001	0,031	0,001	0,004	0,082
PósP	41,2±1,82	51,2±1,77	49,1±1,96	47,6±1,94	0,010	<0,001	0,002	0,013	0,123	0,311
Neutrofilos										
PréP	73,1±1,39	77,7±0,89	70,0±0,85	71,7±0,81	0,050	0,006	0,345	0,347	0,009	0,185
PósP	77,5±1,23	80,1±1,19	78,4±1,10	66,1±1,08	0,046	0,008	0453	0,874	0,006	0,569
				Mean intensive fluorescence						
Leucócitos										
PréP	354±0,07	524±0,04	460±0,02	498±0,07	0,014	0,002	0,959	0,001	0,159	0,185
PósP	502±0,74	525±0,71	493±0,64	477±0,62	0,141	0,008	0,228	0,874	0,116	0,569
Monócitos										
PréP	528±0,03	665±0,02	443±0,05	555±0,05	0,009	0,019	0,202	0,004	0,011	0,525
PósP	489±0,06	573±0,03	487±0,04	427±0,07	0,001	0,001	0,797	0,002	0,033	0,865
Neutrófilos										
PréP	535±0,07	634±0,03	432±0,05	543± 0,04	0,605	0,007	0,991	0,982	0,104	0,363
PósP	474±0,03	599±0,07	477± 0,05	433±0,08	0,009	0,002	0,325	0,149	0,040	0,116

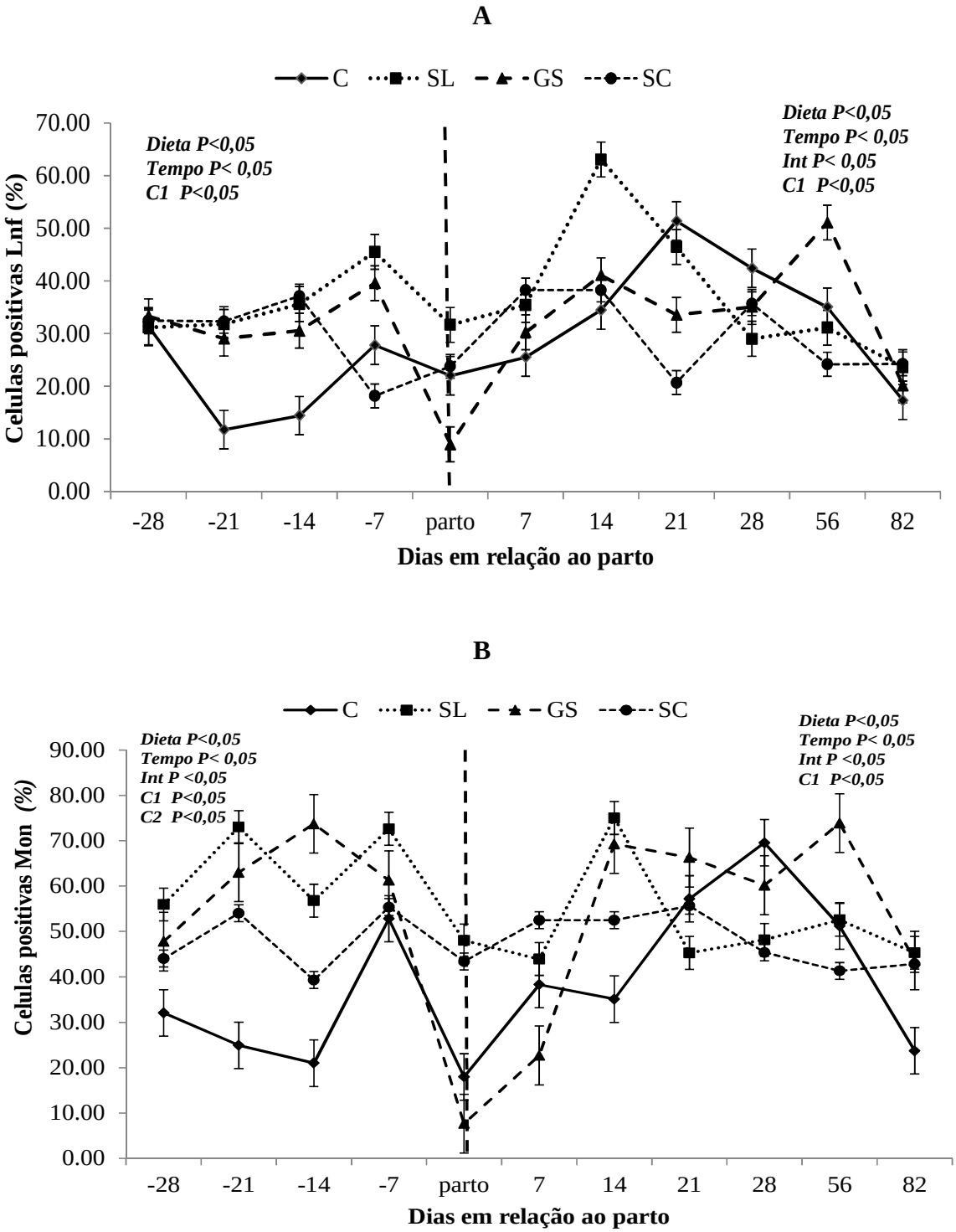
[1]Controle; [2]Semente de linhaça; [3] Grão de soja cru e integral; [4]Sais de cálcio de ácidos graxos insaturados, [2] Efeito de ; interação (INT), Contrastes ortogonais: Controle vs fontes lipídicas (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio de ácidos graxos insaturados (C2); grão de soja vs sais de cálcio (C3).

Analisando o C2 foi observado maior (P<0,05) % de monócitos e neutrófilos positivos para a dieta suplementada com ácido graxos ω3 (SL) em relação a dieta suplementada com ω6 (GS e SL). No pré-parto foi obtido 8,72 % de monócitos e 9,74% de neutrófilos a mais para a dieta SL em relação às dietas (GS+SC). No pós-parto foi observado 15,12% de neutrófilos a mais para a dieta suplementada com ácido graxo ω3. Ainda analisando o C2 foi observado maior índice de MFI para a dieta SL em relação as dietas GS e SC para os monócitos positivos no pré e pós-parto e para os neutrófilos no pós-parto. No pré-parto foi obtido (665 *vs* 499) para monócitos, respectivamente para as dietas SL *vs* (GS+SC). No pós-parto foi observado (573 *vs* 457) para monócitos e (595 *vs* 455) para neutrófilos, respectivamente a dieta suplementadas com ácido graxo ω3 (SL) *vs* dietas suplementadas com ω6 (GS e SC).

Verificou-se 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 ω 6 e ω 3 (KEW et al., 2003a). É interessante notar que a atividade fagocitária foi negativamente correlacionado com a taxa de ω6 em relação a ω3, sugerindo que estas últimas são superiores em termos de aumentar a atividade fagocitária. Neste caso, as membranas das células fagocíticas enriquecidas com ω3, por exemplo, por ingestão oral, deve aumentar a atividade dos fagócitos, sendo que atividade fagocítica aumentou em neutrófilos em cerca de 40 % e em monócitos por cerca de 200% (KEW et al., 2003b).

O efeito de tempo observado para a % de células positivas a fagocitose (leucócitos, monócitos e neutrófilos), está de acordo com a fisiologia dos animais ao longo do pré e pós-parto. De modo geral todas as células positivas avaliadas para fagocitose apresentaram forte declínio de sua expressão na semana anterior ao parto, se intensificando no momento do parto e permanecendo até a semana posterior ao parto, voltando a aumentar sua expressão no dia 14 pós-parto. Para todas as células avaliadas foi obtido menor porcentagem de células positivas para a dieta controle em relação às demais ao longo do pré-parto e principalmente no momento do parto. Entre as dietas suplementadas com fontes de ácidos graxos ω3 e ω6, a dieta suplementadas com sais de cálcio (SC) apresentou menor expressão de células positivas em relação as dietas SL e GS (Figura 22A, 22B e 23A).

Figura 22 - Leucócitos positivos (A) e monócitos positivos (B) no pré e pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3).



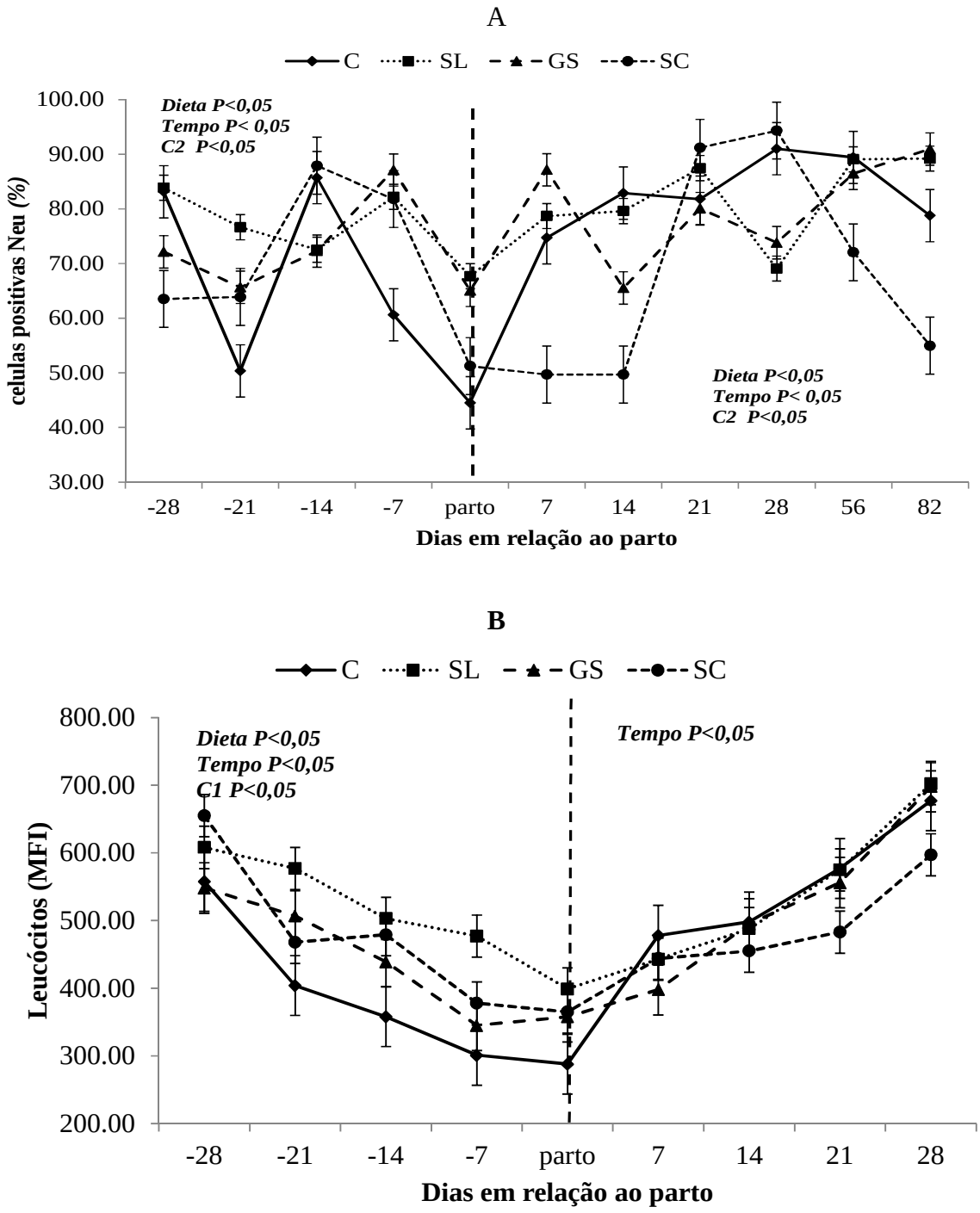
FONTE: (GANDRA, 2012)

Analisando os leucócitos positivos a fagocitose, foi observado forte redução das células positivas para a dieta C no período de -28 a -14 (dias em relação ao parto) e somente voltando a concentrações consideráveis depois do dia 14 pós-parto. Entre as dietas suplementadas como fontes de ácidos graxos ω3 e ω6, foi obtido melhor expressão de células positivas para a dieta SL em relação as dietas GS e SC, no pré parto, no momento do parto e até 21^{o} dia de lactação (Figura 22A).

Para os monócitos positivos foi observado também menor expressão para a dieta controle em relação às demais, principalmente no pré-parto e no momento do parto até o 28^{o} dia de lactação. Foi observada uma menor expressão das células positivas também para a dieta SC em relação às dietas GS e SL em todo o período experimental. As dietas SL e GS apresentaram concentração de células positivas equilibradas entre si, excetuando-se no momento do parto e na semana posterior ao parto onde a dieta GS apresentou forte declínio quando comparado à dieta SL (Figura 22B).

Avaliando a concentração de neutrófilos positivos foi observado ao longo do pré e pós-parto uma maior porcentagem de células positivas em relação a leucócitos e monócitos. Estes resultado estão de acordo com as função imunológica dos neutrófilos, que são parte do sistema imune inato e agem sobre os antígenos de forma não específica, como primeira linha de defesa (SILVESTRE, 2008). Avaliando as células positivas no pré-parto foi observado equilíbrio nas quando se comparou a dieta C em relação às dietas SL, GS e SC, porém foi observado uma sutil superioridade para dieta SL em relação as dietas SC e GS, principalmente entre os dia -28 a -14 (dias em relação ao parto). No pós-parto é importante destacar o forte declínio na concentração das células positivas para a dieta GS do momento do parto ate o 14^{o} dia de lactação. No restante do período de experimental as concentrações de células positivas permaneceram equilibradas entre as dietas experimentais (Figura 23A). Os neutrófilos fagóciticos são capazes de ingerir agentes patogênicos e, dessa forma, são capazes de internalizar e matar os microrganismos patógenos. Cada fagócito é resultado da formação de um fagossoma, com secreção de espécies reativas de oxigênio e enzimas hidrolíticas. A redução da função dos neutrófilos isolados no período pré-parto, pode ser efeito das altas concentrações de AGNE (Figura 18A) e BE negativo (Figura 6A).

Figura 23 - Neutrófilos positivos (A) e leucócitos MFI (B) nos perídos pré e pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3).

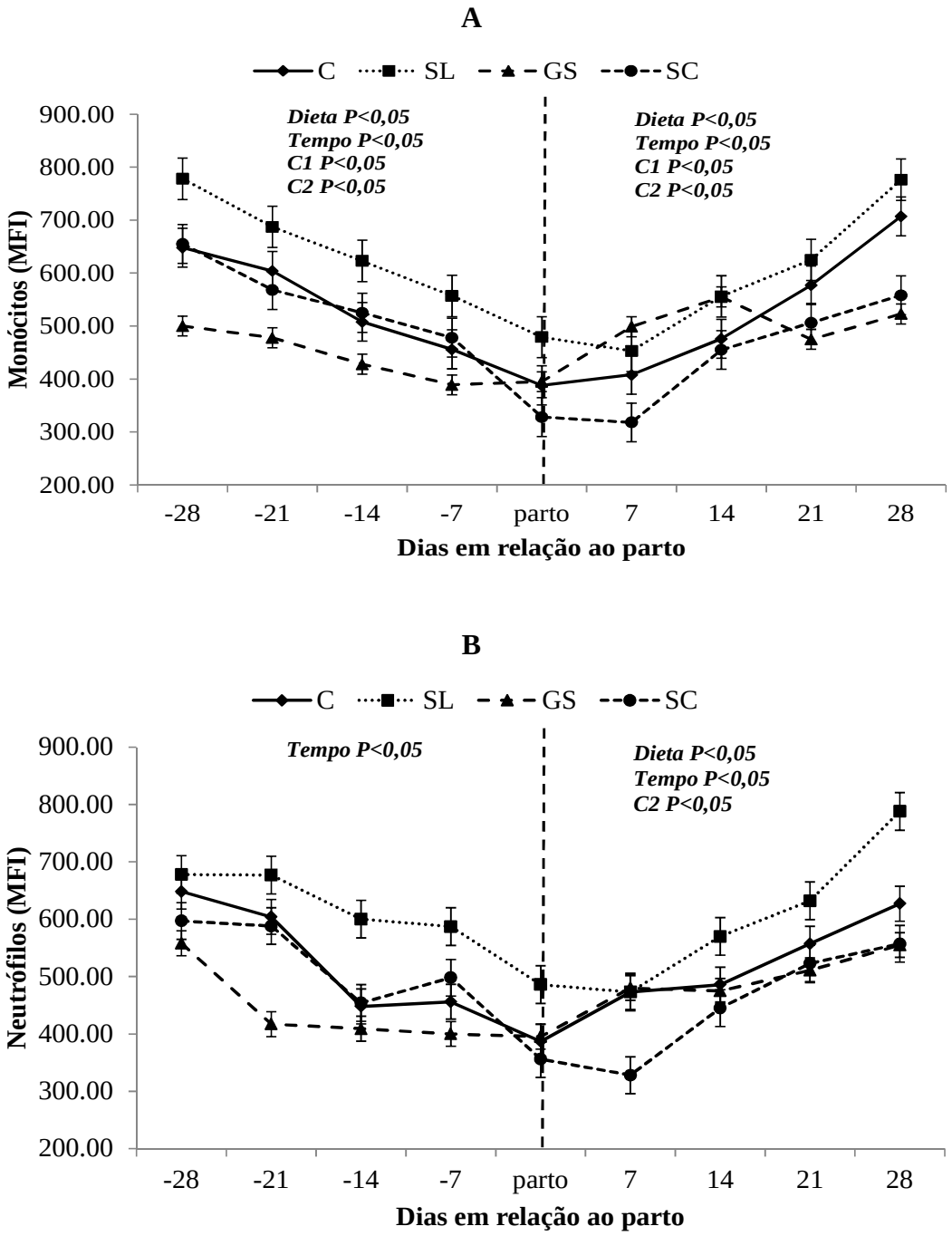


Na literatura recente observa-se a realização de trabalhos visando mensurar a influencia dos ácidos graxos ω3 e ω6 na imunidade de vacas leiteiras no período de transição.

Silvestre et al. (2011) trabalharam com vacas leiteiras no período de transição, no qual os animais foram suplementados de -35 a 30 (dias em relação ao parto) com fontes de ácidos graxos saturados (sal de cálcio de óleo de palma) e fonte de ácidos graxos ricos em ω6 (sal de cálcio de óleo de cártamo), e de 30 a 160 dias pós parto foram suplementadas com fonte de ácidos graxos saturados (sal de cálcio de óleo de palma) e fonte de ácido graxo ω3 (sal de cálcio de 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, resultados semelhantes ao presente estudo.

A mensuração do índice MFI das células positivas a fagocitose (leucócitos, monócitos e neutrófilos), apresentou comportamento semelhante a das células positivas quando se avaliou os períodos pré, parto e pós-parto em conjunto. De modo geral foi observado uma queda constante do índice MFI com a proximidade do parto, sendo o declínio mais intenso no momento do parto e na semana posterior ao parto. Para o índice MFI dos leucócitos foi observado no pré-parto maior índice para a dieta SL em relação as demais e menor índice para a dieta C. No pós-parto foi obtido aumento gradativo no índice independentemente da dieta até o 28^{o} dia de lactação. (Figura 23B). Para o índice MFI dos monócitos (Figura 24A) e neutrófilos (Figura 24B) no pré-parto foi observado comportamento semelhantes ao dos leucócitos, porém a dieta GS apresentou menor índice MFI em relação às demais dietas. No pós-parto foi observado menor índice MFI para a dieta SC em relação às demais, principalmente no momento do parto até o final do período experimental (Figura 24A e 24B). Estudos como os de Llmas Moya et al. (2008); Revelo e Waldron (2010); Silvestre et al. (2011) e Ster et al. (2012) observaram redução da intensidade da fagocitose por leucócitos monócitos e neutrófilos com a proximidade do parte até a semana posterior ao parto, resultados semelhantes ao deste estudo, porém apenas o estudo de Silvestre et al. (2011) suplementou vacas leiteiras com fontes de ácidos graxos e não observou efeitos das fontes de ácidos graxos sobre o índice de MFI, diferentemente dos resultados obtidos por este estudo.

Figura 24 - Monócitos MFI (A) e neutrófilos MFI (B) no pré e pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3)



FONTE: (GANDRA, 2012).

6.12 CÉLULAS DE ADESÃO

No período pré-parto foi observado efeito de dieta apenas para as células de adesão $CD14^+$(monócitos). Foi observado efeito de tempo para $CD4^+$ (linfócitos T helper) e $CD62L^+$ (L-selectinas). Não foi observado efeito de interação no pré-parto entre tempo e dieta (Tabela 17).

Os linfócitos T têm papel fundamental na orquestração da resposta imune adaptativa. Estas células podem ser divididas em distintas subpopulações dependendo da sua função e de marcadores específicos expressos na superfície celular, identificados como CD, do inglês, "cluste rof differentiation". Assim, todas as células T expressam na sua membrana o receptor de antígeno (TCR, do inglês T cell receptor). Existem dois tipos bem definidos de TCR: o heterodimérico com dois peptídeos ligados por pontes dissulfeto (α e β) e o outro, que consiste em polipeptídeos γ e δ. Ambos receptores estão associados a um conjunto de cinco polipeptídeos, o complexo CD3, que, associados, dão origem ao complexo receptor (TCR-CD3) da célula T. O complexo de proteínas CD3 age na transdução de sinais e é encontrado em todos os linfócitos T. Aproximadamente 90 a 95% dos linfócitos T expressam o TCR α e β os restantes 5 a 10% são linfócitos T γ e δ (TIZARD, 2002).

As células T αβ podem, ser subdivididas em duas subpopulações não sobrepostas, uma apresentando o marcador $CD4^+$, possuindo a função de auxiliar ou induzir a resposta imune; e outra apresentando o marcador $CD8^+$, atuando predominantemente de forma citotóxica. O CD4 é uma glicoproteína de cadeia única de 55kDa e o CD8 é um dímero de 68 kDa, sendo ambos da superfamília das imunoglobulinas (TIZARD, 2002). A molécula $CD25^+$ (cadeia alfa do receptor de IL-2) é considerada como um dos principais marcadores de linfócitos T reguladores, quetem a função de regulara a ação dos linfócitos no organismo. A molécula $CD62L^+$ (L-selectinas) é expressa em linfócitos T de memorial central, que são fundamentais para a migração dos neutrófilos e para os locais de infecção.

Na avaliação dos contrastes ortogonais foi observado efeito no pré-parto para o C1, onde foi observado maior expressão de $CD4^+$ para as dietas suplementadas com fontes de ácidos graxos ω3 e ω6 em relação a dieta controle, sendo (10,44 vs 8,97), respectivamente para dietas SL GS e SC vs dieta C. Avaliando-se o C2 no pré-parto foi obtido maior expressão da células de adesão $CD14^+$ para as dietas suplementadas com fontes de ácidos

graxos ω6 em relação a dieta suplementada com ácido graxo ω3, sendo (27,86 vs 18,17) respectivamente para as dietas GS e SC vs dieta SL (Tabela 17).

No pós-parto foi observado efeito (P<0,05) de dieta para as moléculas de adesão $CD4^+$, $CD8^+$, $CD14^+$, $CD25^+$ e $CD62L^+$. Foi observado efeito (P<0,05) de tempo para $CD4^+$, $CD8^+$ e $CD62L^+$. Não houve efeito (P>0,05) de interação para as células de adesão avaliadas. Avaliando o C1 foi constatado efeito para $CD4^+$, $CD8^+$, $CD25^+$ e $CD62L^+$,onde foi obtido maior expressão destas células de adesão para as dietas suplementadas com fontes de ácidos graxos ω3 e ω6 em relação a dieta controle, sendo (12,55 *vs* 11,14); (14,33 *vs* 7,67); (15,18 *vs* 6,16) e (51,12 *vs* 41,35), respectivamente para $CD4^+$, $CD8^+$, $CD25^+$ e $CD62L^+$ e para as dietas SL, GS e SC *vs* dieta C. De acordo com estes resultados podemos inferir que dietas suplementadas com fontes de ácidos graxos ω3 e ω6 apresentam uma maior expressão de linfócitos helper ($CD4^+$) e citotóxicos ($CD8^+$), bem como maior atividade imunológica dos linfócitos ($CD25^+$) e de neutrófilos ($CD62L^+$), em relação a dietas não suplementadas (Tabela 17).

Na avaliação do C2 foi observado efeito (P<0,05) para $CD4^+$ e $CD14^+$, onde foi obtido maior expressão de $CD4^+$ para a dieta suplementada com ácido graxo ω3 em relação as dietas suplementadas com ω6 (16,28 *vs* 10,68), respectivamente para SL *vs* GS e SC. Por outro lado houve maior expressão de $CD14^+$ para as dietas suplementadas com fontes de ácidos graxos ω6 em relação a dieta suplementada com ω3 (23,34 *vs* 11,23), respectivamente para as dietas GS e SC vs SL. Desta forma pode-se inferir que a dieta suplementada com fonte de ácido graxo ω3 apresenta maior atividade de produção de anticorpos ($CD4^+$) em relação as dietas suplementadas com ω6, sendo que a atividade de fagocitose primária (monócito/macrófago) ($CD14^+$) de debris celulares e patógenos é mais intensa nas dietas suplementadas com ácidos graxos ω6 em relação a ω3 (Tabela 17).

Silvestre et al. (2011), somente mensuraram a adesão celular e quantificaram os anticorpos CD62L (L-selectina) e $CD18^+$(β_2-integrina). Os resultados obtidos mostraram maior adesão para a dieta suplementada com sais de cálcio de cartamo (ω6) em relação ao óleo de palma (saturado), e também foi observado efeito de tempo, onde foi observado maior adesão celular entre os dia 4 a 7 pós parto.

Tabela 17 - Média (±EPM) da expressão das células de adesão de acordo com as dietas experimentais

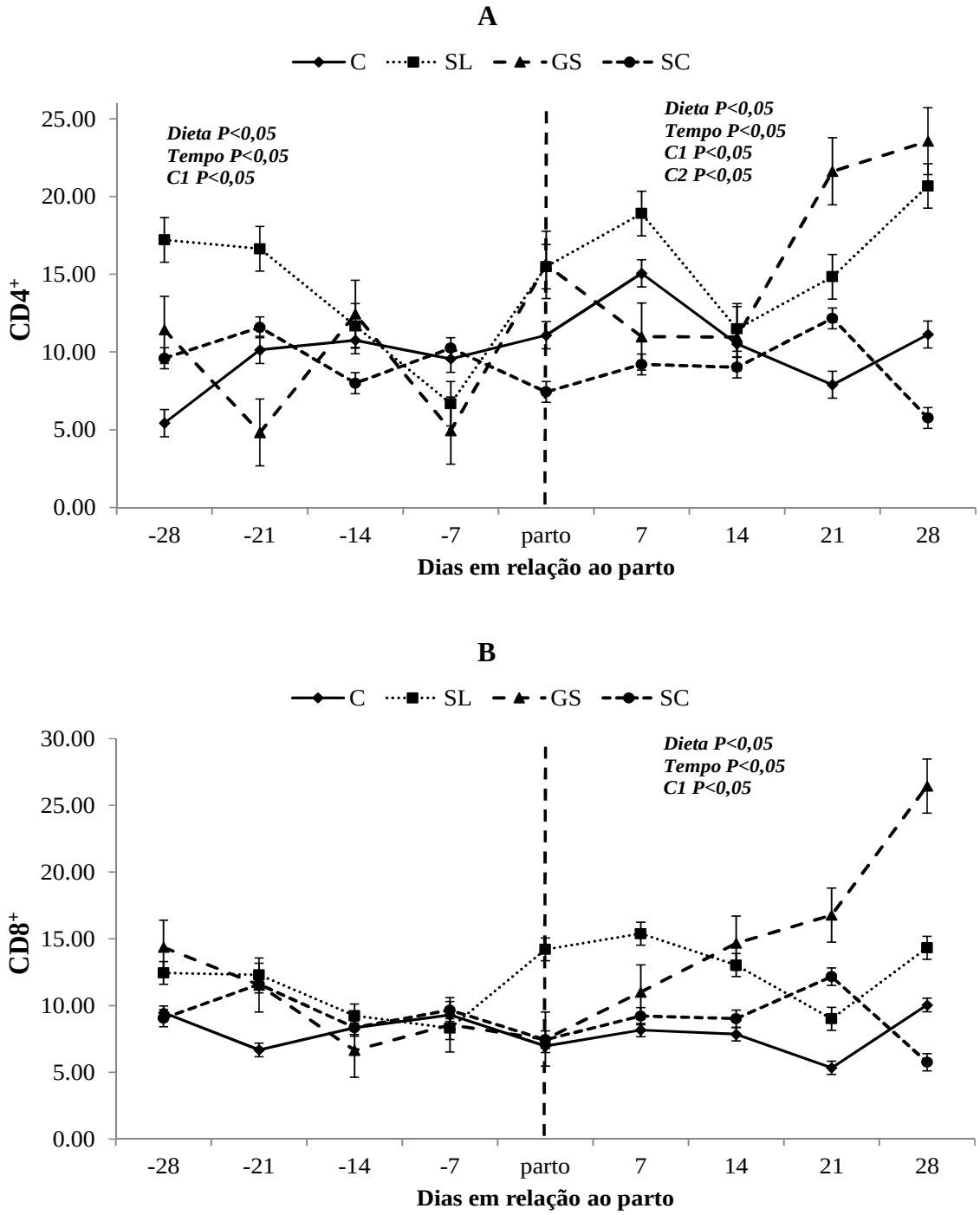
Item	Dietas experimentais[1]				Probabilidades[2]					
	C	SL	GS	SC	Dieta	Tempo	INT	C1	C2	C3
	% células positivas									
$CD4^+$										
PréP	9,0±1,62	13,0±1,74	8,4±1,77	9,9± 1,61	0,566	0,007	0,369	0,013	0,199	0,688
PósP	11,1±1,24	16,3±1,85	12,2±1,60	9,1±1,67	0,043	0,002	0,542	0,009	0,039	0,656
$CD8^+$										
PréP	8,4±1,25	10,6±1,30	10,3±2,52	9,7±1,40	0,938	0,468	0,915	0,567	0,866	0,843
PósP	7,7±1,82	13,2±1,77	15,3±1,96	14,6±1,94	0,021	0,006	0,922	0,018	0,923	0,711
Γδ										
PréP	47,5± 0,07	42,3± 0,03	29,2±0,05	47,0±0,04	0,615	0,201	0,986	0,498	0,233	0,736
PósP	42,2±0,03	40,2±0,07	36,2±0,05	38,0±0,08	0,209	0,162	0,325	0,149	0,740	0,116
$CD14^+$										
PréP	21,6±1,39	18,2±0,89	30,6±0,85	25,1±0,81	0,023	0,758	0,682	0,810	0,035	0,486
PósP	18,9±1,23	11,2±1,19	24,4±1,10	22,3±1,08	0,001	0,508	0,237	0,761	0,008	0,203
$CD25^+$(α-IL-2)										
PréP	6,5±0,97	9,8±0,94	10,0±0,92	8,5±0,77	0,633	0,483	0,361	0,224	0,644	0,823
PósP	6,2±0,74	9,2±0,71	24,1±0,64	12,2±0,62	0,008	0,081	0,887	0,017	0,323	0,239
$CD62L^+$ (L- selectinas)										
PréP	36,5±2,03	38,1±2,02	38,8±2,05	37,0±2,05	0,566	0,009	0,202	0,744	0,271	0,595
PósP	41,3±2,06	51,2±2,03	52,5±2,04	49,7±2,07	0,001	<0,001	0,797	0,002	0,563	0,805

[1]Controle; [2]Semente de linhaça; [3] Grão de soja cru e integral; [4]Sais de cálcio de ácidos graxos insaturados, [2] Efeito de ; interação (INT), Contrastes ortogonais: Controle vs fontes lipídicas (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio de ácidos graxos insaturados (C2); grão de soja vs sais de cálcio (C3).

Silvestre et al. (2011) relataram que o utilização de fontes de ácido graxos ω6 em comparação com fontes de ácidos graxos saturados no período de transição não melhorou o *status* imune dos animais neste período mais crítico do ciclo de produção.

Analisando o comportamento das células de adesão ao longo do pré-parto, parto e pós-parto foi observado para $CD4^+$ menor expressão no pré-parto, pequeno aumento no momento do parto em relação ao pré-parto e aumento da expressão a partir da semana posterior ao parto. (Figura 25A). A dieta SL apresentou maior expressão em relação às demais ao longo do período experimental, principalmente nos períodos -28 a -14 (dias em relação ao parto) e do momento do parto ao 14^o dia de lactação (Figura 25A). Em relação a $CD8^+$ foi observado no pré-parto expressão semelhantes entre as dietas avaliadas, no momento do parto houve um declinio da expressão para todas as dietas, exceto a dieta suplementada com ácido graxo ω3 , porém ao longo do período de lactação foi a dieta GS (ω6) apresentou maior expressão em relação as demais (Figura 25B).

Figura 25 - Adesão celular $CD4^+$ (A) e $CD8^+$ (B) no pré e pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3).



FONTE: (GANDRA, 2012).

Em relação ao $CD25^+$ foi obtida menor expressão para todas as dietas experimentais no pré-parto em relação ao momento do parto e no pós-parto (Figura 26A). A dieta GS apresentou maior expressão desta molécula em relação às demais, principalmente no momento do parto e a partir do 14^o dia de lactação, sendo que a dieta C apresentou menor

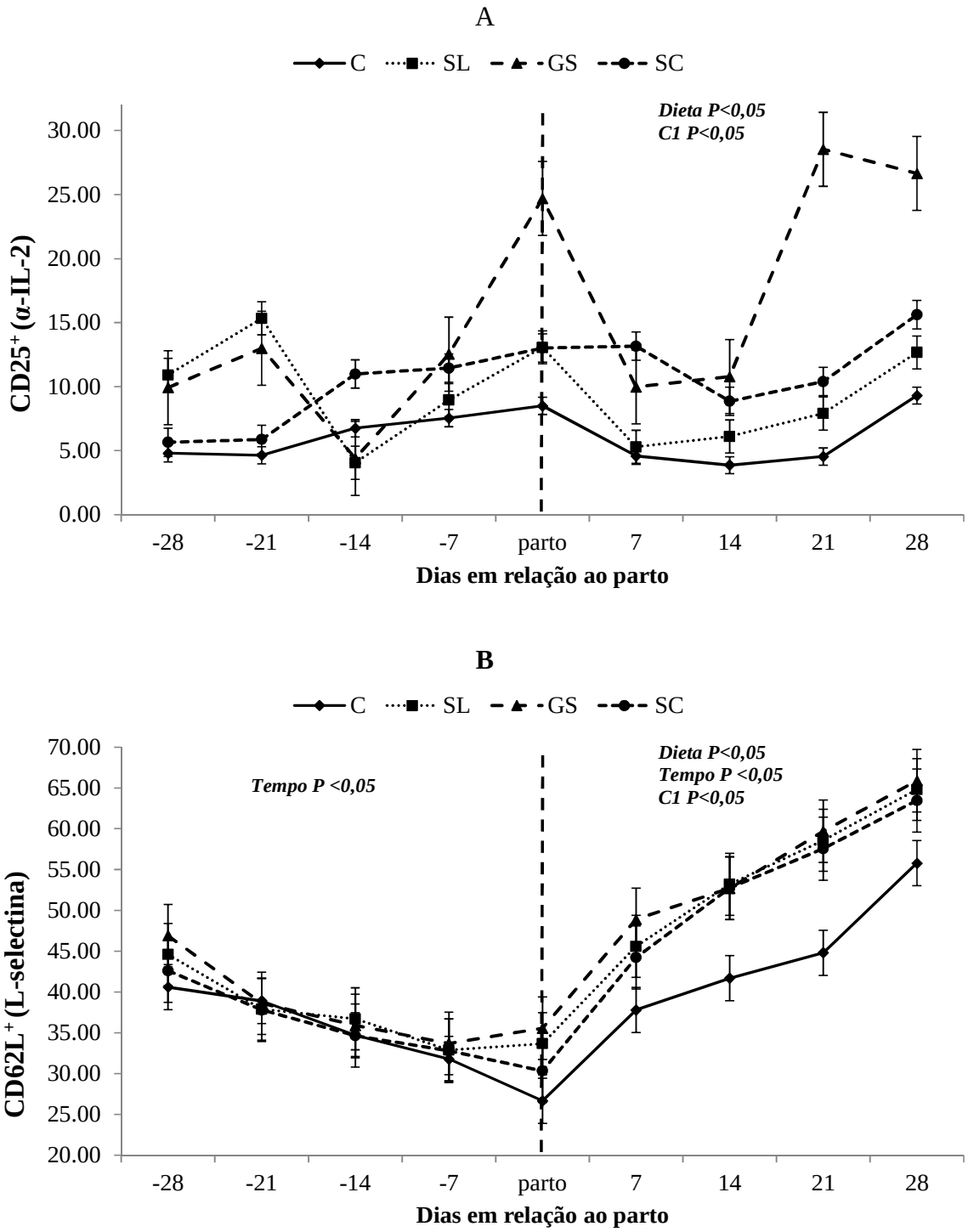
expressão em relação às demais por praticamente todo o período experimental (Figura 26A). Para o $CD62L^+$ foi observado declínio de sua expressão em todas as dietas com a proximidade do parto e no momento do parto, sendo que sua expressão aumento consideravelmente a partir do 7^o dia de lactação. De maneira semelhante ao $CD25^+$ a dieta C apresentou menor expressão em todo o período experimental em relação as dietas suplementadas com fontes de ácidos graxos ω3 e ω6 (Figura 26B). 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 neutrofilia típica. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Silvestre et al. (2011) para a avalição do $CD62L^+$.

Tendo em vista os resultados apresentados pode-se inferir que as fontes de ácidos graxos ω3 e ω6 promovem uma melhora na função imune de vacas no período transição e inicio de lactação, sendo que a fonte de ácido graxo ω3 está diretamente relacionada com imunidade inata dos animais ($CD4^+$) e as fontes de ácidos graxos ω6 está relacionado com a imunidade imediata ($CD8^+$ e $CD14^+$) de vacas leiteiras no período de transição.

Os resultados observados em relação à função imune de vacas suplementadas com fontes de ácidos graxos ω3 e ω6, estão intimamente correlacionados com os resultados obtidos nos parâmetros de nutrição, produção, metabolismo e reprodução. A porcentagem de células positivas a fagocitose e a intensidade da fagocitose (Tabela 16), bem como a expressão das células de adesão (Tabela 17) esta relacionado como o CMS (Figura 1A), BE negativo (Figura 6A), produção de leite (Figura 10A), bem como as concentrações plasmáticas de AGNE (Figura 18A) e BHBA (Figura 18B).

A perfeita integração entre a nutrição, reprodução e imunidade de vacas leiteiras modernas no período de transição e inicio 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. 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.

Figura 26 - Adesão celular $CD25^+$(A) e $CD62L^+$(B), no pré e pós-parto de acordo com as dietas experimentais. Contrastes ortogonais: controle vs fontes lipídicas vs (C1); semente de linhaça vs grão de soja + sais de cálcio insaturado (C2); grão de soja vs sais de cálcio insaturado (C3).



FONTE: (GANDRA, 2012)

7 CONCLUSÕES

A suplementação de ácidos graxos ω3 e ω6 em vacas leiteiras no período de transição e inicio de lactação não influenciou a digestão, o desempenho produtivo e a qualidade oocitária e embrionária, no entanto alterou a porcentagem e produção de gordura no leite, bem como o perfil metabólico, sendo estes fatores dependentes da fonte de ácido graxo suplementada.

As fontes de ácidos graxos ω3 e ω6 influenciaram positivamente de maneira preponderante o sistema imune de vacas leiteiras no período de transição e inicio de lactação.

8 REFERÊNCIAS

ADLER, J. H. Theoretical quantitative approach to the mechanism of hypoglycemic ketosis in ruminants. **Journal of Theoretical Biology**, v. 28, p. 101–109. 1970.

ALBERS, R.; BOL, M.; BLEUMINK, R.; WILLEMS, A.; BLONK, C.; PIETERS, R. Effects of dietary lipids on immune function in a murine sensitization model. **British Journal of Nutrition**, v. 88, p. 291–299. 2002.

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. Physical constraints on voluntary intake of forages by ruminants**. Journal of Animal Science**, v. 74, n. 12, p. 3063-3075, 1996.

AMARAL, B. C. D. **Effect of supplemental fat source on production, immunity, hepatic gene expression, and metabolism of periparturient dairy cows**. PhD Diss. University of Florida, Gainesville. FALTA ANO.

AMBROSE, D. J.; KASTELIC, J.P. Dietary fatty acids and dairy cow fertility. Advanced **Dairy Science and Technology**, v. 15, p. 35-47, 2003.

ANDERSEN, J. B.;RIDDER, C.; LARSEN, T. Priming the cow for mobilization in the periparturient period: effects of supplementing the dry cow with saturated fat or linseed. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 1029–1043, 2008.

ARMSTRONG, D. G.; GONG, J. G.; WEBB, R. Interactions between nutrition and ovarian activity in cattle: physiological, cellular and molecular mechanisms. **Reproduction Supplement**, v. 61, p. 403-414, 2003.

ARMSTRONG, D. G.; McEVOY, T. G.; BAXTER, G.; ROBINSON, J. J.; HOGG, C. O; WOAD, K. J; WEBB, R.; SINCLAIR, K.D. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1624–32, 2001.

BADWAY, J. A.; CRUNUTTER, J. T.; ROBINSON, J. M.; BERD, C. B.; KARNOVSKY, M. J.; KARNOVSKY, M. L. Effects of free FA on release of superoxide and on change of shape by human neutrophils. **Reversibility by Albumin**, v. 259, p. 7870-7877, 1984.

BADWEY, J. A.; CURNUTTE, J. T.; KARNOVSKY, M. L. cis-Polyunsaturated fatty acids induce high levels of superoxide production by human neutrophils. **The journal of Biological Chemistry**, v. 256, n. 24, 12640-12643, 1981.

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

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

BARLETTA, R. V.; RENNÓ, F. P.; GANDRA, J. R.; FREITAS Jr, 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.

BARTELT, S.; TIMM, M. DAMSGAARD, C. T.; HANSEN, E. W.; HANSEN, H. S.; LAURITZEN, L. The effect of dietary fish oil-supplementation to healthy young men on oxidative burst measured by whole blood chemiluminescence. **British Journal of Nutrion**, v. 99, n. 6, p. 1230-8, 2008.

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 endotelial cells. **Arterosclerosis**, 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.

BEAM, S. M.; BUTLER, W. R. Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. **Biology of Reproduction**, v. 56, p.133-142, 1997.

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.

BENCHAAR, 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, 2008. E-Supplement 1.

BENCHAAR, C.; ROMERO-PÉREZ , G.A.; CHOUINARD , P.Y.; HASSANAT, F.; EUGENE , M.; PETIT, H.V.; CÔRTES, C. Supplementation of increasing amounts of linseed oil to dairy cows fed total mixed rations: Effects on digestion, ruminal fermentation characteristics, protozoal populations, and milk fatty acid composition. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 4578–4590, 2012.

BERTICS, S.J.; GRUMMER, R.R.; CADORNIGA-VALINO, C.; STODDARD, E. E. . Effect of prepartum dry matter intake on liver triglyceride concentration in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 1914-1922, 1992.

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.; 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.

BINELLI, M., THATCHER, W.W., MATTOS, R., BARUSELLI., P.S. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, v.56, p.1451-1463, 2001.

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

BORBA, L. R. O.; STUMPF JUNIOR, W.; FISCHER,V.; FERNANDES, A. Níveis crescentes de gordura na dieta de vacas leiteiras de alta produção. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 12, n. 1, p. 87-92, 2006.

BREMMER, D. R.; RUPPERT, L. D.; CLARK, J. H.; DRACKLEY, J. K. Effects of chain length and unsaturation of fatty acid mixtures infused into the abomasum of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 176–188, 1998.

BU, D. P.; WANQ, J. Q.; DHIMAN, T. R.; LIU, S. J.
Effectiveness of oils rich in linoleic and linolenic acids to enhance conjugated linoleic acid in milk from dairy cows. **Journal of Dairy Scienc**e, v. 90, n. 2, p. 998-1007, 2007.

BURR, G. O.; BURR, M. M.. On the nature and role of the fatty acids essential in nutrition. **Journal of Biological Chemistry**, v. 86, p. 587–621, 1930.

BUTLER, W. R. Efeito do balanço energético negativo na fertilidade de vacas leiteiras. In: **NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS**, 7., 2004, Uberlândia. **Anais**... Uberlândia. 2004.

BYERS, F. M.; SCHELLING, G. T. Los lipidos en la nutricion de los ruminantes. In: CHURCH, D. C. **El ruminante: Fisiología digestive y nutricion**. Zaragoza: Acribia, 1993. cap.15.

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.; LOCK, A.L.; STAPLES, C.R.; BADINGA, L. Performance, metabolic, and endocrine responses of periparturient Holstein cows fed 3 sources of fat. **Journal of 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. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. Prostaglandins. **Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 77, p. 327-335, 2007.

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.

CAROPRESE, M.; MARZANO ,M; MARINO,R.; GLIATTA,G.; MUSCIO, A.; SEVI, A. Flaxseed supplementation improves fatty acid profile of cow milk. **Journal of Dairy Science**. v.93, p. 2580–2588. 2010.

CASALI, A.O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C; PEREIRA, J. C.; HENRIQUES, L. T.; FREITAS, S. G. de; 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.

CERRI, R.L.; SANTOS, J.E.; JUCHEM, S.O.; GALVÃO, K.N.; DHEBEL, R.C. Timed artificial insemination with estradiol cypionate or insemination at estrus in high-producing dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v., 87, p. 3704-3715, 2004.

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.

CHILDS, S.; HENNESSY, A. A.; SREENAN, J. M.; WATHES, D. C.; CHENG, Z.; STANTON, C.; DISKIN, M. G.; KENNY, D. A. Effect of level of dietary n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on systemic and tissue fatty acid concentrations and on selected reproductive variables in cattle. **Theriogenology**, v. 70, p. 595– 611, 2008.

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.; 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, n. 10, p. 5199-211, 2010.

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. **Dairy Sciences**, v. 92, p. 5199–5211, 2009.

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. 2913-9, 1996.

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.

COLLARD, B. L.; BOETTCHER, P. J.; DEKKERS, J. C. M.; PETITCLERC; DSCHAEFFER, L. R. Relationships between energy balance and health traits of dairy cattle in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v.83, p. 2683–2690, 2000.

CONTRERAS, 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**. 2007. 128 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal Viçosa, Minas Gerais, Viçosa, 2007.

CÔRTES, C.; DA SILVA-KAZAMA, D.C.; KAZAMA, R.; GAGNON, N.; BENCHAAR , C.; SANTOS, G.T.D.; ZEOULA, L.M.; PETIT, H.V. Milk composition, milk fatty acid profile, digestion, and ruminal fermentation in dairy cows fed whole flaxseed and calcium salts of flaxseed oil. **Journal of Dairy Science**. v. 93, p. 3146–3157, 2010.

CRIBIER, S.; MORROT, G.; ZACHOWSKI, A. Dynamics of the membrane lipid phase. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 48, p. 27–32, 1993.

D'AMBOLA, J. B.; AEBERHARD, E. E.; TRANG, N.; GALFAR, S.; BARRELT, C. T.; SHERMAN, M. P. Effect of dietary (n-3) and (n-6) fatty acids on in vivo pulmonary bacterial clearance by neonatal rabbits. **Journal of Nutrition**, v. 121, n. 8, p. 1262-9, 1991.

D'ANGELO, L.S. **Fontes de gordura na alimentação de vacas leiteiras no período de transição e início de lactação**. Dissertação (mestrado). Departamento de Nutrição e Produção Animal. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo. Pirassununga, SP, 91 f. 2009.

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, n.3-4, p. 251-67.

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.

DISKIN, M. G.; MACKEY, D. R.; ROCHE, J. F.; SREENAN, J. M. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 345–70, 2003.

DOREAU, Biohidrogenação Ruminal de Acidos Graxos, In: S**imposio internacional avancos em tecnicas de pesquisa em nutrição de ruminantes**, p. 46-58, 2011

DOREAU, M.; AUROUSSEAU, E.; MARTIN, C. Effects of linseed lipids fed as rolled seeds, extruded seeds or oil on organic matter and crude protein digestion in cows. **Animal Feed Science and Technology**. v. 150, p. 187–196, 2009.

DRACKELY, 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.

DRACKLEY, J.K. **Physiological adaptations in transition dairy cows.** Papers. Department of Animal Sciences. University of Illinois, Urbana, 1992.

DUSKE, K.; HAMMON, H. M.; LANGHOF, A.-K.; BELLMANN, O.; LOSAND, B.; NÜRNBERG, K. NÜRNBERG, G.; SAUERWEIN, H.; SEYFERT, H. M.; METGES, C. C. Metabolism and lactation performance in dairy cows fed a diet containing rumen-protected fat during the last twelve weeks of gestation. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p.1670-1684, 2009.

EARLEYWIN, T. J. Raw soybeans in dairy rations. In: **Proc. Annual and Semiannual meetings of the American Feed Industry Council**. p 41. Kansas City, MO and San Antonio,1989.

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.

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, 1992. Supplement 3.

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.

FERGUSON, E. M.; SLEVIN, J.; EDAWRDS, S. A.; HUNTER, M. G.; ASHWORTH, C .J. Effect of alterations in the quantity and composition of the pre-mating diet on embryo survival and foetal growth in the pig. **Animal Reproduction Science**, v. 96, p. 89–103, 2006.

FLETCHER, M.P; ZIBOH, V. A. Effects of dietary supplementation with eicosapentaenoic acid or gammalinoleic acid on neutrophil phospholipid fatty acid composition and activation responses, **Inflammation**, v. 14, n. 5, p. 98-103, 1991.

FLINT, A. P. Interferon, the oxytocin receptor and the maternal recognition of pregnancy in ruminants and non-ruminants: a comparative approach. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 313–318, 1995.

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.; GUTIERREZ, C. G.; RUSSELL, H. F.; GARNSWORTHY, P. C.; WEBB, R. Effects of dietary fatty acids on oocyte quality and development in lactating dairy cows. **Biology of Reproduction**. Special Issue: 107. (Abstr.) 2004.

FOULADI-NASHTA,A.A.,WONNACOT.,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.

FRANKLIN, S. T.; YOUNG, J. W.; NONNECKE, B. J. Effects of ketones, acetate, butyrate, and glucose on bovine lymphocyte proliferation. **Journal of Dairy Science**, v.74, p. 2507–2514. 1991.

FREITAS JÚNIOR, J. E.; RENNÓ, F. P.; SILVA, L. F. P.; GANDRA, J. R.; MATURANA FILHO, M.; FODITSCH, C.; VENTURLLI, B. C. Parâmetros sanguíneos de vacas leiteiras suplementadas com diferentes fontes de gordura. Ciência Rural, v. 40, n. 4, p. 950-956, **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 4, p. 1376-1380, 2010.

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, 119 f, 2012.

FRERET, S.; GRIMARD, B.; PONTER, A. A.; JOLY, C.; PONSART, C.; HUMBLOT, P. Reduction of body-weight gain enhances in vitro embryo production in overfed superovulated dairy heifers. **Reproduction**, v. 131, p. 783–94, 2006.

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.

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, n. 5, p. 1385-95, 1998.

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.; LOCK, A.; MANN, G.E.; SINCLAIR, K.D.; WEBB, R. Nutrition, metabolism, and fertility in dairy cows: 2. dietary fatty acids and ovarian function. **Journal of Dairy Science**. v. 91, p. 3824–3833, 2008.

GIBNEY, M. J.; HUNTER, B. B. The effects of short- and long-term supplementation with fish oil on the incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids into cells of the immune system in healthy volunteers, **European Journal Clinical Nutrition**. v. 47, p. 255–259, 1993.

GLASSER, F.; FERLAY, A.; CHILLIARD, Y. Oilseed lipid supplements and fatty acid composition of cow milk: a meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 4687–4703, 2008.

GONTHIER, C.; MUSTAFA, F. A.; QUELLET, D. R.; CHOULNARD, P. Y; BERTHLAUME, PETIT, H. V. Feeding micronized and extrused flaxseed to dairy cow on blood parameters and milk fatty adic compostition. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 748-756, 2005.

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.; 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.

GUTIÉRREZ, C. G.; OLDHAM, J.; BRAMLEY, T. A.; GONG, J. G.; CAMPBELL, B. K.; WEBB, R. The recruitment of ovarian follicles is enhanced by increased dietary intake in heifers. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 1876– 1884, 1997.

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.

HALL, M.B. **Calculation of non-estructural carbohydrate content of feeds that contain non-protein nitrogen**. University of Florida, 2000. P. A-25 (Bulletin 339, April-2000).

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

HARDY, S. J.; ROBINSON, B. S.; POULOS, A.; HARVEY, D. P.; FERRANTE, A.; MURRAY, A. W. The neutrophil respiratory burst. Responses to FA, N-formylmethionylleucylphenylalanine and phorbol ester suggest divergent signalling mechanisms. **European Journal of Biochemistry**, v. 198, p. 801-806, 1991.

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.

HAVARTINE, K. J.; ALLEN, M. S.; Effects of atty acid supplements on ruminal and total tract nutrient digestion in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 1092-1103, 2006b.

HAYIRLI, A.; BERTICS, S. J.; GRUMMER, R. R. Effects of slow-release insulin on production, liver triglyceride, and metabolic profiles of Holsteins in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 2180-2191, 2002.

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.

HERAVI MOUSSAVI, A. R.; GILBERT, R. O.; OVERTON, T. R.; BAUMAN, D. E.; BUTLER, W. R. Effects of feeding fish meal and n-3 fatty acids on ovarian and uterine responses in early lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 145–154, 2007.

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.

HEUER, C.; SCHUKKEN, Y.; DOBBELAAR, P. Postpartum body condition score and results from the first test day milk as predictors of disease, fertility, yield, and culling in commercial dairy herds. **Journal of Dairy Science**. v.82,p. 295–304, 1999.

HIZZOTTI, 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**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2004. 132p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2004.

HOCHI, S.; KANAMORI, A.; SUG'WA, K.; KIMURA, K.; HANADA, A. Effect of linoleic acid-albumin in the IVM and IVF media on survival of frozen–thawed pronuclear bovine zygotes. **Journal of Mammalian Ova Research**, v.16, p. 19–22, 1999a

HOCHI, S.; KIMURA, K.; HANADA, A. Effect of linoleic acid-albumin in the culture medium on freezing sensitivity of in vitro produced bovine morulaem. **Theriogenology**, v. 52, p.497–504, 1999b

HOEDEMAKER, 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 folicular 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.

HUHTANEN, P.; RINNE, M.; NOUSIAINEN, J. A meta-analysis of feed digestion in dairy cows. 2. The effects of feeding level and diet composition on digestibility. **Journal of Dairy Science**. v. 92, p. 5031–5042, 2009.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION - IDF. **Whole milk. Determination of milk fat, protein and lactose content Guide for the operation of mid-infra-red instruments**. Bruxelas: 1996. 12p. (IDF Standard 141 B).

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. 43s–348s, 2000.

JANNACE, P. W.; LERMAN, R. H.; SANTOS, J. I.; VITALE, J. J. Effects of oral soy phosphatidylcholine on phagocytosis, arachidonate concentrations, and killing by human polymorphonuclear leukocytes. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, n. 3, p. 599-603, 1992.

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

JOE, B.; LOKESH, B. R. Role of capsaicin, curcumin and dietary n-3 fatty acids in lowering the generation of reactive oxygen species in rat peritoneal macrophages. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1224, n. 2, p. 255-63, 1994.

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 Domestics Animals**, doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01237.x, 2010.

KAZAMA , R.,; CÔRTES, C.; DA SILVA-KAZAMA, D.; GAGNON, N.,;BENCHAAR , C. L. M.; SANTOS , G. T. D.; ZEOULA , L. M.; PETIT, H. V. Abomasal or ruminal administration of flax oil and hulls on milk production, digestibility, and milk fatty acid profile of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 4781–4790, 2010.

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.

KENDRICK, K. W.; BAILEY, T. L.; GARST, A. S.; PRYOR, A. W.; AHMADZADEH, A.; AKERS, R. M.; EYESTONE, W. E.; PERASON, R. E.; GWAZDAUSKAS, F. C. Effects of

energy balance on hormones, ovarian activity, and recovered oocytes in lactating holstein cows using transvaginal follicular aspiration. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 1731–1740, 1999.

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.

KHAIR-EL-DIN, T.; ASICHER, S. C.; VAZQUEZ, M. A.; LU, C. Y. Inhibition of macrophage nitric-oxide production and ia-expression by docosahexaenoic acid, a constituent of fetal and neonatal serum. **American Journal Reproduction Immunology**, v.36, p.1–10. 1996.

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 JR., 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.

KINDAHL, H.; ODENSVIK, K.; AIUMLAMAI, S.; FREDRIKSSON, G. Utero-ovarian relationship during the bovine post-partum period. **Animal Reproduction Science**, v. 28, p. 363–369, 1992

LACETERA, N.; SCALIA, D.; BERNABUCCI, U.; RONCHI, B.; PIRAZZI, D.; NARDONE, A. Lymphocyte functions in overconditioned cows around parturition. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 2010–2016, 2005.

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.

LANDAU, S.; BRAW-TAL, R.; BOR, A.; BRUCKENTAL, I. Preovulatory follicular status and diet affect the insulin and glucose content of follicles in high-yielding dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v.64, p. 181–97, 2000.

LEE, T. T.; HOOVER, R.L.; WILLIAMS, J. D.; SPERLING, R. I.; RAVALESE, J.; SPUR, B.W.; ROBINSON, D. R.; COREY, E. J.; LEWIS, R. A.; AUSTEN, K. F.Effects of dietary enrichment with eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on in vitro neutrophil and monocyte leukotriene generation and neutrophil function, **The New England Journal of Medicine**, v. 312, p. 1217–1224, 1985.

LERO, J. L. M. R.; PSOMER, G.; VAN SOOM, A.; GOOVAERTS, I. G. F.; BOLS, P. E. J. Reduced fertility in high yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part I: The importance of negative energy balance and altered corpus luteum function to the reduction of oocyte and embryo quality in high yielding dairy cows. Review. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 43, p. 612-622, 2008.

LEROY, J.; VANHOLDER, T.; MATEUSEN, B.; CHRISTOPHE, A.; OPSOMER, G.; de KRUIF, A.; GENICOT, G.; VAN SOOM, A. Nonesterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. **Reproduction**. v. 130, p. 485–495, 2005.

LEROY, J.L.M.R.; LANGBEEN, A.; VAN HOECK, V.; BOLS, P.E.J. Effect of energy balance on oocyte and embryo quality in modern dairy cows. **WCDS Advances in Dairy Technology**. v. 22, p. 71-79, 2010.

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.

LLAMAS MOYA, S.; ALONSO GÓMEZ, M.; BOYLE, L. A. MEE, J. F.; O'BRIEN, B. AND ARKINS, S. Effects of milking frequency on phagocytosis and oxidative burst activity of phagocytes from primiparous and multiparous dairy cows during early lactation. **Journal of Dairy Science**. v.91, p. 587–595, 2008.

LOCK, A. L.; GARNSWORTHY, P. C. Independent effects of dietary linoleic and linolenic fatty acids on the conjugated linoleic acid content of cows' milk. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 163–176, 2002.

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.

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. 1219-27, 1993.

LUCY, M. C.; STAPLES, C. R.; MICHEL, F. M.; THATCHER, W. W. Energy balance and size and number of ovarian follicles detected by ultrasonography in early postpartum dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 2, p. 472-82, 1991.

LUOSTARINE, R.; SLADEEN, T. Dietary fish oil decreases superoxide generation by human neutrophils: relation to cyclooxygenase pathway and lysosomal enzyme release. **Prostaglandins Leukotreines and Essential Fatty Acids**, v. 55, n.3, p. 167-72, 1996.

MADEBVOU, P.; BALLARD, C. S.; SNIFFEN, C. J.; CARTER, M. P.; WOLFORD, H. M.; SATO, T.; YABUUCHI, Y.; BLOCK, E.; PALMQUIST. Effect of feeding calcium salts of long-chain fatty acids, from palm fatty acid distillate or soybean oil, to high producing dairy cows on milk yield and composition, and on selected blood and reproductive parameters. **Animal Feed Science and Technology**, v.108, p. 25-41, 2003.

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.; ROBINSON, R. S.; WATHES, D.C.; LAMMING, G.E. The regulation of interferon-τ production and uterine hormone receptors during early pregnancy. **Journal of reproduction and fertility**, n.54, p. 317-328, 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.

MARQUES, C. C.; BAPTISTA, M. C.; VASQUES, M. I.; HORTA, A. E .M.; PEREIRA, R. M. Effect of polyunsaturated fatty acids (PUFA) on bovine oocyte in vitro maturation and subsequent embryo development and freezability. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 109, p. 116, 2007.

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.

MATOVANI, R.; ENRIGHT, W. J.; KEANE, M. G.; ROCHE, J. F.; BOLAN, M. P.Effect of nutrition and dose of follicle stimulating hormone (FSH) on superovulatory response in beef heifers. **Proceedings of the 9th AETE Meeting: Lyon**, France, p. 234, 1993.

MATTOS, R.; STAPLES C.R.; WILLIAMS, J.; AMOROCHO, A.; MCGUIRE M.A.; THATCHER, W.W. Uterine, ovarian, and production responses of lactating dairy cows to increasing dietary concentrations of menhaden fish meal. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.755-764, 2002.

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.

MATURANA FILHO, M. **Desempenho produtivo e reprodutivo e parâmetros sanguíneos de vacas leiteiras alimentadas com diferentes fontes de gordura no período de transição e inicio de lactação**. Dissertação (mestrado). Departamento de Nutrição e Produção Animal. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo. Pirassununga, SP, 102 f. 2009.

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, 2001.

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.

MOALLEM, U.; FOLMAN, Y.; BOR, A.; ARAV, A.; SKLAN, D. Effect of calcium soaps of fatty acids and administration of somatotropin on milk production, preovulatory follicular development, and plasma and follicular fluid lipid composition in high yielding dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 82, p. 2358–2368, 1999.

MOALLEM, U.; KATZ, M.; LEHRER, H.; LIVSHITZ, L.; YAKOBY, S. Role of peripartum dietary propylene glycol or protected fats on metabolism and early postpartum ovarian follicles. **Journal of Dairy Science**. v. 90, p. 1243–1254, 2007.

MUSTAFA, A. F.; CHOUINAR, P. Y.; CHRISTENSEN, D. A. Effects of feeding micronised flaxseed on yield and composition of milk from Holstein cows. **Journal of the Science and of Food and Agricultur**e, v. 83, p. 920–926, 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**. 6.rev.ed. National Academy Press Washinton, D.C.

NATIONAL RSEARCH 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.

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.

O'CALLAGHAN, D.; YAAKUB, H.; HYTTEL, P.; SPICER, L. J.; BOLAND, M. P. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.118, p. 303–13, 2000.

OBA; M.; ALLEN, M. Evaluation of the importance of the digestibility of neutral detergent fiber from forage: effects on dry matter intake and milk yield of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.82, p.589-596, 1999.

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

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.

ONETTI, S. G.; SHAVER, R. D.; MCGUIRE, M. A.; GRUMMER, R. R. Effect of type and level of dietary fat on rumen fermentation and performance of dairy cows fed corn silage-based diets. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 2751-2759, 2001.

OSPINA, P.A.; NYDAM , D.V.; STOKOL, T.; OVERTON, T.R. Evaluation of nonesterified fatty acids and β-hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. **Journal of Dairy Science**. v. 93, p. 546–554, 2010.

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, Supplement, E.

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. Influence of source and amount of dietary fat on digestibility in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n.4, p. 1354-60, 1991.

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, 2006. p. 287-310.

PAPADOPOULOS, S.; LONERGAN, P.; GATH, V.; QUINN, K. M.; EVANS, A. C.; O'CALLAGHAN, D.; BOLAN, M.P. Effect of diet quantity and urea supplementation on oocyte and embryo quality in sheep. **Theriogenology**, v..55, p. 1059–69, 2001.

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 flaxseeds. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 1482–1490, 2002.

PETIT, H. V.; DEWHURST, R. J.; SCOLLAN, N. D.; PROULX, J. G.; KHALID, M. W.; HARESIGN, W.; TWAGIRAMUNGU, H.; MANN, G. E. Milk production and composition,

ovarian function, and prostaglandin secretion of dairy cows fed omega-3 fats. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.889–899, 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.; PALIN, M. F.; DOEPEL, L. Hepatic lipid metabolism in transition dairy cows fed flaxseed. **Journal of Dairy Science**, v.90, p. 4780–4792. 2007.

PETIT, H.V. Effects of dietary fat on reproduction. In: tri-state dairy nutrition conference, 2003, fort wayne, indiana. *Proceedings*... **Fort wayne, indiana: tri-state dairy nutrition conference**, 2003. p.35-47.

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.

POULOS, A.; ROBINSON, B. S.; FERRANTE, A.; HARVEY, D. P.; HARDY, S. J.; MURRAY, A. W. Effect of 22-32 carbon n-3 polyunsaturated FA on superoxide production in human neutrophils: synergism of docosahexaenoic acid with f-met-leu-phe and phorbol ester. **Immunology**, v. 73, p. 102-108, 1991.

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.

REES, D.; MILES, E. A.; BANERJEE, T.; WELLS, S. J.; ROYNETTE, C. E.; WAHLE, K. W. J. W.; CALDER, P. C. Dose-related effects of eicosapentaenoic acid on innate immune function in healthy humans: a comparison of young and older men. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 83, p. 331–342, 2006.

RENNÓ, F.P.; PEREIRA, J.C.; SANTOS, A.D.F.; ALVES, N.G.; TORRES, C.A.A.; RENNÓ, L.N.; BALBINOT, P.Z. Efeito da condição corporal ao parto sobre a produção e composição do leite, a curva de lactação e a mobilização de reservas corporais em vacas da raça Holandesa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.58, p.220-233, 2006.

REVELO, X. S.; WALDRON, M. R. Effects of in vitro insulin and 2,4-thiazolidinedione on the function of neutrophils harvested from blood of cows in different physiological states. **Journal of Dairy Science**. v.93, p.3990–4005.2010.

ROBINSON, R. S.; FRAY, M. D.; WATHES, D. C.; LAMMING, G. E.; MANN, G. E.In vivo expression of interferon tau mRNA by the embryonic trophoblast and uterine concentrations of interferon tau protein during early pregnancy in the cow. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, p. 470–474, 2006.

RODRIGUEZ-SALLABERRY, C. J.; CALDARI-TORRES, C.; COLLANTE, W. R.; STAPLES, C. R.; BADINGA, L. Plasma prostaglandin and cytokine concentrations in periparturient Holstein cows fed diets enriched in saturated or trans fatty acids. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n.12, p. 5446-52, 2007.

RUTIGLIANO, H. M.; LIMA, F. S.; CERRI, R. L. A.; GRECO, L. F.; VILELA, J. M..; MAGALHÃES, V.; SILVESTRE, T.; THATCHER, W. W.; SANTOS, J. E. P. Effects of method of presynchronization and source of selenium on uterine health and reproduction in dairy cows. **Journal of. Dairy Science**, v. 91, p 3323–3336, 2008.

SANTOS, F.L.; LANA, R.P.; SILVA, M.T.C.; BRANDÃO, S.C.C.; VARGAS, L.H. Produção e composição do leite de vacas submetidas a dietas contendo diferentes níveis e formas de suplementação de lipídios. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 30, p. 1376-1380, 2001.

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 in Domestic Animals**, v. 43, p. 23-30, 2008. Supplement 2.

SANTOS, J. E. P.; RUTIGLIANO, H. M.; SÁ FILHO, M. F. Risk factors for resumption of postpartum estrous cycles and embrionyc survival in lactating dairy cows. **Animal reproduction Science**, v. 110, p. 207-221, 2009.

SARTORI, R., MOLLO,M.R. Influência da ingestão alimentar na fisiologia reprodutiva da fêmea bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.197-204. 2007.

SARTORI, R.; SARTOR-BERGFELT, R.; MERTENS, S.A.; GUENTHER, J. N.; PARRISH, J. J.; WILTBANK, M. C.Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 2803–2812, 2002.

SASSEN, L. M. A.; LAMERS, J. M. J.; VERDOUW, P. D. Fish oil and the prevention and regression of arthrosclerosis. **Cardiovascular drugs and therapy**, v. 8, n. 2, p. 179-191, 1994.

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. 3003-19, 1992.

SEALS, R. C., MATAMOROS, I, LEWIS, G. S. Relationship between postpartum changes in 13, 14-dihydro-15-keto-pgf2α concentrations in holstein cows and their susceptibility to endometritis. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 1068–1073, 2002.

SHIMABUKURO, M.; WANG M-Y.; ZHOU, Y-T.; NEWGARD, C. B.; UNGE, R. H. Protection against lipoapoptosis of î2 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**. 2008. Dissertation to the graduate school (Doctor of Philosophy) - University of Florida, California, 2008.

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.

SIMOPOULOS, A. P. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. **Journal of American College of Nutrition**, v. 21, n. 6, p. 495-505, 2002.

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.

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 Sience**, v. 83, p. 278, 2000. Supplement 1.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. SAS OnlineDoc. Version 9.1.3. Cary: SAS Institute, 2004. (CD-ROM).

STENSON, W. F., D. CORT, J. RODGERS, R. BURAKOFF, K. DESCHRYVER-KECSKEMETI, T. L. GRAMLICH, AND W. BEEKEN. Dietary supplementation with fish oil in ulcerative colitis. **Annals of Internal Medicine**. v.116, p. 609–614, 1992.

STER, C.; LOISELLE, M.C.; LACASSE, P. Effect of postcalving serum nonesterified fatty acids concentration on the functionality of bovine immune cells. **Journal of Dairy Science**. v.95, p.708–717.2012

STONE, W.C.; CHASE, L.E.; OVERTON, T.R.; NESTOR, K.E. Brown midrib corn silage fed during the peripartal period increased intake and resulted in a persistent increase in milk solids yield of Holstein cows. **Journal of Dairy Science**. v. 95, p. 6665–6676, 2012.

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.

STURNEY, R. G.; REIS, A.; LEESE, H. J.; MCEVO, T. G., Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation an early embryo development. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 44, p. 50–58, 2009.

SURIYASATHAPORN, W.; DAEMEN, A. J. J. M.; E. N. NOORDHUIZEN-STASSEN, E. N.; DIELEMAN, S. J.; NIELEN, M.; SCHUKKEN, Y. H. Betahydroxybutirate leves in peripheral blood and ketone bodies supplemented in culture media affect the in vitro chemotaxis of bovine leukocytes. **Veterinary Immunology Immnopathology**, 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.

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.

TARGOWSKI, S. P.; KLUCINSKI, D. V. M. Reduction in mitogenic response of bovine lymhocytes 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.; MATTOS, R.; BINELLI, M.; HANSEN, T. R.; PRU, J.K. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. **Theriogenology**, v. 56, p. 1435–1450, 2001.

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.

THIES, F.; NEBE-VON-CARON, G.; POWELL, J. R.; YAQOOB, P.; NEWSHOLME, E. A.; CALDER, P. C. Dietary supplementation with γ-linolenic acid or fish oil decreases T lymphocyte proliferation in healthy older humans. **Journal of Nutritional**, v. 131, p. 1918–1927,

THOMPSON, P. J.; MISSO, N. L.; PASSARELLI, M.; PHILIPS, M. J. The effect of eicosapentanoic acid consumption on human neutrophil chemiluminescence. **Lipids**, v. 26, p. 1223-1226, 1991.

TIZARD,I. R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 6.ed. São Paulo: Roca, 2002. 532P.

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.

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

VALADARES FILHO, S. C.; MAGALHÃES, K. A.; ROCHA JÚNIOR, V. R. **Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 329p.

VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.D.F. Recentes avanços em proteína na nutrição de vacas leiteiras. **In: SINLEITE - SIMPÓSIO INTERNACIONAL NOVOS CONCEITOS EM NUTRIÇÃO**, 2., Lavras. Anais... Lavras, 2001. p.229-247.

VAN DEN TOP, A. M.; GEELEN, M. J.; WENSING, T.; WENTINK, G. H.; VAN'T KLOOSTER, A. T.; BEYNE, A. C. Higher postpartumhepatic triacylglycerol concentrations in dairy cows with free rather than restricted access to feed during the dry period are associated with lower activities of hepatic glycerolphosphate acyltransferase. **Journal of Nutrition**, v.126, p.76–85, 1996.

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 STRAALEN, 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 KNEGSEL, A. T.; VAN DEN BRAND, H.; DIJKSTRA, J.; TAMMINGA, S.; KEMP, B. Effect of dietary energy source on energy balance, production, metabolic disorders and reproduction in lactating dairy cattle. **Reprodoction Nutrition Development**,v.45, p. 665–88, 2005.

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.

VANDEHAAR, M. J.; SHARMA, B. K.; FOGWELL, R. L. Effect of dietary energy restriction on the expression of insulin-like growth factor-i in liver and corpus luteum of heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 832-841, 1995.

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.

VARMING, K.; SCHMIDT, E. B.; SCANEBORG, N.; MøLLER, J. M.; LERVANG, H. H.; GRUNNET, N.; JERSILD, C.; DYERBERG, J. The effect of n-3 fatty acids on neutrophil chemiluminescence. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 55, n.1, p. 47-52, 1995.

VASCONCELOS, J. L. M.; SARTORI, R.; OLIVEIRA., H. N.; GUENTHER, J. G.; WILTBANK, M. C. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology**, v. 56, p. 307-314, 2001.

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 ASSOCIÓN LATINOAMERICANA DE PRODUCIÓN ANIMAL**, 22, 2011, Montevideo. Anais...Montevideo: ALPA, 2011. p. K 67.

VETH, M. J.; BAUMAN, D. E.; KOCH, W.; MANN, G. E.; PFEIFFER, A. M.; BUTLER, W. R. Efficacy of conjugated linoleic acid for improving reproduction: a multi-study analysis in early-lactation dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 2662–2669, 2009.

WANG, H.; DEY, S. K. Lipid signaling in embryo implantation. **Prostaglandins Other Journal of Lipid Mediators and Cell Signallin**, v. 77, p. 84–102, 2005.

WARD, A. T.; WITTENBERG, K. M.; PRZYBYLSKI, R. Bovine milk fatty acid profiles produced by feeding diets containing solin, flax and canola. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p.1191–1196, 2002.

WEBB, R.; CAMPBELL, BK.; GARVERICK, H. A.; GONG, J. G.; GUTIERREZ, C. G.; ARMSTRONG, D. G. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement, v. 54, p.33–48, 1999.

WEBB, R.; NICHOLAS, B.; GONG, J. G.; CAMPBELL, B. K.; GUTIERREZ, C. G.; GARVERICK, H. A.; ARMSTRONG, D. G. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. **Reproduction Supplment**, v. 61, p. 71–90, 2003.

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.

WEISS, W.P.; PINOS-RODRÍGUEZ, J.M.; WYATT, D.J. The value of different fat supplements as sources of digestible energy for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 94, p. 931–939, 2011.

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.

WILTBANK, M.; LOPEZ, H.; SARTORI, R. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. **Theriogenology**, v.65, p.17-29, 2006.

WONNACOTT, K.E.; KWONG, W.Y.; HUGHES, J.; SALTER, A.M.; LEA, R.G.; GARNSWORTHY, P.C.; SINCLAIR, K.D. Dietary omega-3 and -6 polyunsaturated fatty acids affect the composition and development of sheep granulosa cells, oocytes and embryos. **Reproduction**. v. 139, p. 57–69, 2010.

YAQOOB, P., CALDER, P. C. The effect of dietary lipid manipulation on the production of murine t-cell-derived cytokines. **Cytokine**, v.7, p.548–553, 1995.

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.

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.