

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO – CIÊNCIA ANIMAL**

CHARLINE GODINHO PADILHA

**SUPLEMENTAÇÃO DO ÁCIDO ESTEÁRICO NA DIETA DE NULÍPARAS
OVINAS SOBRE A DEPOSIÇÃO DE GORDURA NA GLÂNDULA MAMÁRIA
E EXPRESSÃO DE GENES LIPOGÊNICOS**

**LAGES
2024**

CHARLINE GODINHO PADILHA

**SUPLEMENTAÇÃO DO ÁCIDO ESTEÁRICO NA DIETA DE NULÍPARAS
OVINAS SOBRE A DEPOSIÇÃO DE GORDURA NA GLÂNDULA MAMÁRIA
E EXPRESSÃO DE GENES LIPOGÊNICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Dimas Estrasulas de Oliveira

LAGES

2024

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Universitária Udesc,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Padilha, Charline Godinho

Suplementação do ácido esteárico na dieta de nulíparas ovinas sobre a deposição de gordura na glândula mamária e expressão de genes lipogênicos / Charline Godinho Padilha. -- 2024.

122 p.

Orientador: Dimas Estrasulas de Oliveira
Tese (doutorado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2024.

1. Digestão. 2. Nutrição. 3. Glândula mamária. 4. Ácidos graxos. 5. Lipídeos. I. Estrasulas de Oliveira, Dimas. II. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

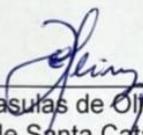
CHARLINE GODINHO PADILHA

**SUPLEMENTAÇÃO DO ÁCIDO ESTEÁRICO NA DIETA DE NULÍPARAS
OVINAS SOBRE A DEPOSIÇÃO DE GORDURA NA GLÂNDULA MAMÁRIA
E EXPRESSÃO DE GENES LIPOGÊNICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, da
Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutora em Ciência Animal

Banca examinadora

Orientador: _____

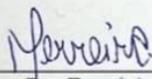

Dr. Dimas Estrasulas de Oliveira
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Documento assinado digitalmente
 CLAUDIO VAZ DI MAMBRO RIBEIRO
Data: 31/07/2024 11:47:11-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

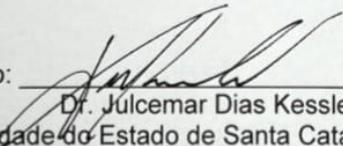
Membro: _____

Dr. Cláudio Vaz Di Mambro Ribeiro
Universidade Federal da Bahia – UFBA

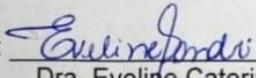
Membro: _____


Dr. Rogério Ferreira
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Membro: _____


Dr. Julcemar Dias Kessler
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Membro: _____


Dra. Eveline Caterine Sandri
Unidade Central de Educação Faem Faculdade - UCEFF

30 de julho de 2024 – Lages /SC

À minha família e aos meus amigos,
dedico esta tese

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

Primeiramente a Deus por ter me mantido forte perante todas as provações que enfrentei na minha vida pessoal durante o período de realização do doutorado, pois foi a minha fé que me sustentou na realização deste sonho.

À minha família e aos meus amigos por todo o incentivo e apoio nos dias bons e nos dias ruins.

Ao professor Dr. Dimas Estrasulas de Oliveira e todos os membros do grupo de pesquisa em nutrigenômica de ruminantes e não ruminantes – NUTRIGER e do grupo de estudo, pesquisa e extensão com ovinos – GEPEO.

A todas as pessoas que de alguma forma auxiliaram na construção desta tese.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – CAPES e ao Fundo Estadual de Apoio à Manutenção e ao Desenvolvimento da Educação Superior - FUMDES pelo apoio à pesquisa e pela concessão de bolsa de estudos.

Ao CNPq/Edital Universal (Processo 407240/2021-7) e à UDESC/FAPESC (Edital 48/2022 - Termo 2023 TR 000636, Processo 853/2023) via Programa de Apoio à Pesquisa Institucional (PAPI), pelos auxílios financeiros concedidos, essenciais ao desenvolvimento deste estudo.

À Cargill Nutrição Animal, na pessoa do Zootecnista MSc. Ricardo Dresch, pelas análises bromatológicas.

“Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”.

Josué 1:9

RESUMO

PADILHA, Charline Godinho. Suplementação do ácido esteárico na dieta de nulíparas ovinas sobre a deposição de gordura na glândula mamária e expressão de genes lipogênicos. p.122. **Tese** (Doutorado em Ciência Animal – Área: Produção Animal). Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Lages, 2024.

A suplementação com ácido esteárico (AE) em ruminantes tem apresentado resultados diversos. No entanto, acredita-se que esse ácido graxo (AG) tenha afinidade pelo tecido adiposo e esteja relacionado ao balanço energético. Além disso, a nutrição entre o nascimento e a puberdade pode ser fundamental no desenvolvimento da glândula mamária (GM) e com isso pode afetar a futura produção de leite. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação com AE sobre a deposição de gordura na GM, sobre o perfil de AG e expressão de genes lipogênicos no tecido adiposo de cordeiras, assim como avaliar a digestibilidade de um suplemento, pois as divergências mostradas nas pesquisas que avaliam o AE podem estar relacionadas à digestibilidade desse AG. Esse trabalho foi dividido em 4 capítulos originados de dois experimentos onde foram utilizadas 8 cordeiras (50% Lacaune x 50% Texel) divididas em dois grupos: 1) Controle e 2) AE (1,5% do consumo de matéria seca de AE). O primeiro experimento teve duração de 77 dias e os animais foram submetidos a ultrassonografia da GM para avaliação do tecido adiposo 1 vez por semana e nos dias 0 e 70 passaram por biópsia de tecido adiposo subcutâneo, para posterior análise do perfil de AG. Ao buscar validar a técnica de ultrassonografia avaliou-se os animais sem nenhuma suplementação e observou-se que não houve efeito do tempo ($P = 0,31$), de lado da GM ($P = 0,89$) ou entre os animais ($P = 0,11$) sobre a deposição de gordura na GM, no entanto houve efeito na deposição de gordura entre as áreas analisadas ($P = 0,0001$), indicando que a gordura se desenvolve sem um padrão específico. Em seguida, buscando avaliar os efeitos do AE observou-se que não houve efeito da suplementação com AE ($P = 0,11$) sobre a deposição de tecido adiposo na GM, porém, as cordeiras suplementadas apresentaram maior escore de condição corporal (ECC) sem aumentar o CMS da dieta. O tratamento com AE aumentou o teor dos ácidos láurico (C12:0), palmitoleico (C16:1), oleico (C18:1 *cis*-9) e araquidônico (C20:4 n6), respectivamente, em 36 ($P = 0,006$), 3,1 ($P = 0,02$), 8 ($P = 0,003$) e 7,7% ($P = 0,04$) quando comparado ao Controle. Além disso, houve interação entre tratamento e período nos teores dos AG láurico ($P = 0,009$), esteárico ($P = 0,09$) e CLA *cis*-9, *trans*-11 ($P = 0,08$). A suplementação com AE aumentou a abundância relativa de RNAm do gene GPAT ($P = 0,0103$), o qual é envolvido na síntese de triglicerídeos no tecido adiposo. O segundo experimento teve duração de 21 dias e nele foi realizado um ensaio de digestibilidade do AE através com coleta total de fezes. Os animais que receberam a suplementação apresentaram digestibilidade do AE de $63,8\% \pm 6,9$ e o grupo Controle digestibilidade de $80,9\% \pm 9,0$ ($P0.0001$). Em ambos os experimentos a análise estatística foi realizada através do SAS (OnDemand for Academics) pelo PROC MIXED, sendo resíduos estudentizados fora do intervalo ± 3 considerados outliers e excluídos da análise estatística e a normalidade dos dados testada. Em conclusão, a ultrassonografia pode ser útil na avaliação da GM de cordeiras identificando áreas de tecido adiposo (*mammary fat pad* - MFP) e parênquima (PAR) e a suplementação com AE melhora o ECC, mesmo não interferindo na

abundância de genes envolvidos na síntese lipídica ou no perfil de AG do tecido adiposo. No entanto, a ausência de efeitos da suplementação com AE pode estar relacionada a sua baixa digestibilidade.

Palavras-chave: Digestão; Nutrição; Glândula mamária; Ácidos graxos; Lipídeos.

ABSTRACT

PADILHA, Charline Godinho. Stearic acid supplementation in the diet of nulliparous sheep on fat deposition in the mammary gland and expression of lipogenic genes. p.123. Thesis (Doctorate in Animal Science – Area: Animal Production). Santa Catarina State University. Graduate Program in Animal Science. Lages, 2024.

Stearic acid (SA) supplementation in ruminants have shown diverse results. However, it is believed that this fatty acid (FA) has an affinity for adipose tissue and is related to energy balance. Additionally, nutrition between birth and puberty can be crucial for the development of the mammary gland (MG) and can thus affect future milk production. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of SA supplementation on fat deposition in the MG, on the FA profile, and the expression of lipogenic genes in the adipose tissue of lambs, as well as to assess the digestibility of this supplement, as discrepancies in research evaluating SA may be mainly related to the digestibility of this FA. This study was divided into four chapters derived from two experiments using eight lambs (50% Lacaune x 50% Texel) divided in into two groups: 1) Control and 2) SA (1.5% dry matter intake of SA). The first experiment lasted 77 days, and the animals underwent MG ultrasound to evaluate adipose tissue once a week, and on days 0 and 70, they underwent subcutaneous adipose tissue biopsy for subsequent FA profile analysis. In seeking to validate the ultrasound technique, we evaluated the animals without any supplementation and observed that there was no effect of time ($P = 0.31$), side of the MG ($P = 0.89$), or between animals ($P = 0.11$) on fat deposition in the MG. However, there was an effect on fat deposition between the analyzed areas ($P = 0.0001$), indicating that fat develops without a specific pattern. Then, seeking to evaluate the effects of SA, it was observed that there was no effect of SA supplementation ($P = 0.11$) on adipose tissue deposition in the MG. However, the supplemented lambs showed higher body condition scores (BCS) without increasing dry matter intake (DMI) of the diet. The SA treatment increased the content of lauric acid (C12:0), palmitoleic acid (C16:1), oleic acid (C18:1 *cis*-9), and arachidonic acid (C20:4 n6) by 36% ($P = 0.006$), 3.1% ($P = 0.02$), 8% ($P = 0.003$), and 7.7% ($P = 0.04$), respectively, compared to the Control. Additionally, there was an interaction between treatment and period in the contents of lauric acid ($P = 0.009$), stearic acid ($P = 0.09$), and CLA *cis*-9, *trans*-11 ($P = 0.08$). SA supplementation increased the relative abundance of GPAT mRNA ($P = 0.0103$), which is involved in triglyceride synthesis in adipose tissue. The second experiment lasted 21 days and involved digestibility assays of SA through consumption control and total feces collection for subsequent bromatological analysis and FA profile. The animals that received supplementation had an SA digestibility of $63.8\% \pm 6.9$, and the Control group had a digestibility of $80.9\% \pm 9.0$ ($P < .0001$). In both experiments, statistical analysis was performed using SAS (OnDemand for Academics) through PROC MIXED, studentized residuals outside the range ± 3 were considered outliers and excluded from statistical analysis, and data normality tested. In conclusion, ultrasound can be useful in evaluating the MG of lambs by identifying areas of adipose tissue (mammary fat pad - MFP) and parenchyma (PAR), and SA supplementation improves BCS, even without affecting the abundance of genes involved in lipid synthesis or the FA profile of adipose tissue. However, the absence of effects of SA supplementation may be related to its low digestibility.

Keywords: Digestion; Nutrition; Mammary gland; Fatty acids; Lipids.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

NOTA TÉCNICA: AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA DA DEPOSIÇÃO DE TECIDO ADIPOSEO NA GLÂNDULA MAMÁRIA DE CORDEIRAS PRÉ-PÚBERES

Tabela 1. Ingredientes e composição da dieta experimental	52
---	----

CAPÍTULO II

DEPOSIÇÃO DE GORDURA NA GLÂNDULA MAMÁRIA AVALIADA POR ULTRASSONOGRAFIA EM CORDEIRAS SUPLEMENTADAS COM ÁCIDO ESTEÁRICO

Tabela 1. Perfil de ácidos graxos do suplemento lipídico rico em ácido esteárico	68
Tabela 2. Ingredientes e composição da dieta experimental	69
Tabela 3. Efeito da suplementação com ácido esteárico sobre consumo de matéria seca e desempenho das cordeiras.....	73

CAPÍTULO III

EXPRESSÃO GÊNICA E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO TECIDO ADIPOSEO DE CORDEIRAS SUPLEMENTADAS COM ÁCIDO ESTEÁRICO

Tabela 1. Perfil de ácidos graxos do suplemento lipídico rico em ácido esteárico	85
Tabela 2. Ingredientes e composição da dieta experimental	86
Tabela 3. Primers ovinos usados na análise de PCR em tempo real.....	89
Tabela 4. Efeito da suplementação com ácido esteárico sobre o perfil de ácidos graxos no tecido adiposo de cordeiras.....	92
Tabela 5. Efeito da suplementação com ácido esteárico sobre o perfil de ácidos graxos no tecido adiposo de cordeiras (tratamento ao longo do tempo).....	93
Tabela 6. Abundância relativa de RNAm de genes envolvidos na síntese lipídica do tecido adiposo de cordeiras suplementadas com esteárico comparadas ao Controle	95

CAPÍTULO IV

DIGESTIBILIDADE DO ÁCIDO ESTEÁRICO EM OVELHAS

Tabela 1. Perfil de ácidos graxos do suplemento lipídico rico em ácido esteárico	105
Tabela 2. Ingredientes e composição da dieta experimental	106
Tabela 3. Efeito da suplementação com ácido esteárico sobre consumo de matéria seca e produção de fezes.	110
Tabela 4. Consumo, estimativa de biohidrogenação, excreção e digestibilidade do ácido esteárico	111
Tabela 5. Digestibilidade exclusiva do ácido esteárico suplementado	112

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Pontos analisados da glândula mamária..... 33

CAPÍTULO I

NOTA TÉCNICA: AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA DA DEPOSIÇÃO DE TECIDO ADIPOSEO NA GLÂNDULA MAMÁRIA DE CORDEIRAS PRÉ-PÚBERES

Figura 1. Posição da probe do ultrassom em relação aos quadros analisados 54

Figura 2. Pontos analisados da glândula mamária..... 55

Figura 3. Média do peso vivo, escore de condição corporal e ganho diário médio das cordeiras ao longo do período experimental..... 57

Figura 4. Escala de cinza da glândula mamária de cordeiras avaliadas por ultrassom..... 57

Figura 5. Escala de cinza semanal da glândula mamária de cordeira avaliadas por ultrassom..... 58

Figura 6. Escala de cinza semanal da glândula mamária direita e esquerda de cordeiras avaliadas por ultrassom..... 58

Figura 7. Escala de cinza em cada área analisada da glândula mamária de cordeiras avaliadas por ultrassom..... 59

CAPÍTULO II

DEPOSIÇÃO DE GORDURA NA GLÂNDULA MAMÁRIA AVALIADA POR ULTRASSONOGRAFIA EM CORDEIRAS SUPLEMENTADAS COM ÁCIDO ESTEÁRICO

Figura 1. Pontos analisados da glândula mamária..... 71

Figura 2. Escore de condição corporal médio de cordeiras suplementadas com ácido esteárico comparadas ao Controle 73

Figura 3. Escala de cinza da glândula mamária de cordeiras suplementadas com ácido esteárico comparadas ao Controle 74

Figura 4. Escala de cinza semanal da glândula mamária de cordeiras suplementadas com ácido esteárico comparadas ao Controle. 74

Figura 5. Escala de cinza semanal da glândula mamária direita e esquerda de cordeiras suplementadas com ácido esteárico comparadas ao Controle	75
Figura 6. Escala de cinza em cada área analisada da glândula mamária de cordeiras suplementadas com ácido esteárico em comparadas ao Controle ..	76
Figura 7. Escala de cinza em diferentes áreas da glândula mamária de cordeiras suplementadas com ácido esteárico comparadas ao Controle	76

CAPÍTULO III

EXPRESSÃO GÊNICA E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO TECIDO ADIPOSE DE CORDEIRAS SUPLEMENTADAS COM ÁCIDO ESTEÁRICO

Figura 1. Abundância do gene GPAT no tecido adiposo de cordeiras suplementadas com ácido esteárico comparadas ao Controle	94
---	----

CAPÍTULO IV

DIGESTIBILIDADE DO ÁCIDO ESTEÁRICO EM OVELHAS

Figura 1. Arreios com bolsas coletoras de fezes e bolsa coletora de urina....	107
Figura 2. Desenho esquemático da metodologia de estimativa do ácido esteárico disponível para absorção intestinal nos animais que receberam suplemento rico neste ácido graxo.....	109

LISTA DE ABREVIATURAS

ACACA α	Acetil-CoA carboxilase
AE	Ácido esteárico
AG	Ácido graxo
AGPAT	Acilglicerolfosfato aciltransferase
BH	Biohidrogenação
β -actina	Beta-actina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CD36	Molécula CD36
CLA	Ácido linoleico conjugado
CMS	Consumo de matéria seca
CON	Controle
DGAT	Diglicerídeo aciltransferase
DGL	Depressão de gordura do leite
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ECC	Escore de condição corporal
EE	Extrato etéreo
EM	Energia metabolizável
FABP4	Proteína ligadora de ácido graxo 4
FASN	Ácido graxo sintetase
FL	Fosfolipídeo
GM	Glândula mamária
GMD	Ganho médio diário
GPAT	Glicerol-3- fosfato aciltransferase
LPL	Lipase lipoproteica
MFP	“Fatty pad” mamário – gordura mamária
MS	Matéria seca
PAR	Parênquima
PPAR- γ	Receptores ativados por proliferadores de peroxissomo
PV	Peso vivo
RNA	Ácido ribonucléico
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
SCD	Estearoil-CoA dessaturase
S18	Proteína Ribossomal S18
TG	Triglicerídeos
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	28
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
2.1. USO DE SUPLEMENTOS LIPÍDICOS NA NUTRIÇÃO OVINA	31
2.1.1. <i>Objetivos da suplementação lipídica</i>	31
2.1.2. <i>Suplementação com ácido esteárico</i>	31
2.2. METABOLISMO LIPÍDICO	32
2.2.1. <i>Biohidrogenação ruminal</i>	32
2.2.2. <i>Digestibilidade de ácidos graxos</i>	33
2.2.2.1. <i>Digestibilidade de ácidos graxos saturados</i>	34
2.2.3. <i>Atividade gênica do tecido adiposo</i>	35
2.3. PARÊNQUIMA E TECIDO ADIPOSEO MAMÁRIO	36
2.4. ULTRASSONOGRAFIA DE GLÂNDULA MAMÁRIA	37
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
4. HIPÓTESE	47
4.1. <i>Geral</i>	47
4.2. <i>Específicas</i>	47
5. OBJETIVO	48
5.1. <i>Geral</i>	48
5.2. <i>Específicas</i>	48
CAPÍTULO I	49
6. NOTA TÉCNICA: AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA DA DEPOSIÇÃO DE TECIDO ADIPOSEO NA GLÂNDULA MAMÁRIA DE CORDEIRAS PRÉ-PÚBERES	49
6.3. INTRODUÇÃO	50
6.4. MATERIAIS E MÉTODOS	51
6.4.1. <i>Desenho experimental, animais e tratamentos</i>	51
6.4.2. <i>Dieta e manejo</i>	52
6.4.3. <i>Análise ultrassonográfica</i>	53
6.4.4. <i>Avaliação das imagens de ultrassom através do ImageJ</i>	54
6.4.5. <i>Análise estatística</i>	55
6.5. RESULTADOS	56
6.5.1. <i>Consumo de matéria seca e desempenho animal</i>	56
6.5.2. <i>Avaliação ultrassonográfica da glândula mamária</i>	57

6.6.	DISCUSSÃO	59
6.7.	CONCLUSÃO	61
6.8.	REFERÊNCIAS	62
CAPÍTULO II		64
7. DEPOSIÇÃO DE GORDURA NA GLÂNDULA MAMÁRIA AVALIADA POR ULTRASSONOGRRAFIA EM CORDEIRAS SUPLEMENTADAS COM ÁCIDO ESTEÁRICO		
		64
7.3.	INTRODUÇÃO	65
7.4.	MATERIAL E MÉTODOS	67
7.4.1.	<i>Desenho experimental, animais e tratamentos</i>	67
7.4.2.	<i>Dieta e manejo</i>	69
7.4.3.	<i>Análise ultrassonográfica</i>	70
7.4.4.	<i>Avaliação das imagens de ultrassom através do ImageJ</i>	70
7.4.5.	<i>Análise estatística</i>	72
7.5.	RESULTADOS	72
7.5.1.	<i>Consumo de matéria seca e desempenho animal</i>	72
7.5.2.	<i>Avaliação ultrassonográfica da glândula mamária</i>	74
7.6.	DISCUSSÃO	77
7.7.	CONCLUSÃO	78
7.8.	REFERÊNCIAS	79
CAPÍTULO III		82
8. EXPRESSÃO GÊNICA E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO TECIDO ADIPOSO DE CORDEIRAS SUPLEMENTADAS COM ÁCIDO ESTEÁRICO		
		82
8.3.	INTRODUÇÃO	83
8.4.	MATERIAIS E MÉTODOS	84
8.4.1.	<i>Desenho experimental, animais e tratamentos</i>	84
8.4.2.	<i>Dieta e manejo</i>	85
8.4.3.	<i>Biópsia do tecido adiposo</i>	87
8.4.4.	<i>Extração de RNA, síntese de DNA Complementar (cDNA) e PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)</i>	87
8.4.5.	<i>Análise de perfil de ácidos graxos</i>	89
8.4.6.	<i>Análise estatística</i>	90
8.5.	RESULTADOS	90
8.5.1.	<i>Consumo de matéria seca e desempenho animal</i>	90
8.5.2.	<i>Perfil de ácidos graxos do tecido adiposo</i>	91

8.5.3.	<i>Expressão gênica</i>	94
8.6.	DISCUSSÃO	95
8.7.	CONCLUSÃO	97
8.8.	REFERÊNCIAS	98
CAPÍTULO IV		102
9.	DIGESTIBILIDADE DO ÁCIDO ESTEÁRICO EM OVELHAS	102
9.3.	INTRODUÇÃO	103
9.4.	MATERIAIS E MÉTODOS	104
9.4.1.	<i>Desenho experimental, animais e tratamentos</i>	104
9.4.2.	<i>Dieta e manejos</i>	105
9.4.3.	<i>Coletas</i>	107
9.4.4.	<i>Análises de perfil de ácidos graxos dos alimentos e das fezes</i>	107
9.4.5.	<i>Análises de extrato etéreo dos alimentos e das fezes</i>	108
9.4.6.	<i>Cálculos e análise estatística</i>	108
9.5.	RESULTADOS	110
9.5.1.	<i>Consumo de matéria seca e produção de fezes</i>	110
9.5.2.	<i>Consumo e digestibilidade do ácido esteárico</i>	110
9.6.	DISCUSSÃO	112
9.7.	CONCLUSÃO	116
9.8.	REFERÊNCIAS	117

1. INTRODUÇÃO

De forma geral, os estudos realizados com ruminantes, comparando ácidos graxos (AG), demonstraram um maior potencial do ácido esteárico (AE) em ser direcionado ao tecido adiposo, contribuindo para a melhoria no balanço energético dos animais. No entanto, os mecanismos ligados às respostas no metabolismo lipogênico de ruminantes ainda não são totalmente compreendidos. Além disso, são escassos os estudos que avaliaram os efeitos da suplementação com AE em animais em balanço energético positivo, em desenvolvimento e não lactantes, ou ainda que tenham avaliado a influência da suplementação com esse AG sobre características de desenvolvimento de estruturas da glândula mamária (GM).

De acordo com Molenaar et al., (2020), as taxas de desenvolvimento de tecidos mamários (parênquima e a “almofada” de gordura mamária - “*fatpad*”), em resposta à nutrição no início da vida pode ter uma influência importante na produção de leite ao longo do tempo. Esses mesmos autores descreveram que a alimentação com maiores quantidades de nutrientes dietéticos do pós-desmame à puberdade estimulou o crescimento do “*fatpad*”, o qual serve como uma matriz para apoiar o crescimento do tecido ductal e secretor. No entanto, é importante ressaltar que um desenvolvimento exagerado de tecido adiposo na GM pode comprometer o desenvolvimento do parênquima e assim prejudicar a produção de leite no futuro (MOLENAAR et al., 2020).

Como forma de avaliar a influência da dieta sobre a GM, e em consonância com o bem-estar animal, estudos que não necessitem de abate ou de técnicas de avaliações invasivas vêm sendo buscadas e encorajadas pelos comitês de ética animal e a avaliação por ultrassonografia tem potencial de ser utilizada. O ultrassom tem sido cada vez mais usado em estudos sobre anatomia mamária e armazenamento de leite (BRUCKMAIER E BLUM, 1992), para monitorar o desenvolvimento das GM e entender qual influência a dieta tem sobre esses tecidos (NISHIMURA et al., 2011; ALBINO et al., 2015; ALBINO et al., 2017). Os métodos de análise do úbere por ultrassom podem ser úteis para monitorar a resposta das GM à diferentes nutrientes (MOLENAAR et al., 2020).

Além disso, sabe-se que em comparação a outros AG, o AE parece ser mais direcionado ao tecido adiposo, contribuindo para a melhoria no balanço energético dos animais, além de participar na regulação do metabolismo e transcrição gênica em ruminantes (BIONAZ et al., 2011), realizando alterações na expressão de genes envolvidos na síntese lipídica (HORSTMANN et al., 2021; AGUIAR et al., 2022; BESSANI et al., 2022). No entanto, os mecanismos ligados às respostas do AE no metabolismo lipogênico de ruminantes ainda não são totalmente compreendidos e o tipo de dieta oferecida aos animais pode modificar a proporção de AG depositados em seus tecidos (VELASCO et al., 2001).

Contudo, para que se observe os possíveis efeitos da suplementação com AE é necessário considerar que a disponibilidade e a digestibilidade são fatores determinantes para sua atuação no organismo animal. A ingestão em si pode variar conforme disponibilidade e palatabilidade (YOUSUF et al., 2014), já a eficiência com a qual o nutriente é utilizado pelo animal varia conforme a digestibilidade (YOUSUF et al., 2013).

Dentre os fatores que influenciam as respostas produtivas de ruminantes leiteiros suplementados com fontes individuais de AG saturados, a digestibilidade dos suplementos ricos (>80%) em AG deve ser levada em consideração. Embora a quantidade de AE que flui do rúmen para o intestino delgado seja consideravelmente superior àquela consumida, devido a biohidrogenação (BH) dos AG poliinsaturados da dieta, a transferência desse AG para o leite e tecidos não ocorre da mesma forma e magnitude (LOFTEN et al. 2014).

Estudos prévios relataram diferenças entre a digestibilidade do AE, indicando que as reduções totais na digestibilidade podem ser até três vezes maiores para uma mesma quantidade consumida de AE em comparação a outros AG como o C16:0, possivelmente pelo tamanho de cadeia de carbonos (SOUZA et al., 2018). Estudos que utilizaram a suplementação em níveis crescentes de AE na dieta de vacas leiteiras demonstraram que ocorreu uma diminuição na digestibilidade total de AG conforme o consumo, ainda que efeitos positivos nas respostas produtivas com consumo de até 1,5% da MS da dieta tenham sido observados (RICO et al., 2017). No entanto, Boerman et al. (2017) não observaram efeitos nas respostas produtivas de vacas leiteiras

suplementadas com AE, devido à redução na digestibilidade ocasionada pelo aumento no consumo do AG.

Dessa maneira, tendo em vista que uma nutrição melhorada no início da vida prepararia melhor a GM para responder aos sinais que induzem desenvolvimento mamário (AKERS, 2017), assim como melhoraria o balanço energético dos animais devido ao aumento de tecido adiposo corporal, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do AE na deposição de gordura mamária e corporal, através de ultrassonografia da glândula mamária e da análise de perfil de AG e de expressão de genes envolvidos na síntese lipídica do tecido adiposo de cordeiras, assim como avaliar a digestibilidade do AE.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. USO DE SUPLEMENTOS LIPÍDICOS NA NUTRIÇÃO OVINA

2.1.1. *Objetivos da suplementação lipídica*

Para um desenvolvimento e desempenho adequados, os animais devem receber uma dieta equilibrada em termos de macro (carboidratos, proteínas e lipídeos) e micronutrientes (vitaminas e minerais). A importância dos lipídeos está principalmente relacionada a dieta de animais de alta produção, para os quais o atendimento das exigências em energia pode ser prejudicado em períodos fisiológicos específicos (pré e pós-parto) (JENKINS e MCGUIRE, 2006). No entanto, de acordo com Loften et al. (2014), a suplementação lipídica pode ser utilizada também em períodos fisiológicos de balanço energético positivo, por demonstrar resultados favoráveis na produção de leite, na produção de gordura do leite e no ganho de peso.

Além disso, está em ascensão o interesse sobre o entendimento dos efeitos de diferentes fontes de AG sobre o metabolismo e às respostas produtivas com intuito de desenvolver estratégias que melhorem a produção e a qualidade da gordura do leite (SHINGFIELD et al., 2010). Apesar de a maioria dos suplementos lipídicos comercialmente disponíveis serem compostos por misturas de AG, existe um forte interesse pelo entendimento individual dos efeitos dos AG sobre o metabolismo animal (SOUZA E LOCK, 2019; RICO et al., 2020)

2.1.2. *Suplementação com ácido esteárico (AE)*

O AE é um AG de cadeia longa, saturado, formado principalmente pela BH ruminal (JENSEN, 2002), compondo de 5 a 15% na gordura do leite (SAMPATH e NTAMBI, 2005) e aproximadamente 17% do tecido adiposo de ruminantes (CASTRO-CARRERA et al., 2014), podendo ser obtido, por exemplo, a partir do óleo de soja ou de outras fontes ricas nesse AG.

Alguns estudos vêm demonstrando efeitos positivos no uso do AE na alimentação de ruminantes, principalmente quando relacionado ao teor de

gordura e produção de leite (STEELE E MOORE, 1968; PIANTONI et al. 2015); e devido a esse possível efeito, algumas pesquisas foram realizadas a fim de avaliar sua capacidade de mitigar a depressão de gordura do leite (DGL) (TORAL et al., 2016; AGUIAR et al., 2022). No entanto, outras pesquisas mostraram que a utilização desse AG não gerou efeitos sobre a produção e produção de gordura do leite (BOERMAN et al., 2017; HORSTMANN et al., 2021).

Com isso, entende-se que os efeitos da suplementação variam possivelmente devido ao tipo e ao nível de inclusão do AE, a interação com outros componentes da dieta, estado fisiológico dos animais e digestibilidade do suplemento (BOERMAN et al., 2015).

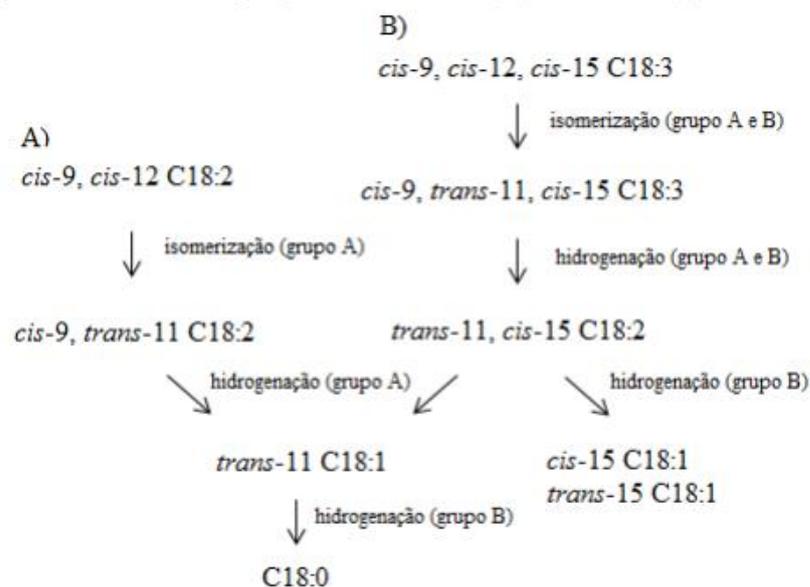
2.2. METABOLISMO LIPÍDICO

2.2.1. Biohidrogenação ruminal

Ruminantes alimentados com dietas contendo ou não concentrados, ingerem gordura principalmente na forma de galactolipídeos e triglicerídeos, respectivamente. Embora os AG fornecidos por essas duas fontes sejam principalmente insaturados (ácido linolênico, C18:3 nas forragens e o ácido linoleico, C18:2 nos grãos e seus subprodutos), a gordura do leite é composta principalmente por AG saturados, predominando o AE e C16:0 (JENSEN, 2002), o que demonstra que os lipídeos oriundos da dieta sofrem transformação através do metabolismo ruminal.

Para que esses lipídeos sejam metabolizados é necessário que haja dentro do rúmen, dois processos: a) hidrólise das ligações do tipo “éster” entre os AG e o glicerol dos triglicerídeos, diglicerídeos e fosfolipídeos e; b) após a lipólise, os AG saturados permanecem inalterados e os AG insaturados sofrem a BH (adição de um átomo de H⁺ às duplas ligações) (PALMQUIST et al., 2005). A BH é um processo com várias etapas (Figura 1) e quando finalizada gera AG saturados, principalmente o AE.

Figura 1. Via metabólica proposta para biossíntese do AE (Adaptado de Harfoot e Hazlewood (1997))



2.2.2. Digestibilidade de ácidos graxos

Digestibilidade é considerada a fração do alimento consumido que não é recuperada nas fezes; e quando esse valor é expresso como porcentagem da ingesta, denomina-se coeficiente de digestibilidade (ANDRIGUETTO et al., 1982). A digestibilidade dos AG no intestino delgado é crucial, uma vez que a quantidade absorvida de AG específicos pode influenciar a produção de leite e seus componentes, além do balanço e da distribuição de energia pelo organismo dos animais (PANTOJA et al., 1996; DE SOUZA et al., 2018).

Suplementos ricos em AG são utilizados frequentemente na alimentação de ruminantes com o intuito de aumentar o fornecimento energético. Dessa forma, avaliar a digestibilidade de diferentes suplementos se torna importante para estabelecer seu aproveitamento no organismo animal (WEISS et al., 2011; DE SOUZA et al., 2019). Além disso, a avaliação da digestibilidade dos AG é necessário mesmo na ausência de suplementação, pois os AG podem variar conforme a dieta basal e conseqüentemente gerar respostas digestivas e metabólicas distintas (RICO et al., 2017; DE SOUZA et al., 2018).

Trabalhos que avaliaram digestibilidade dos AG sugeriram que o grau de esterificação dos suplementos de gordura tem sido relacionado como um fator que pode afetar a digestibilidade e assim, as respostas produtivas (PANTOJA et al., 1995). Um outro possível fator que pode afetar a digestibilidade de AG estaria relacionado a diferenças no perfil de AG dos suplementos (SOUZA e LOCK, 2019) pois embora o fluxo total de AG no duodeno afete a digestibilidade (BOERMAN et al., 2015), o perfil de AG que chega ao duodeno é um fator crítico (DOREAU e CHILLIARD, 1997; DE SOUZA et al., 2018).

Vários estudos indicaram que a digestibilidade total dos AG tende a diminuir à medida que aumenta a quantidade de AG saturados na dieta (BOERMAN et al., 2017; CHAMBERLAIN and DE PETERS, 2017) e as diferenças na digestibilidade dos AG são proporcionais a sua ingestão (BOERMAN et al., 2015).

Além disso, não existe um consenso sobre os mecanismos envolvidos na baixa digestibilidade de alguns AG, no entanto, as possíveis causas incluem limitações na emulsificação pela lisolecitina ou competição por sítios de absorção (DRACKLEY, 2000), limitação da absorção através de micelas intestinais, baixa solubilidade e capacidade de formação de sais insolúveis, e baixa absorção e reesterificação mais lenta no interior das células intestinais (OCKNER et al., 1972).

2.2.2.1. Digestibilidade de ácidos graxos saturados

Souza e Lock (2018) utilizaram um suplemento com 77% de C16:0 e 5% de AE e observaram uma redução de 8,7% na digestibilidade total dos AG em comparação com sais de palma em vacas lactantes. Weiss et al. (2011) observaram que a digestibilidade total dos AG foi reduzida em 8% quando um suplemento contendo 72% de C16:0 e 5% de AE foi oferecido para vacas, comparado com uma dieta controle. Rico et al. (2014) relataram que vacas de baixa produção alimentadas com suplemento rico em C16:0 tiveram efeitos positivos sobre a digestibilidade total dos AG com 16 carbonos. Em uma meta-análise, Boerman et al. (2015) não observaram redução na digestibilidade dos AG quando o fluxo duodenal de C16:0 aumentou até 500g/d, enquanto aumento no fluxo duodenal de AE para o mesmo nível reduziu a digestibilidade dos AG.

2.2.3. Atividade gênica do tecido adiposo

A função primordial do tecido adiposo é oferecer energia na forma de AG para outros órgãos. Por isso a nutrição é importante na lipogênese do fígado, tecido adiposo e GM, os quais são considerados os principais sítios do metabolismo de AG. Esses três tecidos são capazes de sintetizar AG *de novo* e esterificá-los em triglicerídios (VERNON, 2002).

Dessa maneira, após ocorrer a BH no rúmen, os lipídeos que estão disponíveis para serem absorvidos no intestino delgado incluem principalmente AG saturados (AE e C16:0), intermediários da BH, lipídeos provenientes de micro-organismos e alguns triglicerídeos provenientes da dieta (CHILLIARD, et al., 2007).

Em seguida os lipídeos absorvidos no intestino delgado serão reesterificados em triglicerídeos (TG) e fosfolipídeos (FL) e posteriormente ocorre a síntese de quilomícrons através desses TG e FL, juntamente com colesterol. Os quilomícrons juntamente com as lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), são inicialmente secretados para o sistema linfático e, após, para a circulação sanguínea (HOCQUETTE et al., 1999). Em tecidos como o músculo esquelético, o tecido adiposo e a GM, a lipoproteína lipase (LPL) atua hidrolisando o TG contido nos quilomícrons e nos VLDL e após essa hidrólise, os AG liberados são transportados para o interior das células através de transportadores específicos de AG, como a translocase de ácidos graxos (CD36) e a proteína de ligação a ácidos graxos (FABP) (LADEIRA et al., 2018). Esses AG são ligados às proteínas de ligação de AG (FAPB) e serão utilizados de maneiras diversas no organismo (oxidação, esterificação ou armazenamento) (URRUTIA et al., 2020).

No tecido adiposo de ruminantes os principais precursores para a síntese *de novo* de AG são o acetato, o propionato e o butirato (LADEIRA et al., 2018). Os AG derivados da dieta e os sintetizados *de novo* nos adipócitos, são armazenados na forma de TG em gotículas lipídicas (URRUTIA et al., 2020). Além disso, a síntese *de novo* de AG ocorre através de uma sequência de reações enzimáticas que incluem enzimas como a acetil-CoA carboxilase alfa (ACACA α), o complexo de ácido graxo sintase (FAS), a elongase de ácido graxo (ELOVL) e a estearoil-CoA dessaturase (SCD) (LAPID et al., 2017).

No processo de síntese de triglicerídeos, os AG são esterificados ao glicerol, inicialmente, pela ação da glicerol-3-fosfato aciltransferase (GPAT) que adiciona AG ao glicerol-3-fosfato, marcando o início da formação de triglicerídeos (BERNARD et al., 2006). Em seguida, ocorre uma segunda acetilação, através da acilglicerol-3-fosfato aciltransferase (AGPAT) formando o diacilglicerol, que é convertido em triacilglicerol pela ação da diacilglicerol aciltransferase (DGAT) (BERNARD et al., 2006). Em resumo, a GPAT é crucial pois catalisa o primeiro passo na via de síntese dos triglicerídeos (GONZALEZ-BARO et al., 2006) e a AGPAT converte o produto da GPAT em diacilglicerol, e a DGAT finaliza o processo ao esterificar AG de cadeias longas e curtas, na posição sn-3 do glicerol, formando assim o triacilglicerol (SHINDOU et al., 2008).

Além disso, existem três isoformas do receptor ativado por proliferadores de peroxissomos (PPAR): α , β e γ , os quais desempenham papéis cruciais na regulação da expressão gênica de genes envolvidos na síntese lipídica e possuem uma abundância de mRNA elevada no tecido adiposo (BIONAZ et al., 2013; SHI et al., 2013). A atividade do PPAR γ está positivamente associada à regulação de genes fundamentais para a síntese *de novo* de AG (como ACACA α e FASN) e para a dessaturação de AG de cadeia longa (como SCD) no adiposo (BIONAZ et al., 2013; SHI et al., 2013).

2.3. PARÊNQUIMA E TECIDO ADIPOSEO MAMÁRIO

O início do desenvolvimento e crescimento da GM começa ainda no útero (ROWSON et al., 2012). Ao nascimento existe a presença de um sistema ductal rudimentar e esse sistema de ductos se estende entre a cisterna do teto, cisterna da glândula e termina com os ductos epiteliais (ESSELBURN et al., 2015). O tecido epitelial, junto com tecido estromal formado por tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos e linfáticos, são chamados de parênquima (PAR). Já a estrutura conhecida como “*fat pad*” ou almofada de gordura mamária (MFP) fica próximo ao PAR, no entanto não possui células epiteliais (ESSELBURN et al., 2015; ALBINO et al., 2017). As estruturas do epitélio mamário e do estroma derivam, respectivamente, do ectoderma e mesoderma embrionário (ESSELBURN et al., 2015).

Dessa forma, a GM é formada por dois tipos principais de tecidos que exercem funções diferentes. As estruturas do epitélio túbulo-alveolar atuam na produção e secreção do leite, já o estroma auxilia no principalmente suporte e formato da GM (ESSELBURN et al., 2015).

Estudos que buscam entender a proporção de PAR e MFD foram realizados em vacas (ALBINO et al., 2016; MOLENAAR et al., 2020; HASLIN et al., 2021) e ovelhas (ESSELBURN et al., 2015) e possuem como principal objetivo analisar o efeito da dieta e do PV sobre desenvolvimento da GM, pois a alimentação entre o nascimento e a puberdade demonstra alterar o crescimento mamário. Alguns autores citaram que a dieta possui capacidade de aumentar a taxa de crescimento dos animais e conseqüentemente permite que atinjam a puberdade e primeira prenhez mais cedo, com isso pode se observar maior desenvolvimento da GM (BROWN et al., 2005) e maiores produções de leite na primeira lactação (SOBERON e VAN AMBURGH, 2013). No entanto, altas taxas de crescimento da GM, principalmente MFP, antes da puberdade podem ter uma influência negativa na futura produção de leite; esse efeito ocorreria pela redução da idade de puberdade e primeira parição, alcançada pela aceleração do crescimento e imaturidade associada do tecido mamário (MOLENNAR et al., 2017).. Além disso, o tamanho do MFP determina a área máxima de PAR e, com isso, pode indicar o potencial final de produção da GM (MOLENNAR et al., 2017).

2.4. ULTRASSONOGRAFIA DE GLÂNDULA MAMÁRIA

O ultrassom tem sido utilizado na indústria de carnes há muito tempo para determinar a espessura de gordura subcutânea e o acúmulo de gordura intramuscular (WILLIAMS, 2002). Isso só é possível devido a diferença na forma como a gordura e o músculo refletem ondas de ultrassom (BRETHOUR, 1990). Nessa mesma lógica é possível estimar através de ultrassom o conteúdo de PAR e MDF da GM, pois o PAR é considerado hipoecóico (preto) e o MFP é hiperecóico (branco) (ESSELBURN et al., 2015).

Os estudos que avaliam desenvolvimento e estruturas específicas da GM de bovinos e ovinos normalmente são realizados *post mortem* ou envolvem procedimentos invasivos como a biópsia, a qual pode em alguns casos gerar danos ao úbere. Ao longo do tempo, formas de avaliações não invasivas da GM

foram consideradas em animais ainda vivos e buscavam relacionar o desenvolvimento da GM através do comprimento do teto (MORAN et al., 1991; LAMMERS et al., 1999) e até mesmo por palpação do PAR (DONOHO, 1955; ELLIOT, 1957). No entanto, muitos desses estudos mostravam não ser eficientes ou não ter relação entre as variáveis analisadas. Atualmente, técnicas de avaliação das estruturas da GM por meio de imagens vêm sendo aplicadas como forma de monitorar o crescimento mamário e entre esses destaca-se o ultrassom.

A avaliação do tecido mamário por US foi realizada em ovelhas (BRUCKMAIER e BLUM, 1992). Foi usada em cabras (NUDDA et al., 2000) e ovelhas (CASTILLO et al., 2008) na avaliação do tamanho da cisterna da glândula e também na avaliação de características dos tetos de cabras (DÍAZ et al., 2013), ovelhas (ALEJANDRO et al., 2014) e vacas (VETTER et al., 2014). O uso da US também foi relatado na busca de alterações patológicas da GM de cabras (FASULKOV et al., 2014) e na análise de partição do leite entre os compartimentos do úbere (cisternal e alveolar) de ovelhas (ROVAI et al., 2008). Mais recentemente, estudos avaliaram o PAR e MFD da GM de vacas (MOLENAAR et al., 2020) e novilhas com menos de 2 meses (ESSELBURN et al., 2015) de idade e descreveram que a obtenção de medidas semanais de PAR por meio de US foi uma ferramenta quantitativa eficaz para medir alterações na área de PAR *in vivo*.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKERS, R. M. A 100-Year Review: Mammary development and lactation. *Journal of Dairy Science*, v. 100, p. 10332–10352, 2017.

ALBINO, R. L., MARCONDES, M. I., AKERS, R. M., DETMANN, E., CARVALHO, B. C., & SILVA, T. E. Mammary gland development of dairy heifers fed diets containing increasing levels of metabolisable protein: metabolisable energy. *Journal of Dairy Research*, v. 82, n. 01, p. 113–120, 2015. doi: 10.1017/s0022029914000697.

ALBINO, R. L., S. E. F. GUIMARÃES, K. M. DANIELS, M. M. S. FONTES, A. F. MACHADO, G. B. DOS SANTOS, M. I. MARCONDES. Mammary Gland Ultrasonography to Evaluate Mammary Parenchymal Composition in Prepubertal Heifers. *Journal of Dairy Science*, under review. JDS-16- 11668, 2016.

ALBINO, R. L., S. E. F. GUIMARAES, K. M. DANIELS, M. M. S. FONTES, A. F. MACHADO, G. B. DOS SANTOS, AND M. I. MARCONDES. Technical note: Mammary gland ultrasonography to evaluate mammary parenchymal composition in prepubertal heifers. *Journal of Dairy Science*, v. 100, p. 1588–1591, 2017.

ALEJANDRO, M., M. RODRÍGUEZ, C. PERIS, AND J. R. DÍAZ. Study of ultrasound scanning as method to estimate changes in teat thickness due to machine milking in Manchega ewes. *Small Ruminant Research*, v. 119, p. 138–145, 2014.

ANDRIGUETTO, J.M., PERLY, L., MINARDI, I., GEMAEL, A., FLEMMING, J.S., SOUZA, G.A., FILHO, A.B. Nutrição animal, as bases e os fundamentos da nutrição animal e os alimentos. Universidade Federal do Paraná. São Paulo: Editora Nobel, v. 1, p. 72-73, 1982.

BERNARD, L., LEROUX, C., CHILLIARD, Y. Characterisation and nutritional regulation of the main lipogenic genes in the ruminant lactating mammary gland. In: SEJRSEN, K.; HVELPLUND, T.; NIELSEN, M. O. (Eds.). *Rum. Physiology*. Academic, Wageningen, pp. 295–326, 2006.

BESSANI, D. T. C., HORSTMANN, R., LARSEN, R., PADILHA, C.G. RIBEIRO, C, V. D. M., OLIVEIRA, D. E. Combination of palmitic and stearic acids increases the expression of lipogenic genes in mammary gland explants of lactating ewes. *Small Ruminant Research*, v. 208, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2022.106634>.

BIONAZ, M.; THERING, B.J.; LOOR, J.J. Fine metabolic regulation in ruminants via nutrient–gene interactions: saturated long-chain fatty acids increase expression of genes involved in lipid metabolism and immune response partly through PPAR- α activation. *British Journal of Nutrition*, [s.l.], v. 107, n. 02, p. 179-191, 6 jul. 2011. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0007114511002777>.

BIONAZ, M. et al. Functional role of PPARs in ruminants: Potential targets for finetuning metabolism during growth and lactation. *PPAR Research*, v. 2013, 2013.

BOERMAN, J. P., J. L. FIRKINS, N. R. ST-PIERRE, AND A. L. LOCK. Intestinal digestibility of long-chain fatty acids in lactating dairy cows: A meta-analysis and meta regression. *Journal of Dairy Science*, v. 98, p. 8889–8903, 2015.

BOERMAN, J.P.; SOUZA J. DE; LOCK A.L. Milk production and nutrient digestibility responses to increasing levels of stearic acid supplementation of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, [s.l.], v. 100, n. 4, p. 2729-2738, American Dairy Science Association, 2017.

BRETHOUR, J. R. Relationship of ultrasound speckle to marbling score in cattle. *Journal of Animal Science*, v. 68, p. 2603–2613, 1990.

BROWN, E. G., M. J. VANDEHAAR, K. M. DANIELS, J. S. LIESMAN, L. T. CHAPIN, J. W. FORREST, R. M. AKERS, R. E. PEARSON, and M. S. WEBER NIELSEN. Effect of increasing energy and protein intake on mammary development in heifer calves. *Journal of Dairy Science*, v. 88, p. 595–603, 2005.

BRUCKMAIER, R. M., and J. W. BLUM. B-mode ultrasonography of mammary glands of cows, goats and sheep during alpha- and beta-adrenergic agonist and oxytocin administration. *Journal of Dairy Research*, v. 59, p. 151–159, 1992. <https://doi.org/10.1017/S0022029900030399>.

CASTILLO, V., SUCH, X., CAJA, G., SALAMA, A. A. K., ALBANELL, E., & CASALS, R. Changes in Alveolar and Cisternal Compartments Induced by Milking Interval in the Udder of Dairy Ewes. *Journal of Dairy Science*, v. 91, n. 9, p. 3403–3411, 2008. doi: 10.3168/jds.2008-1097.

CASTRO-CARRERA, T. et al. Dietary sunflower oil modulates milk fatty acid composition without major changes in adipose and mammary tissue fatty acid profile or related gene mRNA abundance in sheep. *Animal*, v. 9, n. 4, p. 582–591, 2015.

CHAMBERLAIN, M. B., & DEPETERS, E. J. Impacts of feeding lipid supplements high in palmitic acid or stearic acid on performance of lactating dairy cows. *Journal of Applied Animal Research*, 45, 126–135, 2017.

CHILLIARD, Y.; GLASSER, F.; FERLAY, A.; BERNARD, L.; ROUEL, J.; DOREAU, M. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, v. 109, p. 828–855, 2007.

DE AGUIAR, G. C., HORSTMANN, R., PADILHA, C.G., RIBEIRO, C. V. M., OLIVEIRA, D. E. Stearic acid does not overcome conjugated linoleic acid trans-10, cis-12-induced milk fat depression in lactating ewes. *Br J Nutr.*, 2022 Oct 27:1-7. doi: 10.1017/S000711452100430X.

DE SOUZA, J., & LOCK, A. L. Milk production and nutrient digestibility responses to triglyceride or fatty acid supplements enriched in palmitic acid. *Journal of Dairy Science*, 2019. doi: 10.3168/jds.2018-15690.

DE SOUZA, J. DE; PRESEAUULT, C.L.; LOCK, A.L.. Altering the ratio of dietary palmitic, stearic, and oleic acids in diets with or without whole cottonseed affects nutrient digestibility, energy partitioning, and production responses of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v. 101, n. 1, p. 172-185, jan. 2018. doi: 10.3168/jds.2017-13460.

DÍAZ, J. R., M. ALEJANDRO, C. PERIS, and N. FERNÁNDEZ. Use of ultrasound scanning to estimate teat wall thickness in Murciano Granadina goats. *Livest. Sci.*, v. 155, p. 114–122, 2013.

DONOHO, H. R. The association of immature bovine udder evaluations and subsequent milk and butterfat productions. PhD Thesis. The Ohio State University, Columbus, OH, 1955.

DOREAU, M., CHILLIARD, Y. Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals. *British Journal Of Nutrition*, v. 78, n. 1, p. 15-35, jan. 1997.

DRACKLEY, J. K. Lipid metabolism. In J. P. F. D'Mello (Ed.), *Farm Animal Metabolism and Nutrition* (pp. 97–119). CABI Publishing, New York, NY, 2000.

ELLIOT, G. M. Mammary gland development in the calf as a possible predictor of subsequent milk production. *J. Dairy Res.*, v. 24, p. 162–164, 1957.

ESSELBURN, K. M., HILL, T. M., BATEMAN, H. G., FLUHARTY, F. L., MOELLER, S. J., O'DIAM, K. M., & DANIELS, K. M. Examination of weekly mammary parenchymal area by ultrasound, mammary mass, and composition in Holstein heifers reared on 1 of 3 diets from birth to 2 months of age. *J. Dairy Sci.*, v. 98, n. 8, p. 5280–5293, 2015. doi: 10.3168/jds.2014-9061.

FASULKOV, I., GEORGIEV, P., WEHREND, A., & GOERICKE-PESCH, S. Ultrasonographic findings of pathological changes in the mammary gland in Bulgarian native goats. *Small Ruminant Research*, v. 120, n. 1, p. 174–180, 2014. doi: 10.1016/j.smallrumres.2014.05.

GONZALEZ-BARO, M. R. et al. REGULATION OF TRIGLYCERIDE METABOLISM II. function of mitochondrial GPAT1 in the regulation of triacylglycerol biosynthesis and insulin action. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 292, n. 5, p. 1195-1199, 2006.

HARFOOT, C. G., AND G. P. HAZLEWOOD. Lipid metabolism in the rumen. Pages 382–426 in *The Rumen Microbial Ecosystem*. P. N. Hobson and C. S. Stewart, ed. Chapman and Hall, London, UK, 1997.

HASLIN, E., CORNER-THOMAS, R. A., KENYON, P. R., MOLENAAR, A. J., MORRIS, S. T., & BLAIR, H. T. Mammary Gland Structures Are Not Affected by an Increased Growth Rate of Yearling Ewes Post-Weaning but Are Associated with Growth Rates of Singletons. *Animals*, v. 11, n. 3, p. 884, 2021. doi: 10.3390/ani11030884.

HOCQUETTE, J.F.; BAUCHART, D. Intestinal absorption, blood transport and hepatic and muscle metabolism of fatty acids in preruminant and ruminant animals. *Reprod. Nutr. Dev.*, v. 39, p. 27–48, 1999.

HORSTMANN, R.; AGUIAR, G.C. DE; RIBEIRO, C.V.D.M.; OLIVEIRA, D.E. Stearic acid (C18) reduces the expression of lipogenic genes and productivity in late lactating dairy ewes. *Small Ruminant Research*, v. 195, p. 1-5, 2021. doi: 10.1016/j.smallrumres.2020.106296.

JENSEN, R. G. The Composition of Bovine Milk Lipids: January 1995 to December 2002. *J. Dairy Sci.*, v. 85, n. 2, p. 295-350, 2002.

JENKINS, T. C., MCGUIRE, M. A. Major Advances in Nutrition: Impact on Milk Composition. *Journal Of Dairy Science*, v. 89, n. 4, p. 1-9, 2006.

LADEIRA, M.M.; SCHOONMAKER, J.P.; SWANSON, K.C.; DUCKETT, S.K.; GIONBELLI, M.P.; RODRIGUES, L.M.; TEIXEIRA, P.D. Review: Nutrigenomics of marbling and fatty acid profile in ruminant meat. *Animal*, v. 12, p. S282–S294, 2018.

LAMMERS, B. P., A. J. HEINRICHS, AND R. S. KENSINGER. The effects of accelerated growth rates and estrogen implants in pre-pubertal Holstein heifers on estimates of mammary development and subsequent reproduction and milk production. *J. Dairy Sci.*, v. 82, p. 1753–1764, 1999.

LAPID, K.; GRAFF, J.M. Formulation of adipocytes by lipids. *adipocyte*, v. 6, p. 176–186, 2017.

LOFTEN, J.R. et al. Palmitic and stearic acid metabolism in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v. 97, n. 8, p. 4661-4674, 2014. doi: 10.3168/jds.2014-7919.

MOLENAAR, A. J., THOMPSON, B., WALL, A., MCCOARD, S., LEATH, S. R., MCKENZIE, C., et al. The use of ultrasonography to examine mammary gland development in ewe lambs with different live weight–gain profiles between 12 and 20 weeks of age. *Journal of Animal Science*, v. 95 (suppl_4), p. 368–369, 2017. doi: 10.2527/asasann.2017.862.

MOLENAAR, A. J., MACLEAN, P. H., GILMOUR, M. L., DRAGANOVA, I. G., SYMES, C. W., MARGERISON, J. K., & MCMAHON, C. D. Effect of whole-milk allowance on liveweight gain and growth of parenchyma and fat pads in the mammary glands of dairy heifers at weaning. *Journal of Dairy Science*, v. 103, n. 6, p. 5061–5069, 2020. doi: 10.3168/jds.2019-17126.

MORAN, C., J. F. QUIRKE, D. J. PRENDIVILLE, S. BOURKE, AND J. F. ROCHE. The effect of estradiol, trenbolone acetate, or zeranol on growth-rate, mammary development, carcass traits, and plasma estradiol concentrations of beef heifers. *J. Anim. Sci.*, v. 69, p. 4249–4258, 1991.

NISHIMURA, M., T. YOSHIDA, S. EL-KHODERY, M. MIYOSHI, H. FURUOKA, J. YASUDA, AND K. MIYAHARA. Ultrasound imaging of mammary glands in dairy heifers at different stages of growth. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 73, p. 19–24, 2011. doi: 10.1292/jvms.09-0503.

NUDDA, A., PULINA, G., VALLEBELLA, R., BENCINI, R., & ENNE, G. Ultrasound technique for measuring mammary cistern size of dairy ewes. *Journal of Dairy Research*, v. 67, n. 1, p. 101–106, 2000. doi: 10.1017/s0022029999003921.

OCKNER, R. K., PITTMAN, J. P., YAGER, J. L. Differences in the intestinal absorption of saturated and unsaturated long chain fatty acids. *Gastroenterology*, 62(981-992), 1972. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(72\)80115-X](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(72)80115-X)

PALMQUIST, D., LOOK, A. L., SHINGFIELD, K. J., BAUMAN, D. E.. Biosynthesis of conjugated Linoleic Acid in Ruminants and Humans. *Advances In Food And Nutrition Research*, p. 179-217, 2005.

PANTOJA, J., FIRKINS, J. L., EASTRIDGE, M. L.. Site of digestion and milk production by cows fed fats differing in saturation, esterification, and chain length. *J. Dairy Sci.*, v. 78, p. 2247–2258, 1995.

PANTOJA, J., FIRKINS, J. L., & EASTRIDGE, M. L. Fatty acid digestibility and lactation performance by dairy cows fed fats varying in degree of saturation and different fiber sources. *Journal of Dairy Science*, 79, 429–437, 1996.

PIANTONI, P.; LOCK, A. L.; ALLEN, M. S.. Milk production responses to dietary stearic acid vary by production level in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, v. 98, n. 3, p. 1938-1949, 2015. doi: 10.3168/jds.2014-7919.

RICO, J. E.; ALLEN, M.S.; LOCK, A.L.. Compared with stearic acid, palmitic acid increased the yield of milk fat and improved feed efficiency across production level of cows. *J. Dairy Sci.*, v. 97, n. 2, p. 1057-1066, 2014. doi: 10.3168/jds.2013-7432.

RICO, J. E. et al. Nutrient digestibility and milk production responses to increasing levels of palmitic acid supplementation vary in cows receiving diets with or without whole cottonseed. *J. Anim. Sci.*, 2017.

RICO, D. E.; PARALES, J. E.; CORL, B. A.; LENGI, A.; CHOUINARD, P. Y.; GERVAIS, R. Abomasally infused SFA with varying chain length differently affect milk production and composition and alter hepatic and mammary gene expression in lactating cows. *British J. Nutrition*, v. 124, n. 4, p. 386-395, 2020. doi: 10.1017/s0007114520000379.

ROVAI, M., CAJA, G., & SUCH, X. Evaluation of Udder Cisterns and Effects on Milk Yield of Dairy Ewes. *Journal of Dairy Science*, v. 91, n. 12, p. 4622–4629, 2008. doi: 10.3168/jds.2008-1298.

ROWSON, A. R., K. M. DANIELS, S. E. ELLIS, and HOVEY, R. C.. Growth and development of mammary glands of livestock: A veritable barnyard of opportunities. *Semin. Cell Dev. Biol.*, v. 23, p. 557–566, 2012.

SAMPATH, H., NTAMBI, J. M.. The Fate and Intermediary Metabolism of Stearic Acid. *Symposium On Dietary Stearic Acid*, v. 40, n. 12, p. 1-5, dez. 2005.

SHINDOU, H. et al. Recent progress on acyl CoA: lysophospholipid acyltransferase research. *Journal of Lipid Research*, v. 50, n., p. 46-51, 17 out. 2008.

SHI, H. et al. PPAR γ regulates genes involved in triacylglycerol synthesis and secretion in mammary gland epithelial cells of dairy goats. *PPAR Research*, v. 2013, 2013.

SHINGFIELD, K. J. ET AL. Role of trans fatty acids in the nutritional regulation of mammary lipogenesis in ruminants. *Animal*, v. 4, n. 07, p. 1140-1166, 14 abr. 2010. doi: 10.1017/s1751731110000510.

SOBERON, F., AND M. E. VAN AMBURGH. Lactation Biology Symposium: The effect of nutrient intake from milk or milk replacer of preweaned dairy calves on lactation milk yield as adults: A meta-analysis of current data. *J. Anim. Sci.*, v. 91, p. 706–712, 2013. doi: 10.2527/jas.2012-5834.

STEELE, W., MOORE, J. H. The effects of a series of saturated fatty acids in the diet on milk-fat secretion in the cow. *Journal Dairy Research.*, v. 35, p. 361–370, 1968.

TORAL, P. G., HERVÁS, G., CARREÑO, D., P. FRUTOS. Does supplemental 18:0 alleviate fish oil-induced milk fat depression in dairy ewes? *Journal Of Dairy Science*, v. 99, n. 2, p. 1-13, dez. 2016.

URRUTIA, O., MENDIZABAL, J. A., ALFONSO, L., SORET, B., INSAUSTI, K., & ARANA, A. Adipose Tissue Modification through Feeding Strategies and Their Implication on Adipogenesis and Adipose Tissue Metabolism in Ruminants. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 9, p. 3183, 2020.

VELASCO, S., CAÑEQUE, V., PÉREZ, C., LAUZURICA, S., DÍAZ, M. T., HUIDOBRO, F., GONZÁLEZ, J. Fatty acid composition of adipose depots of suckling lambs raised under different production systems. *Meat Science*, v. 59, n. 3, p. 325–333, 2001. doi: 10.1016/s0309-1740(01)00135-8.

VERNON, R.G., 2002. Nutrient partitioning, lipid metabolism and relevant imbalances. In: Kaske, M., Scholz, H., Höltershinken, M. (Eds.), *Recent Developments and Perspectives in Bovine Medicine*. Klinik für Rinderkrankheiten, Hanover, pp. 210–223.

VETTER, A. H., A. VAN DORLAND, M. YOUSSEF, and R. M. BRUCKMAIER. Effects of a latency period between pre-stimulation and teat cup attachment and periodic vacuum reduction on milking characteristics and teat condition in dairy cows. *J. Dairy Res.*, v. 81, p. 107–112.

WEISS, W. P., PINOS-RODRÍGUEZ, J. M., & WYATT, D. J. The value of different fat supplements as sources of digestible energy for lactating dairy cows¹. *Journal of Dairy Science*, v. 94, n. 2, p. 931–939, 2011. doi: 10.3168/jds.2010-3745.

WILLIAMS, A. R. Ultrasound applications in beef cattle carcass research and management. *J. Anim. Sci.*, v. 80, p. E183–E185, 2002.

YOUSUF, M.B., ADELOYE, A., OKUKPE, K.M., ADEYEMI. K.D., BADMOS. A.H.A., OGUNDUN, N.J. Growth performance characteristics of goats fed varied levels of poultry manure in whole cassava plant based concentrate diet. *Asian Journal of Agricultural and Rural Development*, v. 3, p. 823–828, 2013.

YOUSUF, M.B., ADELOYE, A.A., OKUKPE, K.M., ADEYEMI, K.D., OGUNDUN, N.J. Influence of dietary sunflower (*tithonia diversifolia*) leaf extracts on performance characteristics of goats fed cassava peeling wastes-based diet. *Journal of Agricultural Technology*, v. 10, p. 59–65, 2014.

4. HIPÓTESE

4.1. *Geral*

Apesar da possível baixa digestibilidade, a fração de ácido esteárico absorvida é capaz de atuar na síntese lipídica da glândula mamária e do tecido adiposo de cordeiras nulíparas.

4.2. *Específicas*

- O ácido esteárico aumenta a deposição de gordura na glândula mamária de cordeiras nulíparas;
- A suplementação com ácido esteárico altera o perfil de ácidos graxos e a expressão de genes envolvidos na síntese lipídica do tecido adiposo de cordeiras nulíparas;

5. OBJETIVO

5.1. *Geral*

Avaliar a digestibilidade do ácido esteárico e o efeito na deposição de gordura na glândula mamária e tecido adiposo de cordeiras nulíparas.

5.2. *Específicas*

- Avaliar a gordura da glândula mamária de cordeiras nulíparas através de ultrassonografia;
- Avaliar o efeito do ácido esteárico na deposição de gordura na glândula mamária de cordeiras nulíparas;
- Analisar o perfil de ácidos graxos e a expressão de genes lipogênicos no tecido adiposo de cordeiras nulíparas;
- Verificar a digestibilidade de um suplemento rico em ácido esteárico com a inclusão de 1,5% na dieta de ovelhas.

CAPÍTULO I

6. NOTA TÉCNICA: AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA DA DEPOSIÇÃO DE TECIDO ADIPOSEO NA GLÂNDULA MAMÁRIA DE CORDEIRAS NULÍPARAS

6.1. RESUMO

O período entre o nascimento e a puberdade pode ser fundamental no desenvolvimento da glândula mamária (GM), assim como na futura produção de leite, sendo esta afetada negativamente principalmente se o tecido adiposo (*mammary fat pad* - MFP) for em maior proporção, quando comparado com o parênquima (PAR). Atualmente, buscando métodos não invasivos, o uso de técnicas de imagem demonstra auxiliar na avaliação do desenvolvimento da GM em animais vivos. O objetivo deste estudo foi avaliar, através de ultrassonografia, a deposição de tecido adiposo na GM de cordeiras nulíparas ao longo do tempo. Foram utilizadas 4 cordeiras (50 % Lacaune x 50% Texel), com 5 meses de vida e peso vivo inicial de $34,9 \pm 3,7$ kg. O experimento durou 77 dias e os animais foram submetidos a ultrassom da GM 1 vez por semana. As imagens foram realizadas em cada lado da GM, selecionadas por qualidade de definição e comparadas através de escalas de cores, calculando o número de “pixels” correspondente à ecogenicidade das estruturas. A análise estatística foi realizada pelo SAS (OnDemand for Academics) através do PROC MIXED onde cada animal foi considerado como um bloco, considerou-se como tratamento o período (semana) e a GM (esquerda e direita) foi considerada parcela subdividida. Não houve efeito do tempo (semanas; $P = 0,31$), de GM ($P = 0,89$) ou entre os animais ($P = 0,11$) sobre o MFP. Houve efeito na ecogenicidade entre as áreas analisadas ($P = 0,0001$), indicando que o MFP se desenvolve sem um padrão específico. Em conclusão, a ultrassonografia pode ser útil na avaliação da GM de cordeiras identificando áreas de tecido adiposo (MFP) e parênquima (PAR).

Palavras-chave: ovinos; diagnóstico por imagem; úbere.

6.2. ABSTRACT

The period between birth and puberty can be crucial for mammary gland (MG) development, as well as for future milk production, which is negatively affected mainly if the mammary fat pad (MFP) is in a higher proportion compared to the parenchyma (PAR). Currently, in the search for non-invasive methods, the use of imaging techniques has proven helpful in evaluating MG development in living animals. The objective of this study was to evaluate, through ultrasonography, adipose tissue deposition in the MG of nulliparous sheep over time. Four ewe lambs (50 % Lacaune x 50% Texel), 5 months old with an initial live weight of 34.9 ± 3.7 kg, were used. The experiment lasted 77 days, and the animals underwent MG ultrasound once a week. Images were taken on each side of the MG, selected based on definition quality, and compared using color scales, calculating the number of pixels corresponding to the echogenicity of the structures. Statistical analysis was performed by SAS (OnDemand for Academics) through PROC MIXED and each animal was considered as a block, the period (week) was considered as treatment and GM (left and right) was considered a subdivided plot. There was no effect of time (weeks; $P = 0.31$), MG ($P = 0.89$), or between animals ($P = 0.11$) on the MFP. There was an effect on echogenicity between the analyzed areas ($P = 0.0001$), indicating that the MFP develops without a specific pattern. In conclusion, ultrasound can be useful in evaluating the MG of ewe lambs by identifying areas of adipose tissue (MFP) and parenchyma (PAR).

Keywords: sheep; imaging diagnosis; udder

6.3. INTRODUÇÃO

A glândula mamária (GM) é formada por dois tipos principais de tecido que exercem funções diferentes. As estruturas do PAR atuam na produção e secreção do leite e o *mammary fat pad* (MFP) auxilia principalmente no suporte e formato da glândula mamária (ESSELBURN et al., 2015). Elevadas taxas de crescimento da GM, especialmente o MFP, anteriores à puberdade, podem exercer um impacto adverso na futura produção de leite devido à diminuição da

idade de puberdade, da primeira parição, resultante do acelerado crescimento além de imaturidade associada ao tecido mamário (MOLENNAR et al., 2017). Isso ocorre porque as dimensões do MFP determinam a área máxima de PAR podendo indicar o potencial de produção final da GM (MOLENNAR et al., 2017).

Diversas técnicas vêm sendo utilizadas para avaliação da GM, tais como, o abate de animais para avaliação histológica e morfológica (BROWN et al., 2005; ESSELBURN et al., 2015; ALBINO et al., 2016) e avaliações *in vivo* de áreas, diâmetros e circunferências de tetos, canais dos tetos e cisterna da GM (MORAN et al., 1991; LAMMERS et al., 1999). Atualmente, métodos não invasivos são bem vistos na experimentação animal e têm sido defendidos por comitês de ética. Com isso, técnicas que auxiliem na avaliação de animais vivos como a ultrassonografia (ESSELBURN et al., 2015; SILVA et al., 2018; MOLENAAR et al. 2020) tem sido utilizadas.

Devido a diferença na forma como a gordura e o músculo refletem ondas de ultrassom (BRETHOUR, 1990), alguns estudos que buscaram entender a proporção de PAR e MFP foram realizados em vacas recém paridas (MOLENAAR et al., 2020), novilhas pré-púberes (ALBINO et al., 2016), bezerras (ESSELBURN et al., 2015) e ovelhas adultas (HASLIN et al., 2021).

Pelo conhecimento destes autores, até o momento, nenhum estudo analisou o MFP de cordeiras com auxílio do ultrassom, além de serem escassas as pesquisas que utilizam ultrassonografia para examinar a GM do mesmo animal de forma repetida. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar ao longo do tempo, através de US, o acúmulo de gordura na GM de cordeiras pré-púberes.

6.4. MATERIAIS E MÉTODOS

6.4.1. Desenho experimental, animais e tratamentos

O estudo foi desenvolvido no Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (latitude: 27°47'32" S e longitude 50°18'23" W) e todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética, sob o protocolo nº 8029060422. O experimento teve duração de 77 dias e os animais foram submetidos à ultrassonografia semanal para avaliação da gordura

da GM. Foram utilizadas 4 cordeiras (50% Lacaune x 50% Texel), com 5 meses de idade, $34,9 \pm 3,7$ kg de peso vivo (PV), nulíparas mantidas em baia coletiva.

6.4.2. Dieta e manejo

Todos os animais tiveram acesso *ad libitum* à água. A silagem de milho foi fornecida por baia e o concentrado de forma individual, de acordo com o SRNS (TEDESCHI et al., 2010), Tabela 1. A dieta foi ajustada a cada 21 dias conforme o desenvolvimento dos animais, fornecida duas vezes ao dia em 110% do consumo voluntário estimado de matéria seca. As amostras de silagem, concentrado e sobras foram coletadas a cada 21 dias do período experimental e em seguida se fez uma amostra composta de cada para posterior análise bromatológica.

A pesagem e avaliação de escore de condição corporal (ECC) dos animais foi realizada a cada 21 dias. O ECC foi realizado por apenas um avaliador treinado, usando a escala de 1 a 5, onde 1 são animais muito magros e 5 excessivamente gordos.

Tabela 1. Ingredientes e composição da dieta experimental.

Item	% de MS
Ingredientes	
Silagem de milho	59,8
Milho moído	17,6
Farelo de soja	17,6
Caulim	3,5
Núcleo Mineral/ vitamínico	1,5
Composição química, % de MS	
MS ¹	88,5
PB ²	14,4
FDN ³	44,4
CNE ⁴	29,5
Matéria mineral	9,2
Extrato etéreo	3,6
AG totais ⁵	2,27
EM ⁶ (Mcal/kg)	2,35
CMS estimado (kg/d)	1,42

¹Matéria seca; ²Proteína bruta; ³Fibra em detergente neutro; ⁴Carboidratos não estruturais; ⁵Ácidos graxos totais estimados de acordo com NASEM (2021); ⁶Energia metabolizável.

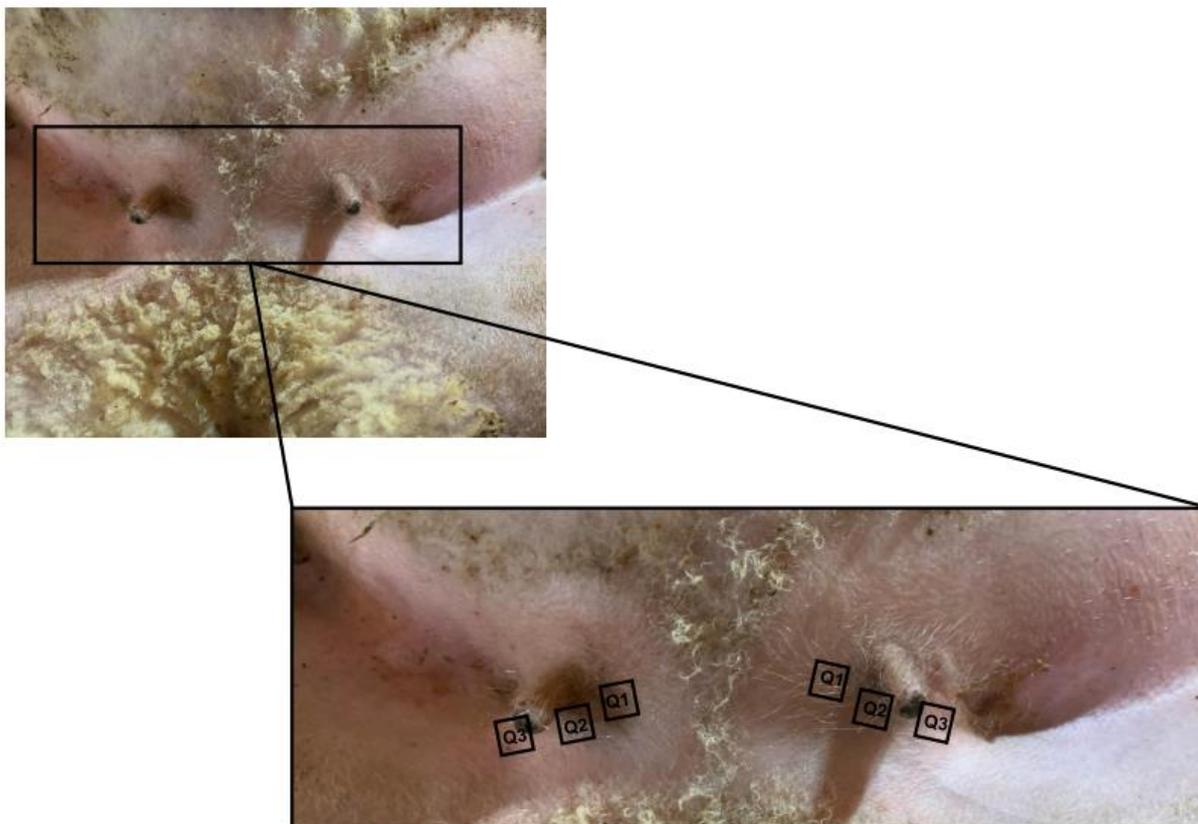
6.4.3. *Análise ultrassonográfica*

As imagens por ultrassom foram obtidas uma vez por semana, durante 11 semanas, sempre pelo mesmo avaliador treinado, utilizando um aparelho equipado com transdutor linear a uma frequência de 6,5 MHz.

Para a avaliação da GM (direita e esquerda) os animais foram postos em macas imobilizadoras (em ângulo de 120°) e mantidos em decúbito apropriado. O transdutor do ultrassom foi padronizado com inclinação de 45° em relação à posição do teto (ALBINO et al., 2015), sempre no sentido caudo-cranial (NISHIMURA et al., 2011; Figura 1) e gel de ultrassom foi colocado em cada glândula para assegurar o contato entre a sonda e a pele dos animais e consequentemente melhorar a qualidade da visualização das estruturas. Sempre que necessário foi realizada tricotomia na região avaliada. Essa metodologia, adaptada conforme descrito por Nishimura et al. (2011) e Albino et al. (2015), foi testada e ajustada durante 4 semanas anteriores ao período experimental.

Em toda avaliação, no mínimo três imagens foram obtidas em cada lado da GM dos animais, totalizando 264 imagens ao longo do estudo.

Figura 1. Posição do transdutor do ultrassom em relação aos quadros analisados.



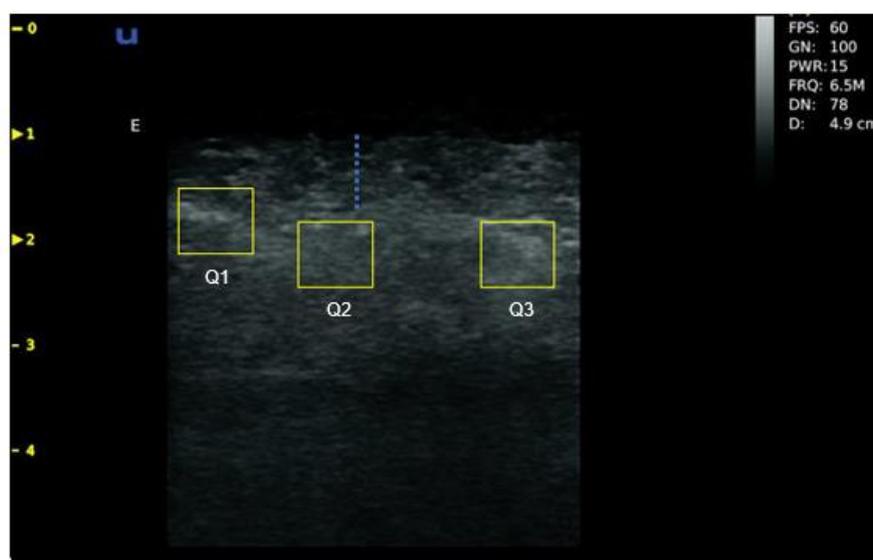
6.4.4. Avaliação das imagens de ultrassom através do ImageJ

As imagens foram avaliadas e selecionadas por qualidade de definição das estruturas, gerando um total de 88 imagens analisadas (22 imagens/animal/período experimental - 2 imagens/animal/semana). Comparou-se a escala de cores pelo software ImageJ (National Institutes of Health, Rockville Pike MD, EUA), analisando as imagens obtidas em escala de cinza, calculando a área e o número de “pixels” (National Institutes of Health, 2013). O brilho de cada pixel corresponde a ecogenicidade e foi representada em uma escala de 255 níveis de cinza gerando valores numéricos (de 0 – preto absoluto a 255 – branco máximo).

Nas duas imagens selecionadas de cada animal (uma de cada GM), o PAR foi identificado como a região mais hipocóica; e a MFP como a região mais hipercóica. Dentro da área de predominância de MFP, três pontos (6 mm²) pré-determinados aleatoriamente foram demarcados na imagem (Figura 2) para se realizar a leitura de pixel (adaptado de ALBINO et al., 2016; SILVA et al., 2018 e

HASLIN et al., 2021) no ImageJ. Cada um desses pontos foi identificado, conforme posição, sendo o quadro 1 (Q1) a área mais a esquerda, o quadro 2 (Q2) área central e o quadro 3 (Q3) a área mais à direita demarcada na imagem. Em termos de posicionamento do transdutor do ultrassom no animal, a área Q1 refere-se à parte mais medial da GM e a área de Q3 à porção mais lateral de cada GM. Em seguida se fez a média desses três pontos e todas as imagens foram avaliadas da mesma forma.

Figura 2. Pontos analisados na glândula mamária.



Cada quadrado mede 6 mm² e foram determinados aleatoriamente em possíveis áreas de “fatpad”; a linha tracejada indica área identificada como parênquima.

6.4.5. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o SAS (OnDemand for Academics) através do procedimento MIXED e a significância considerada quando $P < 0,05$. O delineamento experimental foi realizado através de blocos casualizados e os dados utilizados foram as médias de pixel das três áreas avaliadas. Cada animal foi considerado como um bloco, considerou-se como tratamento operíodo (semana) e a GM (esquerda e direita) foi considerada parcela subdividida. Os resíduos estudentizados fora do intervalo ± 3 foram considerados outliers e excluídos da análise estatística.

Os valores da escala de cinza da gordura da GM e os dados de consumo e desempenho foram analisados por modelos lineares mistos como medidas repetidas no tempo. Interações pré-estabelecidas foram testadas (semana x GM) e a normalidade dos dados foi confirmada através do teste de Shapiro-Wilk.

6.5. RESULTADOS

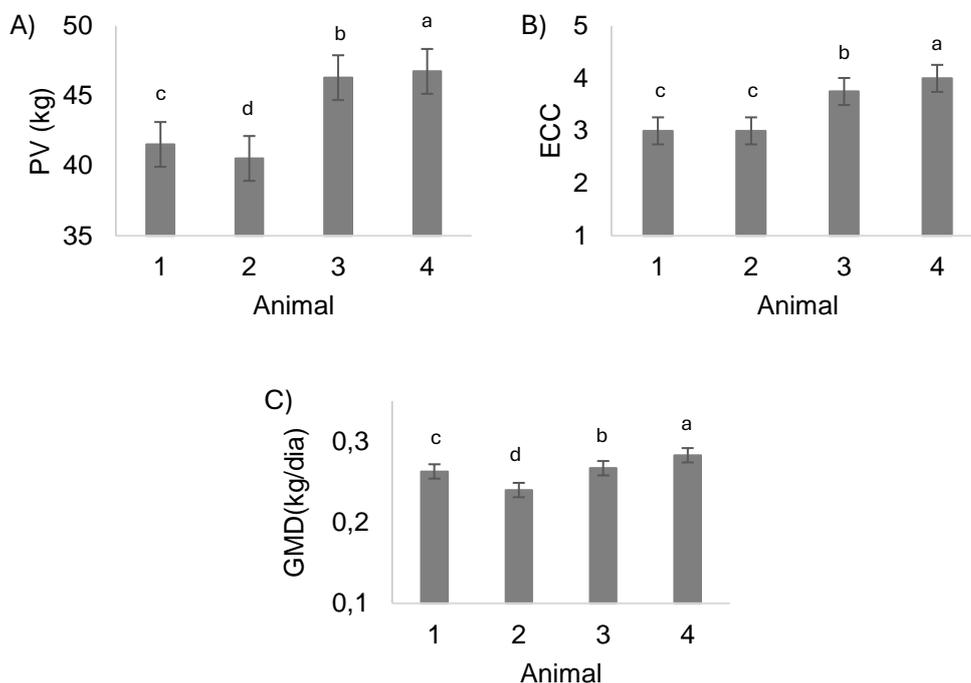
6.5.1. *Consumo de matéria seca e desempenho animal*

A silagem foi fornecida de forma conjunta, não sendo possível medir quanto cada animal ingeriu. No entanto, dividiu-se o consumo total de silagem por quatro animais obtendo o consumo estimado provável por cada cordeira. O consumo de matéria seca (CMS) total ($P = 0,99$), a ingestão total de energia metabolizável (EM; $P = 0,99$) e de proteína metabolizável ($P = 0,99$) não diferiram entre os animais.

O consumo individual de concentrado ($P = 0,61$), de energia ($P = 0,59$) e proteína ($P = 0,60$) metabolizável do concentrado não diferiu entre os animais.

A média do PV e do ECC (Figura 3A e 3B) dos animais a cada 21 dias e o ganho médio diário (GMD) diferiram ($P = 0,0001$; Figura 3C).

Figura 3. Média do peso vivo (kg), escore de condição corporal e ganho diário médio (kg/dia) das cordeiras ao longo do período experimental.



6.5.2. Avaliação ultrassonográfica da glândula mamária

Não houve diferença entre semanas ($P = 0,31$; Figura 4) e entre animais ($P = 0,11$; Figura 5) sobre a composição tecidual da GM das cordeiras, sendo a média de pixels observada ao longo do tempo de $47,8 \pm 7,3$.

Figura 4. Escala de cinza semanal da glândula mamária de cordeiras avaliadas por ultrassom.

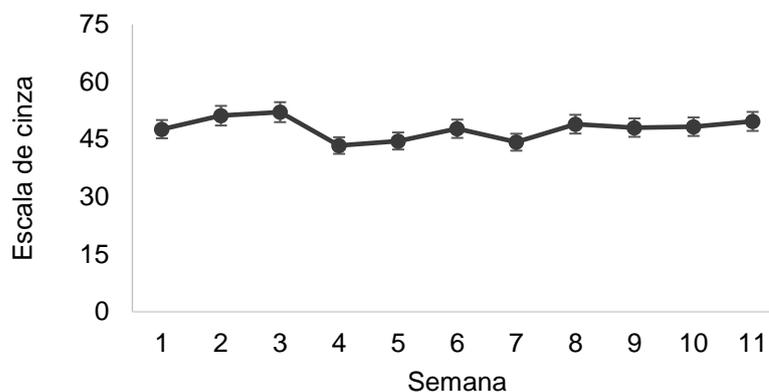
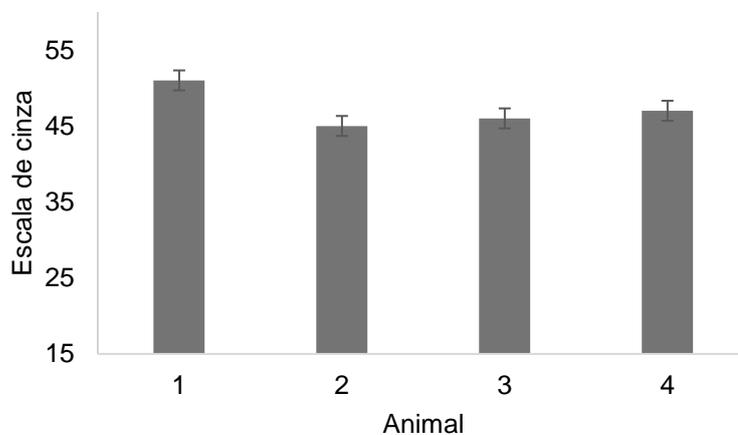
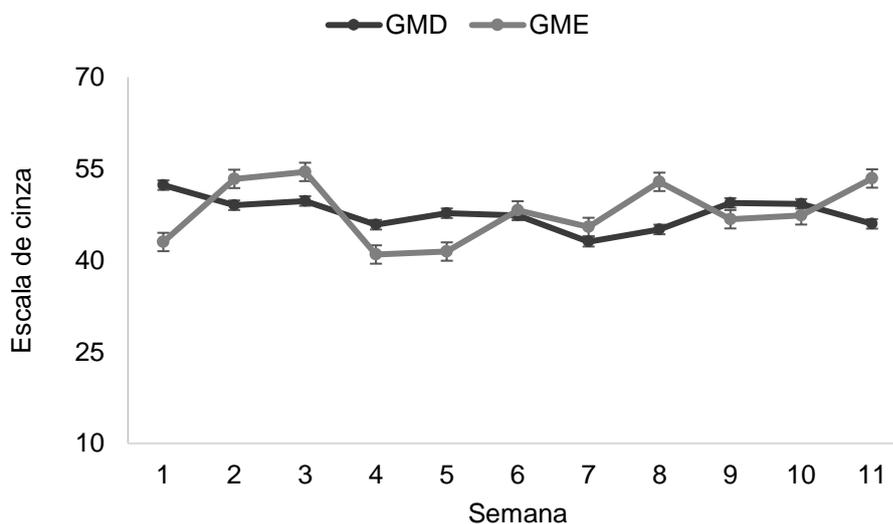


Figura 5. Escala de cinza da glândula mamária de cordeiras avaliadas por ultrassom.



Não houve diferença de deposição de gordura entre o lado direito e esquerdo da GM ($P = 0,89$; Figura 6). A média, ao longo do tempo, na escala de pixels da GM direita (GMD) foi $47,7 \pm 6,7$ e da esquerda (GME) $47,9 \pm 8,0$.

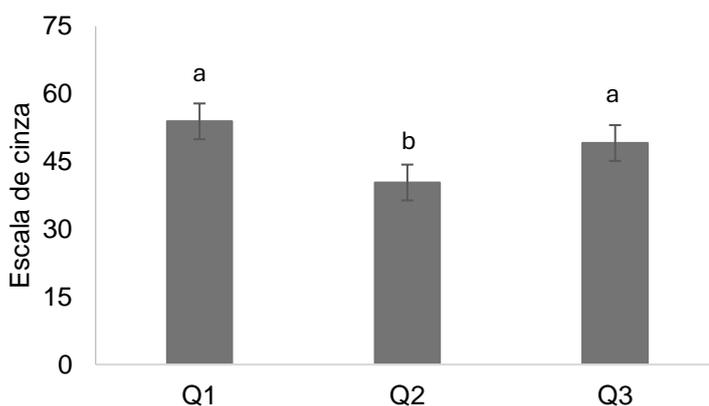
Figura 6. Escala de cinza da glândula mamária direita e esquerda de cordeiras avaliadas por ultrassom.



Em seguida, para verificar se determinada área da GM possui maior deposição de MFP ou PAR, realizou-se a avaliação de cada um dos quadros pré-determinados para leitura de pixel e observou-se que houve diferença de ecogenicidade entre os quadros analisados ($P = 0,0001$). As médias de pixel obtidas em cada quadro foram avaliadas para identificar qual região da GM

poderia depositar mais gordura ou PAR e observou-se que a área do Q2 (escala de cinza de $40,4 \pm 12,1$) demonstra ser o local com menor deposição de gordura ($P = 0,0001$; Figura 7), comparado com Q1 (escala de cinza de $53,9 \pm 12,9$) e Q3 (escala de cinza de $49,1 \pm 11,3$).

Figura 7. Escala de cinza em cada área analisada da glândula mamária de cordeiras avaliada por ultrassom.



6.6. DISCUSSÃO

Até onde sabemos, o presente estudo descreve pela primeira vez os padrões ultrassonográficos da GM de cordeiras em fase pré-púbere ao longo do tempo.

Observamos que nenhum animal depositou mais gordura na GM ao longo do tempo (Figura 5), apesar da diferença entre PV, ECC e GMD (Figura 3), o que sugere que por estarem na fase alométrica do desenvolvimento da GM essa variação no desempenho dos animais não afetou a composição da GM.

Além disso, a ausência de maior deposição de gordura na GM dos animais com maior PV e ECC pode demonstrar que nessa fase da vida a deposição de gordura não ocorra preferencialmente na GM, e sim em outras regiões devido a fase de desenvolvimento corporal. Ainda, apesar da mamogênese englobar o desenvolvimento do PAR e MFP desde fase embrionária, é necessário considerar que a mamogênese fetal, pré-púbere e púbere são inferiores quando comparadas com a fase gestacional (ESSELBURN et al., 2015), justificando a ausência de efeitos.

Observamos que os animais com maior PV e maior ECC não demonstraram maiores proporções de gordura na GM, o que pode ser considerado benéfico pois altas taxas de crescimento da GM, principalmente MFP, antes da puberdade podem ter uma influência negativa na produção futura de leite causada pela redução da idade de puberdade e primeira parição, alcançada pela aceleração do crescimento e imaturidade associada do tecido mamário (MOLENNAR et al., 2017). Além disso, o tamanho do MFP determina a área máxima de PAR e com isso, pode indicar o potencial final de produção da GM (MOLENNAR et al., 2017).

Ainda, o fato de todos os animais receberem a mesma dieta e não demonstrarem diferença no consumo de MS, EM e PB individual oriundo do concentrado pode ter ocasionado a ausência na diferença da composição da GM entre os animais, diferente dos estudos que buscaram entender a proporção de PAR e MFD realizados em vacas (ALBINO et al., 2016; MOLENAAR et al., 2020; HASLIN et al., 2021) e ovelhas (ESSELBURN et al., 2015) com o objetivo de analisar o efeito da dieta sobre desenvolvimento da GM, uma vez que a alimentação entre o nascimento e a puberdade demonstra alterar o crescimento mamário.

Neste estudo observamos que a ultrassonografia possui algumas limitações, principalmente relacionado a sua característica subjetiva. Uma delas quando aplicada em cordeiras em crescimento é que as imagens de ultrassom não nos permitiram distinguir com exatidão as áreas delimitadas entre PAR e MFP, apesar de haver diferenciação na ecogenicidade das estruturas observadas nas imagens. Essa limitação pode ter ocorrido devido a fase de vida dos animais, tendo em vista que a GM ainda possui tamanho relativamente pequeno. Da mesma forma, Albino et al., (2016) comentaram que nas imagens de ultrassom não foi possível distinguir entre o tecido do ducto epitelial e os lúmens do ducto dentro do PAR e por isso ambos foram observados como características hipocóicas (pretas) em comparação com a gordura mamária circundante.

Apesar das limitações, observamos que existe diferença na deposição de gordura entre as áreas analisadas em todos os animais, o que sugere que em estudos futuros a área Q2 deva ser evitada como uma região preferencial de avaliação quando o objetivo for avaliar MFP (Figura 1). Assim, é possível considerar que avaliar várias áreas aleatórias na região de interesse pode ser

uma opção válida para mensuração dos componentes da GM, uma vez que não parece existir um padrão na deposição de gordura na GM de cordeiras pré-púberes.

Além disso, a técnica utilizada demonstra ser eficiente pois durante o processo de repetibilidade semanal a ecogenicidade das áreas manteve uma constância entre os animais, indicando que os achados são ocorrem ao acaso e que a técnica pode auxiliar na identificação dos tecidos da GM.

6.7. CONCLUSÃO

A técnica de ultrassonografia pode ser utilizada para avaliação do MFP da GM de cordeiras nulíparas e a ferramenta de leitura de pixel foi essencial por permitir que a ecogenicidade das áreas fossem melhor analisadas.

6.8. REFERÊNCIAS

ALBINO, R.L., GUIMARÃES, S.E.F., DANIELS, K.M., FONTES, M.M.S., MACHADO, A.F., DOS SANTOS, G.B., MARCONDES, M.I. Mammary Gland Ultrasonography to Evaluate Mammary Parenchymal Composition in Prepubertal Heifers. *J. Dairy Sci.*, v. 100, p. 1588–1591, 2017.

ALBINO, R.L., MARCONDES, M.I., AKERS, R.M., DETMANN, E., CARVALHO, B.C., SILVA, T.E. Mammary gland development of dairy heifers fed diets containing increasing levels of metabolisable protein: metabolisable energy. *Journal of Dairy Research*, v. 82, n. 01, p. 113–120, 2015. doi:10.1017/s0022029914000697.

BRETHOUR, J.R. Relationship of ultrasound speckle to marbling score in cattle. *J. Anim. Sci.*, v. 68, p. 2603–2613, 1990.

BROWN, E.G., VANDEHAAR, M.J., DANIELS, K.M., LIESMAN, J.S., CHAPIN, L.T., FORREST, J.W., AKERS, R.M., PEARSON, R.E., WEBER NIELSEN, M.S. Effect of increasing energy and protein intake on mammary development in heifer calves. *J. Dairy Sci.*, v. 88, p. 595-603, 2005.

ESSELBURN, K.M., HILL, T.M., BATEMAN, H.G., FLUHARTY, F.L., MOELLER, S.J., O'DIAM, K.M., DANIELS, K.M. Examination of weekly mammary parenchymal area by ultrasound, mammary mass, and composition in Holstein heifers reared on 1 of 3 diets from birth to 2 months of age. *J. Dairy Sci.*, v. 98, n. 8, p. 5280-5293, 2015. doi:10.3168/jds.2014-9061.

HASLIN, E., CORNER-THOMAS, R.A., KENYON, P.R., MOLENAAR, A.J., MORRIS, S.T., BLAIR, H.T. Mammary Gland Structures Are Not Affected by an Increased Growth Rate of Yearling Ewes Post-Weaning but Are Associated with Growth Rates of Singletons. *Animals*, v. 11, n. 3, p. 884, 2021. doi:10.3390/ani11030884.

LAMMERS, B.P., HEINRICHS, A.J., KENSINGER, R.S. The effects of accelerated growth rates and estrogen implants in pre-pubertal Holstein heifers on estimates of mammary development and subsequent reproduction and milk production. *J. Dairy Sci.*, v. 82, p. 1753-1764, 1999.

MOLENAAR, A.J., THOMPSON, B., WALL, A., MCCOARD, S., LEATH, S.R., MCKENZIE, C., ... STEVENS, D. The use of ultrasonography to examine mammary gland development in ewe lambs with different live weight–gain profiles between 12 and 20 weeks of age. *Journal of Animal Science*, v. 95 (suppl_4), p. 368–369, 2017. doi:10.2527/asasann.2017.862.

MOLENAAR, A.J., MACLEAN, P.H., GILMOUR, M.L., DRAGANOVA, I.G., SYMES, C.W., MARGERISON, J.K., MCMAHON, C.D. Effect of whole-milk allowance on liveweight gain and growth of parenchyma and fat pads in the mammary glands of dairy heifers at weaning. *Journal of Dairy Science*, v. 103, n. 6, p. 5061-5069, 2020. doi:10.3168/jds.2019-17126.

MORAN, C., QUIRKE, J.F., PRENDIVILLE, D.J., BOURKE, S., ROCHE, J.F. The effect of estradiol, trenbolone acetate, or zeranol on growth-rate, mammary development, carcass traits, and plasma estradiol concentrations of beef heifers. *J. Anim. Sci.*, v. 69, p. 4249-4258, 1991.

NISHIMURA, M., YOSHIDA, T., EL-KHODERY, S., MIYOSHI, M., FURUOKA, H., YASUDA, J., MIYAHARA, K. Ultrasound imaging of mammary glands in dairy heifers at different stages of growth. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 73, p. 19-24, 2011. <https://doi.org/10.1292/jvms.09-0503>.

SILVA, A.L., DETMANN, E., DIJKSTRA, J., PEDROSO, A.M., SILVA, L.H.P., MACHADO, A.F., MARCONDES, M.I. Effects of rumen-undegradable protein on intake, performance, and mammary gland development in prepubertal and pubertal dairy heifers. *Journal of Dairy Science*, v. 101, n. 7, p. 5991-6001, 2018. doi:10.3168/jds.2017-13230.

TEDESCHI, L.O., CANNAS, A., FOX, D.G. A nutrition mathematical model to account for dietary supply and requirements of energy and other nutrients for domesticated small ruminants: The development and evaluation of the Small Ruminant Nutrition System. *Small Ruminant Research*, v. 89, p. 174-184, 2010.

CAPÍTULO II

7. DEPOSIÇÃO DE GORDURA NA GLÂNDULA MAMÁRIA AVALIADA POR ULTRASSONOGRRAFIA EM NULÍPARAS SUPLEMENTADAS COM ÁCIDO ESTEÁRICO

7.1. RESUMO

A suplementação individual com ácido esteárico (AE) vem crescendo devido sua possível afinidade pelo tecido adiposo e relação com o balanço energético. Além disso, o desenvolvimento de tecidos mamários em resposta à nutrição no início da vida pode ter uma influência na produção de leite ao longo do tempo se o tecido adiposo (“*fat pad*”) na glândula mamária (GM) for em maior proporção, comprometendo o crescimento do PAR. O objetivo desse estudo foi avaliar, através de ultrassonografia, a deposição de tecido adiposo na GM de cordeiras nulíparas suplementadas com AE. Foram utilizadas 8 cordeiras (50% Lacaune x 50% Texel), com 5 meses de vida, divididas através de um delineamento inteiramente casualizado, em dois tratamentos: 1) Controle e 2) AE (1,5% de AE no consumo de matéria seca). O experimento durou 70 dias e os animais foram submetidos a ultrassonografia da GM 1 vez por semana. As imagens foram realizadas em cada lado da GM, selecionadas por qualidade de definição e comparadas através de escalas de cores, calculando o número de “pixels” correspondente à ecogenicidade das estruturas. A análise estatística foi realizada pelo PROC MIXED do SAS (OnDemand for Academics) e a significância quando $P < 0,05$. O delineamento foi realizado através de blocos casualizados, onde cada animal foi considerado um bloco, a suplementação e o período (semana) por bloco foram considerados tratamento e a GM (esquerda e direita) foi considerada parcela subdividida. Não houve efeito da suplementação com AE ($P = 0,11$) sobre a deposição de tecido adiposo na GM. Em conclusão, a suplementação com AE melhora o escore de condição corporal (ECC), não afeta o consumo de matéria seca (CMS) total, ganho médio diário (GMD), peso vivo (PV) e deposição de gordura na GM de cordeiras.

Palavras chaves: ovelhas leiteiras, nutrição animal, lactação, úbere.

7.2. ABSTRACT

Individual supplementation with stearic acid (SA) is increasing due to its possible affinity for adipose tissue and its relationship with energy balance. Moreover, the development of mammary tissues in response to early life nutrition may influence milk production over time if the adipose tissue ("*fat pad*") in the mammary gland (MG) is in higher proportion, compromising the growth of the parenchyma. The objective of this study was to evaluate, through ultrasonography, adipose tissue deposition in the MG of ewe lambs supplemented with SA. Eight ewe lambs (50% Lacaune x 50% Texel), 5 months old, were used, divided in a completely randomized design into two treatments: 1) Control and 2) SA (1.5% of SA in dry matter intake). The experiment lasted 70 days, and the animals underwent MG ultrasound once a week. Images were taken on each side of the MG, selected based on definition quality, and compared using color scales, calculating the number of pixels corresponding to the echogenicity of the structures. Statistical analysis was performed using PROC MIXED from SAS (OnDemand for Academics) and significance was reached when $P < 0.05$. The design was carried out using randomized blocks, where each animal was considered a block, the supplementation and period (week) per block were considered treatment and GM (left and right) was considered a subdivided plot. There was no effect of SA supplementation ($P = 0.11$) on adipose tissue deposition in the MG. In conclusion, AE supplementation improved body condition score (BCS), but did not affect total dry matter intake (DMI), average daily gain (ADG), live weight (BW) and development of fat deposition in GM of lambs.

Keywords: dairy sheep, animal nutrition, lactation, udder.

7.3. INTRODUÇÃO

A proporção entre parênquima (PAR) e tecido adiposo "*fat pad*" mamário (MFP) são influenciadas por fatores como idade, estado hormonal e condição corporal (BARTOW, 1998) e suas taxas de desenvolvimento em resposta à nutrição no início da vida podem influenciar a produção futura de leite (MOLENAAR et al., 2020). A alimentação com maior teor de energia, do pós-desmame à puberdade, estimula o crescimento do MFP que serve como uma

matriz para apoiar o crescimento do tecido secretor. Isso acontece porque a dieta possui capacidade de aumentar a taxa de crescimento dos animais e permite que atinjam a puberdade e primeira prenhez mais cedo e com isso se pode observar maior desenvolvimento da GM (BROWN et al., 2005).

No entanto, altas taxas de crescimento da GM, principalmente MFP antes da puberdade podem ter uma influência negativa na produção futura de leite (MOLENAAR et al., 2020). Além disso, o tamanho do MFP determina a área máxima de PAR, pois em situações que o tecido adiposo apresenta um crescimento excessivo, como quando há diminuição de proteína e aumento de energia da dieta, isso pode limitar o desenvolvimento futuro de tecidos secretores de leite (HOVEY et al., 1999).

Estudo realizado com borregas da raça Suffolk, com aproximadamente 7 meses de vida, que receberam dieta entre 30-40% de volumoso e 70-60% de concentrado comparados com animais que receberam a dieta inversa, mostrou que os animais que receberam maior quantidade de concentrado tiveram a área de MFP de 109,7 cm² (59,9% da área total da GM), enquanto animais que receberam menos concentrado a área observada foi de 69,7 cm² (43,7%; MCCANN et al., 1989).

A avaliação dos efeitos de nutrientes específicos da dieta sobre o desenvolvimento da GM de animais leiteiros vem crescendo ao longo do tempo, assim como a análise individual dos efeitos de AG específicos tem sido objeto de estudos e o AE tem se mostrado ser direcionado preferencialmente ao tecido adiposo (BIONAZ et al., 2011), contribuindo para melhorar o balanço energético dos animais. As respostas produtivas com o uso do AE na alimentação de ruminantes, relacionado ao teor de gordura e produção de leite têm sido positivas (STEELE e MOORE, 1968; PIANTONI et al. 2015) ou sem efeito (BOERMAN et al., 2017; HORSTMANN et al., 2021) em alguns estudos. Com isso, se entende que os resultados da suplementação variam, o que pode ocorrer devido ao tipo da fonte e o nível de inclusão do AE, a interação com outros componentes da dieta, estado fisiológico dos animais e digestibilidade do suplemento (BOERMAN et al., 2015).

Existe um interesse em entender a relação da dieta com os mecanismos fisiológicos e biológicos da formação da GM e sua capacidade de produzir leite. Busca-se desde a formação embrionária, encontrar respostas que possam

esclarecer quais fatores determinam uma boa conformação de úbere, tetos e produção de leite. Com isso, diversas técnicas vêm sendo utilizadas para avaliação da GM, tais como, o abate de animais para avaliação histológica e morfológica (BROWN et al., 2005; ESSELBURN et al., 2015; ALBINO et al., 2016), avaliações *in vivo* de áreas, diâmetros e circunferências de tetos, canais dos tetos e cisterna da GM (MORAN et al., 1991; LAMMERS et al., 1999). Atualmente, métodos não invasivos são bem-vistos na experimentação animal e têm sido defendidos por comitês de ética, com isso, uma das principais técnicas que demonstram auxiliar na avaliação de animais vivos é o uso de ferramentas de imagem, tais como a ultrassonografia (ESSELBURN et al., 2015; Silva et al., 2018; MOLENAAR et al., 2020).

Em ovinos, medidas diretas de imagens ultrassonográficas foram utilizadas para estimar o tamanho da cisterna (NUDDA et al., 2000). Adicionalmente, Castillo et al. (2008) avaliaram o tamanho da cisterna em diferentes intervalos de ordenha em ovelhas leiteiras e a partição do leite entre os compartimentos do úbere (cisterna e alvéolo) de ovelhas leiteiras foi analisada por Rovai et al. (2008). Devido a diferença na forma como a gordura e o músculo refletem ondas de ultrassom (BRETHOUR, 1990), alguns estudos que buscaram avaliar a proporção de PAR e MFP foram realizados em vacas (ALBINO et al., 2016; MOLENAAR et al., 2020; HASLIN et al., 2021) e ovelhas (ESSELBURN et al., 2015) e tiveram como principal objetivo analisar o efeito de diferentes dietas e do PV sobre desenvolvimento da GM entre o nascimento e a puberdade dos animais.

Não é de conhecimento deste autor a influência do AE no desenvolvimento da GM de ovelhas, além de serem escassas as pesquisas que utilizam o ultrassom para examinar a GM do mesmo animal de forma repetida. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar ao longo do tempo o acúmulo de gordura na GM de cordeiras suplementadas com AE.

7.4. MATERIAL E MÉTODOS

7.4.1. Desenho experimental, animais e tratamentos

O estudo foi desenvolvido no Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (latitude: 27°47'32" S e longitude 50°18'23" W) e todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética, sob o protocolo nº 8029060422. O experimento teve duração de 70 dias (sendo 7 dias de adaptação e 63 dias com suplementação de AE e os animais foram submetidos à ultrassonografia para avaliação da gordura da GM.

Foram utilizadas 8 cordeiras (50% Lacaune x 50% Texel), com 5 meses de idade, $35,1 \pm 2,8$ kg de peso vivo (PV), em um delineamento inteiramente casualizado, em dois grupos: 1) Controle e; 2) AE (1,5% de AE no consumo de matéria seca). As cordeiras eram nulíparas e foram mantidas em baias coletivas por grupo de tratamento. A composição do suplemento de ácido esteárico está na Tabela 1.

Tabela 1. Perfil de ácidos graxos do suplemento lipídico rico em ácido esteárico.

Ácido graxo (AG)	%
C4:0	0,12
C14:0	0,08
C15:0	0,03
C16:0	9,68
C17:0	0,15
C18:0	86,98
C20:0	0,61
C21:0	0,02
C22:0	0,41
C23:0	0,04
C24:0	0,14
C18:1 <i>cis</i> -9	0,10
C18:2 <i>cis</i> -6	0,10
AG Poliinsaturados	0,10
AG Trans	0,00
AG Monoinsaturados	0,10
AG Saturados	98,27
AG Insaturados	0,20

AG Totais 98,47

Suplemento contendo 87% de C18:0 (Prius F100 Nat Dry, Auster Nutrição Animal Ltda., Hortolândia, São Paulo, Brasil)

7.4.2. Dieta e manejo

Todos os animais tiveram acesso *ad libitum* a água e a dieta foi formulada de acordo com o SRNS (2010), Tabela 2 e os tratamentos foram isoenergéticos e isoproteicos. O concentrado foi fornecido individualmente e o AE foi misturado em uma parte do concentrado que era fornecida a fim de garantir o consumo total do suplemento pelos animais. Em seguida os animais recebiam o restante do concentrado do período.

O fornecimento de silagem foi feito por baia de tratamento e a dieta foi ajustada a cada 21 dias conforme o desenvolvimento dos animais. A alimentação foi ofertada duas vezes ao dia a uma taxa de 110% do consumo voluntário de matéria seca. As amostras de silagem e concentrado foram coletadas a cada 21 dias do período experimental, assim como suas respectivas sobras, em seguida se fez uma amostra composta de cada material para posterior análise de composição.

Tabela 2. Ingredientes e composição da dieta experimental.

	Tratamentos	
	Controle	AE
Ingredientes, % da MS		
Silagem de milho	59,8	55,6
Milho moído	17,6	17,7
Farelo de soja	17,6	17,6
Caulim	3,5	7,1
Mineral/ mix vitamínico	1,5	1,2
Composição, % da MS		
MS ¹	88,5	90,1
PB ²	14,4	14,1
FDN ³	44,4	41,3
CNE ⁴	29,5	28,6
Minerais	9,2	12,4
Extrato etéreo	3,6	4,6

AG totais ⁵	2,27	3,26
C18:0, % AG totais	5,59	6,64
EM ⁶ (Mcal/kg)	2,35	2,34
CMS estimado (kg/d)	1,42	1,44

¹Matéria seca; ²Proteína bruta; ³Fibra em detergente neutro; ⁴Carboidratos não estruturais;

⁵Ácidos graxos totais estimados de acordo com NASEM (2021); ⁶Energia metabolizável.

A pesagem e avaliação do escore de condição corporal (ECC) dos animais foi realizada a cada 21 dias. O ECC foi realizado por apenas um avaliador, usando a escala de 1 a 5, onde 1 são animais muito magros e 5 excessivamente gordos.

7.4.3. Análise ultrassonográfica

As imagens por ultrassom foram obtidas uma vez por semana, durante 10 semanas, sempre pelo mesmo avaliador, utilizando um aparelho equipado com transdutor linear a uma frequência de 6,5 MHz.

Para a avaliação da GM (direita e esquerda) os animais foram postos em macas imobilizadoras (em ângulo de 120°) e mantidos em posição sentada. O transdutor do ultrassom foi padronizado com inclinação de 45° em relação à posição da teta (ALBINO et al., 2015), sempre no sentido caudo-cranial (NISHIMURA et al., 2011) e gel de ultrassom foi colocado em cada glândula para assegurar o contato entre a sonda e a pele dos animais e conseqüentemente melhorar a qualidade da visualização das estruturas.

Em toda avaliação, no mínimo três imagens foram feitas em cada lado da GM dos animais, totalizando 528 imagens ao longo do estudo.

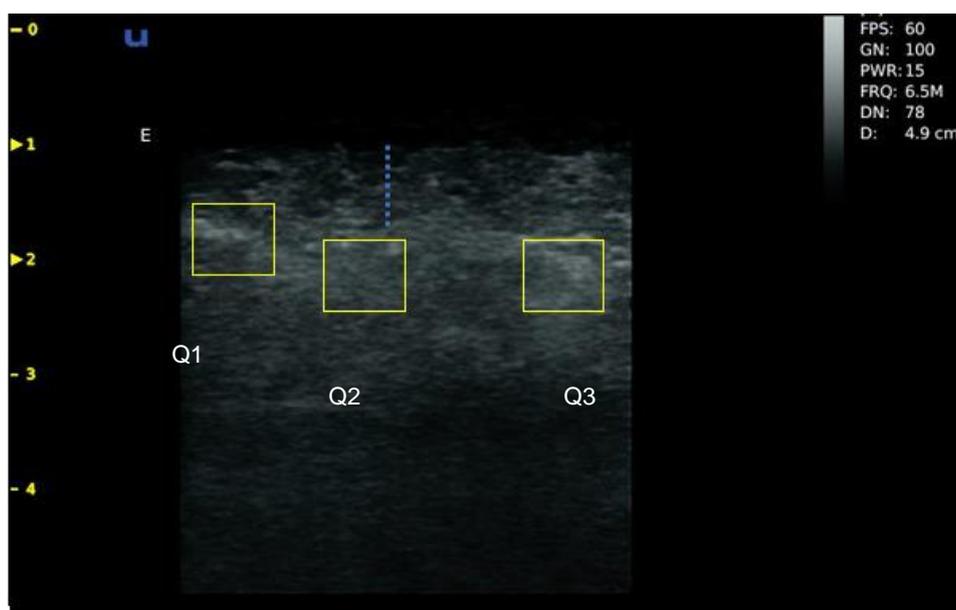
7.4.4. Avaliação das imagens de ultrassom através do ImageJ

As imagens foram avaliadas e selecionadas por qualidade de definição das estruturas, gerando um total de 176 imagens analisadas (22 imagens animal/período experimental - 2 imagens animal/semana), utilizando-se um monitor e alterando o formato para 8 bits, comparou-se a escala de cores pelo software ImageJ (National Institutes of Health, Rockville Pike MD, EUA), analisando as imagens obtidas em escala de cinza, calculando a área e o

número de “pixels” (National Institutes of Health, 2013). O brilho de cada pixel corresponde a ecogenicidade e foi representada em uma escala de 255 níveis de cinza gerando valores numéricos (de 0 – preto absoluto a 255 – branco máximo).

Nas duas imagens selecionadas de cada animal (uma de cada GM) a região mais hipoecoica foi identificada como PAR e a região mais hiperecoica foi considerada possível formação de MFP. Inicialmente, dentro da área de predominância de MFP, três pontos (6 mm²) foram aleatoriamente pré-determinados na imagem (Figura 1). Essas áreas determinadas foram utilizadas para padronizar a leitura de pixel e todas as imagens foram avaliadas da mesma forma (adaptado de ALBINO et al., 2016; SILVA et al., 2018 e HASLIN et al., 2021) no ImageJ. Cada um desses pontos foi identificado, conforme posição, sendo o quadro 1 (Q1) a área mais a esquerda, o quadro 2 (Q2) área central e o quadro 3 (Q3) a área mais à direita demarcada na imagem. Em termos de posicionamento da probe do ultrassom no animal, a área Q1 refere-se à parte mais medial da GM e a área de Q3 à porção mais lateral de cada GM. Em seguida se fez a média desses três pontos e todas as imagens foram avaliadas da mesma forma.

Figura 1. Pontos analisados na glândula mamária.



Cada quadrado mede 6 mm² e foram determinados aleatoriamente em possíveis áreas de “fatpad”; a linha tracejada indica área identificada como parênquima.

7.4.5. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o SAS (OnDemand for Academics) através do procedimento MIXED e a significância considerada quando $P < 0,05$. O delineamento experimental foi realizado através de blocos casualizados e os dados utilizados foram as médias de pixel das três áreas avaliadas. Cada animal foi considerado como um bloco, considerou-se como tratamento a suplementação e o período (semana) e a GM (esquerda e direita) foi considerada parcela subdividida. Os resíduos estudentizados fora do intervalo ± 3 foram considerados outliers e excluídos da análise estatística.

Os valores da escala de cinza da gordura da GM foram analisados por modelos lineares mistos como medidas repetidas no tempo. A semana 0 foi considerada como covariável, pois esses dados são referentes ao período pré-suplementação com AE. Interações pré-estabelecidas foram testadas (semana x tratamento, tratamento x GM; GM x semana) e a normalidade dos dados foi confirmada através do teste de Shapiro-Wilk. Os dados de consumo e desempenho foram analisados por modelos lineares mistos, com normalidade avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Nos casos que mesmo após transformação logarítmica ou para raiz quadrada a distribuição dos dados não demonstrou normalidade, se utilizou procedimento NPAR1WAY (Wilcoxon) (SAS, OnDemand for Academics).

7.5. RESULTADOS

7.5.1. Consumo de matéria seca e desempenho animal

O CMS total não diferiu entre tratamentos, mas o CMS de silagem foi 8% menor e o de concentrado 12,7% maior nos animais suplementados com AE (Tabela 3).

Em termos de ingestão total de energia metabolizável (EM), houve diferença entre os tratamentos ($P < 0,0001$) onde os animais do tratamento AE tiveram uma ingestão 5,6% maior (2,24 vs. 2,13 Mcal/dia), com um consumo 11% maior de EM via concentrado (1,61 vs. 1,45 Mcal/d; $P < 0,0001$), respectivamente.

A média do ECC dos animais a cada 21 dias é mostrada na Figura 2. A média do PV, GMD e ECC durante todo experimento está na Tabela 3.

Figura 2. Escore de condição corporal (ECC) médio de cordeiras suplementadas com ácido esteárico comparadas ao Controle.

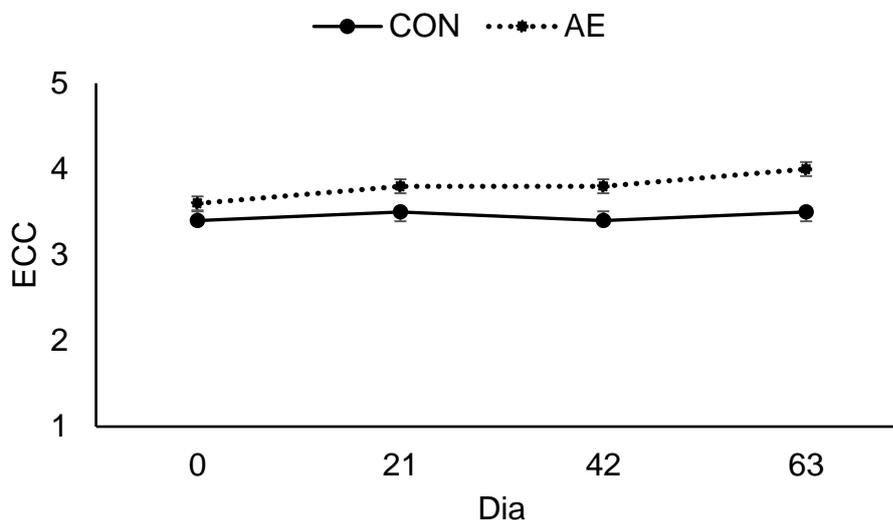


Tabela 3. Efeito da suplementação com ácido esteárico sobre consumo de matéria seca e desempenho das cordeiras comparadas com o Controle.

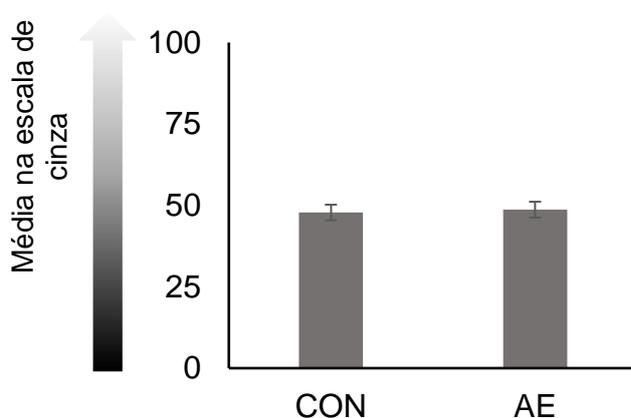
	Tratamentos ^a		EPM ^h	Valor p ⁱ
	CON	AE		
CMS conc (kg/dia) ^b	0,560	0,640	0,001	0,0001
CMS sil (kg/dia) ^c	0,750	0,690	0,008	0,0001
CMS total (kg/dia) ^d	1,310	1,330	0,013	0,16
PV (kg) ^e	44,10	43,25	1,290	0,36
GMD (kg) ^f	0,261	0,260	0,013	0,96
ECC (1-5) ^g	3,5	4,0	0,130	0,004

^aOs tratamentos foram CON (controle) e AE (ácido esteárico) com o fornecimento de 19 g/animal/dia (C18:0) na dieta; ^bCMS conc: Consumo de matéria seca de concentrado, medido individualmente; ^cCMS sil: Média do Consumo de matéria seca de silagem de milho, calculado por baia e dividido pelo número de animais do tratamento; ^dCMS total: Consumo de matéria seca da dieta total, calculado individualmente. ^eMédia do Peso vivo; ^fGanho de peso médio diário; ^gMédia do Escore de condição corporal; ^hErro padrão da média; ⁱNível de significância (P < 0,05).

7.5.2. Avaliação ultrassonográfica da glândula mamária

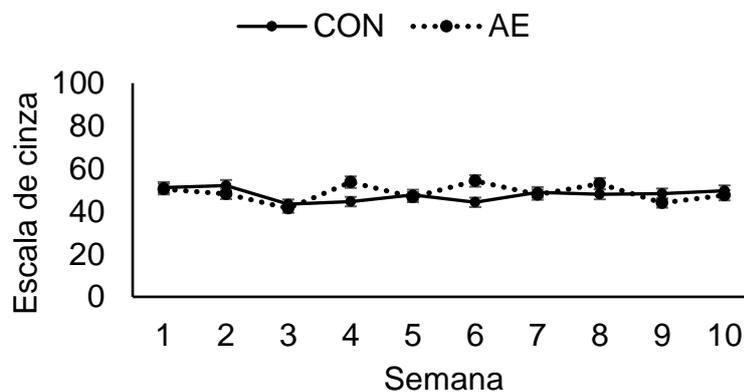
Não houve efeito de tratamento sobre a deposição de tecido adiposo na GM das cordeiras ($P = 0,11$; Figura 3), sendo a média de pixels observada no tratamento com AE de $48,7 \pm 8,8$ e do Controle de $47,4 \pm 7,3$.

Figura 3. Média da escala de cinza da glândula mamária de cordeiras suplementadas com ácido esteárico comparadas ao Controle.



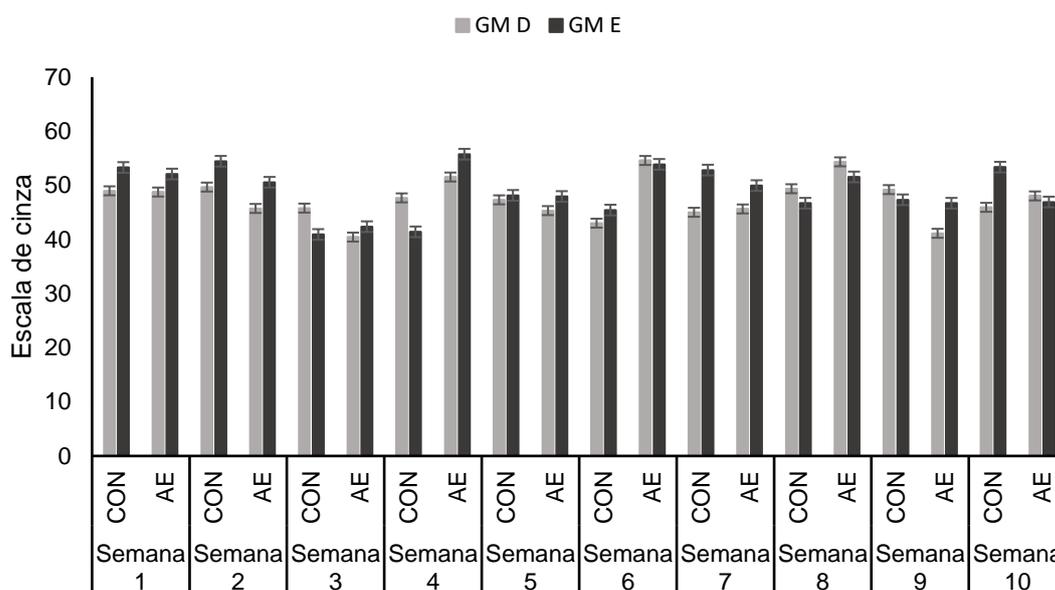
Além disso, conforme observado na Figura 4, a deposição de gordura na GM não diferiu entre as semanas do experimento ($P = 0,64$), independente do tratamento mantendo valores de pixel máximos de 51,4 e mínimos de 46,0 na escala de cinza.

Figura 4. Escala de cinza semanal da glândula mamária de cordeiras suplementadas com ácido esteárico comparadas ao Controle.



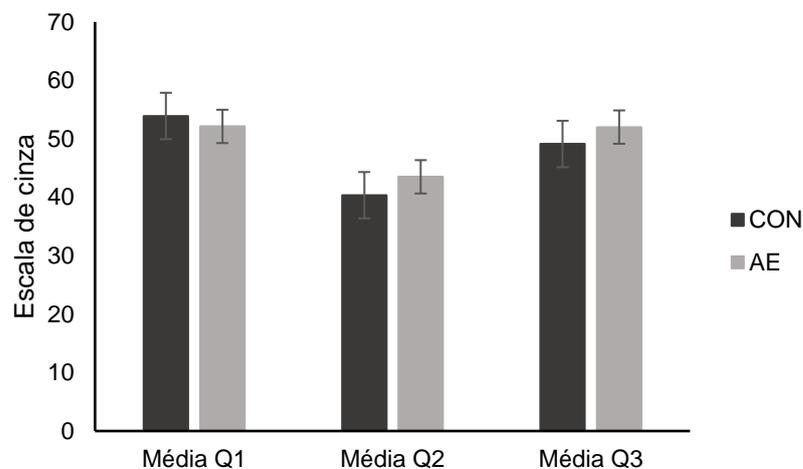
Foi realizada também a avaliação para identificar uma possível diferença de deposição de gordura entre o lado direito e esquerdo da GM (Figura 5). No entanto, não foi encontrada diferença ($P = 0,15$). A média na escala de cinza da GM direita foi $47,7 \pm 7,5$ e da esquerda $49,3 \pm 8,7$.

Figura 5. Escala de cinza semanal da glândula mamária direita (GMD) e esquerda (GME) de cordeiras suplementadas com ácido esteárico comparadas ao Controle.



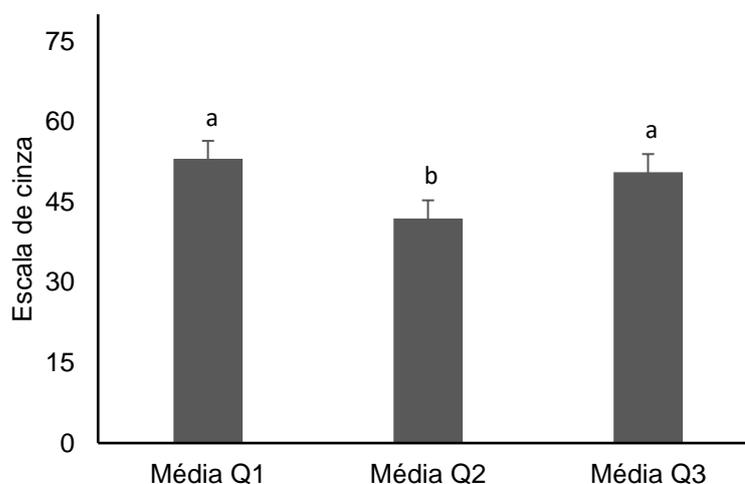
Em seguida, para verificar se uma determinada área da GM possui maior deposição de gordura, realizou-se a avaliação de cada um dos quadros pré-determinados (Figura 1) para leitura de pixel. Ouve diferença de ecogenicidade entre os quadros analisados ($P < 0,0001$) mas o padrão não teve relação entre os tratamentos ($P > 0,05$) podendo ser considerado um efeito de localização e não um efeito ocasionado pela suplementação de AE (Figura 6).

Figura 6. Escala de cinza em cada área analisada da glândula mamária de cordeiras suplementadas com ácido esteárico comparadas ao Controle.



Por fim, independentemente do tratamento, as médias de pixel obtidas em cada quadro foram avaliadas para identificar qual região da GM poderia depositar mais gordura e observou-se que a área do Q2 (escala de cinza de $41,9 \pm 12,0$) demonstra ser o local com menor deposição de gordura ($P < 0,0001$; Figura 7), comparado com Q1 (escala de cinza de $53,0 \pm 12,1$) e Q3 (escala de cinza de $50,6 \pm 9,8$), o que sugere que em estudos futuros deva ser evitada como uma região preferencial de avaliação.

Figura 7. Escala de cinza em diferentes áreas da glândula mamária de cordeiras suplementadas com ácido esteárico comparadas ao Controle.



7.6. DISCUSSÃO

Até onde sabemos, o presente estudo descreve pela primeira vez os padrões ultrassonográficos da deposição de gordura na GM de cordeiras em fase pré-púbere suplementadas de AE.

O fornecimento de AE não afetou o desenvolvimento de MFP (Figura 3) e conseqüentemente não prejudicaria o desenvolvimento de PAR ao longo do tempo (Figura 4) ou entre lados da GM (Figura 5). No entanto, observamos que uma determinada área demonstra ser o local com menos deposição de gordura (área de Q2) independentemente do oferecimento de AE ou não (Figura 6 e 7). Albino et al., 2015 observaram que em determinadas condições a região de MFP também demonstrou redução de pixels, pois o desenvolvimento mamário ocorre através do crescimento do tecido secretor (PAR) em direção ao MFP. Esses mesmos autores comentaram que animais que receberam maior aporte na relação proteína metabolizável/energia metabolizável no concentrado (48 e 53 g/Mcal) comparado com animais que receberam menores aportes (33, 38 e 43 g/Mcal) tiveram a região de MFP com redução de pixels, possivelmente causada por um aumento do tecido secretor (por exemplo, PAR). Neste estudo, não houve diferença no consumo total de proteína bruta entre os tratamentos ($P = 0,22$), sendo a ingestão de 12,8% e 13,1% para os tratamentos AE e Controle, respectivamente, diferindo somente na ingestão de energia pelo maior consumo de concentrado pelos animais do grupo AE. Entretanto, como o tratamento com AE não depositou mais tecido adiposo na GM e a menor deposição de tecido adiposo na área Q2 ocorreu nos dois tratamentos, essa redução pode indicar que ocorre maior crescimento de tecido secretor nessa região.

Com relação as áreas, Q1 (cranial) e Q3 (caudal) parecem depositar tecido adiposo de forma similar (Figura 6 e 7). Assim, é possível considerar que avaliar várias áreas aleatórias na região de interesse pode ser uma opção válida para mensuração do MFP.

Nossos resultados não demonstraram que a deposição de tecido adiposo na GM de cordeiras seja maior em animais que recebem AE, o que do ponto de vista de desenvolvimento da GM e produção de leite futura, pode ser positivo uma vez que uma maior deposição de gordura pode ocorrer às custas do PAR.

Neste estudo o CMS da silagem foi 8% menor e o de concentrado foi 12,7% maior para o tratamento AE (Tabela 3), sendo a relação volumoso:concentrado de 57:43 e 52:48 para os tratamentos Controle e AE, respectivamente. A redução no consumo de silagem por animais que recebem AE parece acontecer também em animais lactantes, tanto no início de lactação (DEL 36 ± 2) com uma relação de consumo volumoso:concentrado de 73:27 (DE AGUIAR et al., 2022), como no final de lactação (DEL 122 ± 12) e consumo volumoso:concentrado de 54:46 conforme mostraram Horstmann et al. (2021). No entanto, o consumo de concentrado não parece seguir o mesmo padrão.

Não houve diferença no consumo total de MS, o que fez com que a condição corporal (GMD e PV) não fosse diferente entre os tratamentos. Entretanto, a maior ingestão de concentrado dos animais que receberam AE determinou um aporte 4,7% maior de EM da dieta total, sendo a ingestão de EM oriunda do concentrado de 1,61 e 1,45 Mcal/dia para animais suplementados e não suplementados, respectivamente, que pode ter sido responsável pelo melhor ECC dos animais que receberam AE (Figura 2) e pode ser indicativo de um efeito do suplemento na manutenção de gordura corporal.

Adicionalmente, é necessário considerar que a possível ausência de efeitos do AE na deposição de gordura na GM de cordeiras pode estar relacionada a digestibilidade desse AG pois Boerman et al. (2017) alimentando vacas leiteiras com diferentes níveis de AE (0,80 a 2,30% da MS da dieta) verificaram que a digestibilidade desse AG diminuiu acentuadamente conforme o consumo aumentou. Todavia, estudos que avaliam a suplementação individual de AE em ruminantes são limitados, sendo necessário que outras análises sejam realizadas, tais como ensaio de digestibilidade do suplemento e perfil de AG e expressão de genes lipogênicos em tecidos adiposos de animais suplementados.

7.7. CONCLUSÃO

A suplementação com 1,5% de AE no CMS não afeta a deposição de gordura na GM de cordeiras nulíparas

7.8. REFERÊNCIAS

ALBINO, R.L., MARCONDES, M.I., AKERS, R.M., DETMANN, E., CARVALHO, B.C., SILVA, T.E. Mammary gland development of dairy heifers fed diets containing increasing levels of metabolisable protein: metabolisable energy. *Journal of Dairy Research*, v. 82, n. 01, p. 113–120, 2015. doi:10.1017/s0022029914000697

ALBINO, R.L., GUIMARAES, S.E.F., DANIELS, K.M., FONTES, M.M.S., MACHADO, A.F., DOS SANTOS, G.B., MARCONDES, M.I. Technical note: Mammary gland ultrasonography to evaluate mammary parenchymal composition in prepubertal heifers. *J. Dairy Sci.*, v. 100, p. 1588–1591, 2017.

BARTOW, S. Use of the autopsy to study ontogeny and expression of the estrogen receptor gene in human breast. *J. Mam. Gland Biol. Neoplasia*, v. 3, p. 37-48, 1998.

BOERMAN, J.P., FIRKINS, J.L., ST-PIERRE, N.R., LOCK, A.L. Intestinal digestibility of long-chain fatty acids in lactating dairy cows: A meta-analysis and meta regression. *J. Dairy Sci.*, v. 98, p. 8889–8903, 2015.

BRETHOUR, J.R. Relationship of ultrasound speckle to marbling score in cattle. *J. Anim. Sci.*, v. 68, p. 2603-2613, 1990.

BROWN, E.G., VANDEHAAR, M.J., DANIELS, K.M., LIESMAN, J.S., CHAPIN, L.T., FORREST, J.W., AKERS, R.M., PEARSON, R.E., WEBER NIELSEN, M.S. Effect of increasing energy and protein intake on mammary development in heifer calves. *J. Dairy Sci.*, v. 88, p. 595-603, 2005.

CASTILLO, V., SUCH, X., CAJA, G., SALAMA, A.A.K., ALBANELL, E., CASALS, R. Changes in Alveolar and Cisternal Compartments Induced by Milking Interval in the Udder of Dairy Ewes. *J. Dairy Sci.*, v. 91, n. 9, p. 3403-3411, 2008. doi:10.3168/jds.2008-1097.

DE AGUIAR, G.C., HORSTMANN, R., PADILHA, C.G., RIBEIRO, C.V.M., OLIVEIRA, D.E. Stearic acid does not overcome conjugated linoleic acid trans-10, cis-12-induced milk fat depression in lactating ewes. *Br. J. Nutr.*, v. 2022, Oct 27:1-7. doi:10.1017/S000711452100430X.

ESSELBURN, K.M., HILL, T.M., BATEMAN, H.G., FLUHARTY, F.L., MOELLER, S.J., O'DIAM, K.M., DANIELS, K.M. Examination of weekly mammary parenchymal area by

ultrasound, mammary mass, and composition in Holstein heifers reared on 1 of 3 diets from birth to 2 months of age. *J. Dairy Sci.*, v. 98, n. 8, p. 5280-5293, 2015. doi:10.3168/jds.2014-9061.

HASLIN, E., CORNER-THOMAS, R.A., KENYON, P.R., MOLENAAR, A.J., MORRIS, S.T., BLAIR, H.T. Mammary Gland Structures Are Not Affected by an Increased Growth Rate of Yearling Ewes Post-Weaning but Are Associated with Growth Rates of Singletons. *Animals*, v. 11, n. 3, p. 884, 2021. doi:10.3390/ani11030884.

HORSTMANN, R., AGUIAR, G.C. DE, RIBEIRO, C.V.D.M., OLIVEIRA, D.E. Stearic acid (C18:0) reduces the expression of lipogenic genes and productivity in late lactating dairy ewes. *Small Ruminant Research*, v. 195, p. 1-5, 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2020.106296>.

HOVEY, R.C., MCFADDEN, T.B., AKERS, R.M. Regulation of mammary gland growth and morphogenesis by the mammary fat pad: a species comparison. *J. Mam. Gland Biol. Neoplasia*, v. 4, p. 53-68, 1999.

LAMMERS, B.P., HEINRICHS, A.J., KENSINGER, R.S. The effects of accelerated growth rates and estrogen implants in pre-pubertal Holstein heifers on estimates of mammary development and subsequent reproduction and milk production. *J. Dairy Sci.*, v. 82, p. 1753-1764, 1999.

LOFTEN, J.R. et al. Invited review: Palmitic and stearic acid metabolism in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v. 97, n. 8, p. 4661-4674, 2014. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-7919>.

MCCANN, M.A., GOODE, L., HARVEY, R.W., CARUOLO, E.V., MANN, D.L. Effects of rapid weight gain to puberty on reproduction, mammary development and lactation in ewe lambs. *Theriogenology*, v. 32, n. 1, p. 55-68, 1989. doi:10.1016/0093-691x(89)90521-9.

MOLENAAR, A.J., MACLEAN, P.H., GILMOUR, M.L., DRAGANOVA, I.G., SYMES, C.W., MARGERISON, J.K., MCMAHON, C.D. Effect of whole-milk allowance on liveweight gain and growth of parenchyma and fat pads in the mammary glands of dairy heifers at weaning. *J. Dairy Sci.*, v. 103, n. 6, p. 5061-5069, 2020. doi:10.3168/jds.2019-17126.

MORAN, C., QUIRKE, J.F., PRENDIVILLE, D.J., BOURKE, S., ROCHE, J.F. The effect of estradiol, trenbolone acetate, or zeranol on growth-rate, mammary development, carcass traits, and plasma estradiol concentrations of beef heifers. *J. Anim. Sci.*, v. 69, p. 4249-4258, 1991.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Image J: Image Processing and Analysis in Java. 2013. <http://rsbweb.nih.gov/ij/>.

NISHIMURA, M., YOSHIDA, T., EL-KHODERY, S., MIYOSHI, M., FURUOKA, H., YASUDA, J., MIYAHARA, K. Ultrasound imaging of mammary glands in dairy heifers at different stages of growth. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 73, p. 19-24, 2011. <https://doi.org/10.1292/jvms.09-0503>.

NUDDA, A., PULINA, G., VALLEBELLA, R., BENCINI, R., ENNE, G. Ultrasound technique for measuring mammary cistern size of dairy ewes. *J. Dairy Res.*, v. 67, n. 1, p. 101-106, 2000. doi:10.1017/s0022029999003921.

PIANTONI, P., LOCK, A.L., ALLEN, M.S. Milk production responses to dietary stearic acid vary by production level in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, v. 98, n. 3, p. 1938-1949, 2015.

ROVAI, M., CAJA, G., SUCH, X. Evaluation of Udder Cisterns and Effects on Milk Yield of Dairy Ewes. *J. Dairy Sci.*, v. 91, n. 12, p. 4622-4629, 2008. doi:10.3168/jds.2008-1298.

SILVA, A.L., DETMANN, E., DIJKSTRA, J., PEDROSO, A.M., SILVA, L.H.P., MACHADO, A.F., MARCONDES, M.I. Effects of rumen-undegradable protein on intake, performance, and mammary gland development in prepubertal and pubertal dairy heifers. *J. Dairy Sci.*, v. 101, n. 7, p. 5991-6001, 2018. doi:10.3168/jds.2017-13230.

STEELE, W., MOORE, J.H. The effects of a series of saturated fatty acids in the diet on milk-fat secretion in the cow. *J. Dairy Res.*, v. 35, p. 361-370, 1968

CAPÍTULO III

8. EXPRESSÃO GÊNICA E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO TECIDO ADIPOSEO DE NULÍPARAS SUPLEMENTADAS COM ÁCIDO ESTEÁRICO

8.1. RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito da suplementação com ácido esteárico (AE) sobre o perfil de ácidos graxos (AG) e a expressão de genes envolvidos na síntese lipídica do tecido adiposo de cordeiras. Foram utilizadas 8 cordeiras (50% Lacaune x 50% Texel), com 5 meses de vida, divididas através de um delineamento inteiramente casualizado, em dois tratamentos: 1) Controle e 2) AE (1,5% de AE no consumo de matéria seca). O experimento durou 70 dias e os animais foram submetidos à biópsia de tecido adiposo no dia 0 e no dia 70 de suplementação. As amostras do dia 0 e 70 foram submetidas à análise de perfil de AG e para análise de expressão somente as amostras do dia 70. A análise estatística foi realizada pelo SAS (OnDemand for Academics) e os dados de perfil de AG foram analisados através do PROC MIXED considerando os tratamentos, período e as interações como efeitos fixos e animal como efeito aleatório e os dados de expressão gênica foram analisados através do PROC TTEST considerando tratamentos como efeitos fixos e animal como efeito aleatório. O tratamento com AE aumentou o teor dos ácidos láurico (C12:0), palmitoleico (C16:1), oleico (C18:1 *cis*-11) e araquidônico (C20:4 n6) respectivamente em 36 (P = 0,006), 3,1 (P = 0,02), 8 (P = 0,003) e 7,7% (P = 0,04) quando comparado ao Controle. Além disso, houve interação entre tratamento e período nos teores dos AG láurico (P = 0,009), AE (P = 0,09) e CLA *cis*-9, *trans*-11 (P = 0,08). A suplementação com AE aumentou a abundância relativa de RNAm do gene GPAT (P = 0,0103), envolvido na síntese de triglicerídeos no tecido adiposo. Em conclusão, o AE modificou parcialmente o perfil de AG e a expressão dos genes envolvidos na síntese do tecido adiposo de cordeiras.

Key words: Lipídeos, ovinos, nutrigenômica, genes.

8.2. ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of stearic acid (SA) supplementation on the fatty acid (FA) profile and the expression of genes involved in lipid synthesis in the adipose tissue of ewe lambs. Eight ewe lambs (Lacaune x Texel), 5 months old, were used, divided in a completely randomized design into two treatments: 1) Control and 2) SA (1.5% of dry matter intake with SA). The experiment lasted 70 days, and the animals underwent adipose tissue biopsy on day 0 and day 70 of supplementation. Samples from day 0 and 70 were analyzed for fatty acid profile, and only the samples from day 70 were analyzed for gene expression. Statistical analysis was performed using SAS (OnDemand for Academics), and FA profile data were analyzed through PROC MIXED, considering treatments, period, and interactions as fixed effects and animal as a random effect. Gene expression data were analyzed through PROC TTEST, considering treatments as fixed effects and animal as a random effect. SA treatment increased the content of lauric (C12:0), palmitoleic (C16:1), oleic (C18:1 *cis*-9), and arachidonic (C20:4 n6) acids by 36% ($P = 0.006$), 3.12% ($P = 0.02$), 8% ($P = 0.003$), and 7.69% ($P = 0.04$), respectively, compared to the control. Moreover, there was an interaction between treatment and period in the content of lauric ($P = 0.009$), stearic ($P = 0.09$), and CLA *cis*-9, *trans*-11 ($P = 0.08$) fatty acids. SA supplementation increased the relative mRNA abundance of the GPAT gene ($P = 0.0103$), which is involved in triglyceride synthesis in adipose tissue. In conclusion, SA partially modified the FA profile and the expression of genes involved in the synthesis of adipose tissue in lambs.

Keywords: Lipids, sheep, nutrigenomics, genes.

8.3. INTRODUÇÃO

A suplementação lipídica é utilizada para um incremento energético em determinadas fases da vida dos animais conforme as exigências nutricionais. Entretanto, com o passar do tempo outras vantagens foram relacionadas ao uso de gordura na alimentação animal, tais como, maior produção de leite, maior produção de gordura (JENKINS, 1993; LOFTEN, 2014), alterações no perfil de

AG no leite (BOERMAN et al., 2017) e alterações na BH ruminal (JENKINS, 1993).

Dentre os principais suplementos lipídicos destaca-se o AE (LOFTEN et al., 2014; BOERMAN et al., 2017; SOUZA et al., 2018), o qual vem demonstrando efeitos positivos no seu uso na alimentação de ruminantes, principalmente quando relacionado ao teor de gordura e produção de leite (STEELE E MOORE, 1968; PIANTONI et al. 2015); devido a esse possível efeito, algumas pesquisas utilizando esse AG buscaram mitigar a depressão de gordura do leite (DGL) (TORAL et al., 2016; AGUIAR et al., 2022), outras mostraram que a utilização do AE não gera efeitos sobre a produção de leite e produção de gordura do leite (BOERMAN et al., 2017; HORSTMANN et al., 2021) e que, em comparação a outros AG, o AE parece ser mais direcionado ao tecido adiposo, contribuindo para a melhoria no balanço energético dos animais, além de participar na regulação do metabolismo e transcrição gênica em ruminantes (BIONAZ et al., 2011), realizando alterações na expressão de genes envolvidos na síntese lipídica (HORSTMANN et al., 2021; AGUIAR et al., 2022; BESSANI et al., 2022).

No entanto, os mecanismos ligados às respostas do AE no metabolismo lipogênico de ruminantes ainda não são totalmente compreendidos e os estudos que avaliam a influência da suplementação com fontes de gordura sob o perfil de AG e sob a expressão de genes envolvidos na síntese lipídica estão normalmente relacionados a animais lactantes através de estudos da GM. Além disso, existe uma limitação nas pesquisas realizadas em tecido adiposo, uma vez que a grande maioria dos estudos nesse sentido busca avaliar animais com aptidão para carne; além de serem escassos também os estudos nessa área que usem como modelo animal os ovinos em desenvolvimento. Dessa maneira, o objetivo desse estudo foi avaliar a capacidade do AE de alterar o perfil de AG do tecido adiposo e a expressão de genes envolvidos na síntese lipídica de cordeiras.

8.4. MATERIAIS E MÉTODOS

8.4.1. Desenho experimental, animais e tratamentos

Foram utilizadas 8 cordeiras (50% Lacaune x 50%Texel), com 5 meses de idade, $35,1 \pm 2,8$ kg de peso vivo (PV), em um delineamento inteiramente casualizado, em dois grupos: 1) Controle e; 2) AE (1,5% de AE no consumo de matéria seca). As cordeiras eram nulíparas, foram mantidas em baias coletivas por grupo de tratamento. A composição do suplemento rico em AE está na Tabela 1.

Tabela 1. Perfil de ácidos graxos do suplemento lipídico rico em ácido esteárico.

Ácido graxo (AG)	%
C4:0	0,12
C14:0	0,08
C15:0	0,03
C16:0	9,68
C17:0	0,15
C18:0	86,98
C20:0	0,61
C21:0	0,02
C22:0	0,41
C23:0	0,04
C24:0	0,14
C18:1 <i>cis</i> -9	0,10
C18:2 <i>cis</i> -6	0,10
AG Poliinsaturados	0,10
AG Trans	0,00
AG Monoinsaturados	0,10
AG Saturados	98,27
AG Insaturados	0,20
AG Totais	98,47

Suplemento contendo 87% de C18:0 (Prius F100 Nat Dry, Auster Nutrição Animal Ltda., Hortolândia, São Paulo, Brasil).

8.4.2. Dieta e manejo

Todos os animais tiveram acesso *ad libitum* a água e a dieta fornecida aos animais foi formulada de acordo com o SRNS (2010), Tabela 2. Todos os tratamentos foram isoenergéticos e isoproteicos. O concentrado foi fornecido individualmente e o AE foi misturado em uma parte do concentrado que era fornecida a fim de garantir o consumo total do suplemento pelos animais. Em seguida os animais recebiam o restante do concentrado do período.

O fornecimento de silagem foi feito por baia de tratamento e a dieta foi ajustada a cada 21 dias conforme o desenvolvimento dos animais. A alimentação foi ofertada duas vezes ao dia a uma taxa de 110% do consumo voluntário de matéria seca. As amostras de silagem e concentrado foram coletadas a cada 21 dias do período experimental, assim como suas respectivas sobras, e em seguida se fez uma amostra composta de cada material para posterior análise de composição.

Tabela 2. Ingredientes e composição da dieta experimental.

	Tratamentos	
	Controle	AE
Ingredientes, % de MS		
Silagem de milho	59,8	55,6
Milho moído	17,6	17,7
Farelo de soja	17,6	17,6
Caulim	3,5	7,1
Mineral/ mix vitamínico	1,5	1,2
Composição química, % de MS		
MS ¹	88,5	90,1
PB ²	14,4	14,1
FDN ³	44,4	41,3
CNE ⁴	29,5	28,6
Minerais	9,2	12,4
Extrato etéreo	3,6	4,6
AG totais ⁵	2,27	3,26
C18:0, % AG totais	5,59	6,64
EM ⁶ (Mcal/kg)	2,35	2,34
CMS estimado (kg/d)	1,42	1,44

¹Matéria seca; ²Proteína bruta; ³Fibra em detergente neutro; ⁴Carboidratos não estruturais;

⁵Ácidos graxos totais estimados de acordo com NASEM (2021); ⁶Energia metabolizável.

A pesagem e avaliação de escore de condição corporal (ECC) dos animais foi realizada a cada 21 dias. O ECC foi realizado por apenas um avaliador, usando a escala de 1 a 5, onde 1 são animais muito magros e 5 excessivamente gordos.

8.4.3. Biópsia do tecido adiposo

Nos dias 0 e 70 do período experimental foram realizadas as biópsias de tecido adiposo em todos os animais. Previamente ao procedimento foi realizado tricotomia e assepsia do local da biópsia com solução de álcool iodado (10%) e em seguida os animais foram submetidos à anestesia local com 8 mL de Cloridrato de Lidocaína, distribuídos em círculo ao redor do local da incisão. Após 10 minutos iniciou-se a biópsia através de incisão na região estabelecida (latero-ventral à região sacro-ilíaca) e coletou-se aproximadamente 130 mg de tecido/animal. As amostras foram lavadas com solução fisiológica, armazenadas em duplicatas em criotubos com solução fosfatosalino – PBS, alocadas em botijão de nitrogênio a -196°C, e em seguida armazenadas em temperatura de -20°C e -80°C para posterior análise de perfil de AG e expressão gênica, respectivamente. Em seguida, realizou-se a síntese da incisão por aproximação das bordas com cola cirúrgica e os animais receberam aplicação de meloxicam 2% (2,5 ml/100 kg) e oxitetraciclina (1ml/10 kg) por via intramuscular. Os animais permaneceram em observação e foi realizada limpeza da incisão por 3 dias.

8.4.4. Extração de RNA, síntese de DNA Complementar (cDNA) e PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

A extração do RNA e a síntese do DNA complementar (cDNA) foram realizadas inicialmente através da pesagem das amostras (~80 mg) seguida de imersão em eppendorf contendo QiAzol Lysis Reagent (Qiagen Sciences, Germantown, MD, EUA). Posteriormente, os tecidos foram homogeneizados utilizando um homogeneizador de tecidos portátil. Após a trituração e homogeneização dos tecidos a extração do RNA foi conduzida utilizando o Kit RNeasy Lipid Tissue (Qiagen Sciences, Germantown, MD, EUA), seguindo o

protocolo fornecido pelo fabricante, com aplicação de DNase (RNase-free DNase set, Qiagen Sciences, Germantown, MD, EUA) diretamente na coluna de extração para impedir a contaminação por DNA nas amostras.

A confirmação da pureza do RNA foi verificada por meio do espectrofotômetro NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e a síntese do cDNA foi conduzida utilizando o Kit GeneAmp (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) em um termociclador (MJ96+, Biocycler, Biosystems Importadora, Curitiba, PR, Brasil).

O RT-qPCR foi conduzido através de uma placa de 48 poços (Micro Amp, Applied Biosystems), na qual utilizou-se 5 µl de cDNA da curva padrão obtida pela diluição seriada de um *pool* de todas as amostras e 10 µl de mix contendo H₂O livre de RNA, primer do gene de interesse e SyberGreen (GoTaq qPCR Master Mix, Promega, Madison, WI, EUA), seguida da utilização de 5 µl de cDNA de cada amostra e 10 µl de mix em triplicatas. A quantificação da placa foi realizada no aparelho StepOne Real-Time (Applied Biosystems), e os dados foram analisados utilizando o software StepOne versão 2.1 (Applied Biosystems), que gerou curvas de dissociação para verificar a presença de somente um produto. Em seguida, a partir dos valores do ciclo de RT-qPCR, uma equação de regressão foi gerada para verificar a eficiência da reação. Os primers utilizados estão relacionados na Tabela 3.

Tabela 3. Primers ovinos usados na análise de PCR em tempo real.

Gene	Primers	Acesso
ACC	F: GCCTTGAGCTCTGAGGGCTC R: ACGGAGCCAATTATGAATCG	Ticiani et al. (2016)
FASN	F: GGCCGTCTTTCTGACCAAGA R: CGTGACGCCTTGCTTTTTG	Ticiani et al. (2016)
CD36	F: TGTGTTTGGAGGGATTCT R: CCTTGGCTAGATAACGAACTCTG	Hussein et al. (2013)
LPL	F: ACCTGAAGACTCGTTCTCAGATG R: GGCCTGGTTGGTGTATGTATT	Hussein et al. (2013)
FABP4	F: ATGGCCAAACCCACTGTGAT R: GGCCCAATTTGAAGGACATCT	NM_001114667.1
GPAT	F: GCATTGGTTCGGTGTAAGCAT R: TTCTTTCCACTTCAAGGTTGC	Hussein et al. (2013)
AGPAT	F: ACTTCCAGTACATCAGCCTGCGGC R: CGTGAAAGCGAGAGCTATCCTG	Hussein et al. (2013)
DGAT	F: CACTGGGACCTGAGGTGTCA R: AACCGTGC GTT GCTTAAGATC	Hussein et al. (2013)
PPAR- γ	F: CCAAGAATATCCCCGGCT R: AGGCCAGCATCGTGTA AAA	Hussein et al. (2013)
β -actina	F: GCCTTTGCCATCACTGCAAT R: TGAGCTCTCCTGCCCTCTTG	Ticiani et al. (2016)
S18	F: GCCCTGAGGCTCTCTTCCA R: CGGATGTCGACGTCACACTT	Ticiani et al. (2016)

Os primers são reportados em sequência 5' – 3'. ACC: Acetil-CoA carboxilase alfa; FASN: Ácido graxo sintetase; CD36: Molécula CD363; LPL: Lipase lipoproteica; FABP4: Proteína ligadora de ácido graxo 4; GPAT: Glicerol-3- fosfato aciltransferase 1; AGPAT: Acilglicerolfosfato aciltransferase 6; DGAT: Diglicerídeo aciltransferase 1; PPAR- γ : Receptores ativados por proliferadores de peroxissomo; β -actina: Beta-actina; S18: Proteína Ribossomal S18.

8.4.5. Análise de perfil de ácidos graxos

Os tecidos foram pesados (\pm 50 mg) e os AG metilados de acordo com Kramer et al. (1997), utilizando o metóxido de sódio e o cloreto de acetila como catalisadores básicos e ácidos, respectivamente. Os ésteres metílicos de AG resultantes foram determinados por meio de cromatografia gasosa (modelo Focus GC; Termo Científico, Milão, Itália), equipado com detector de ionização de chamas e coluna capilar de sílica fundida SP-2560 (100 m x 25 mm x 0,2 μ m de espessura de filme; Supelco, Bellefonte, Pennsylvania). O hidrogênio foi usado como gás transportador (1 ml/min) e o nitrogênio como gás auxiliar. As

temperaturas do detector e do injetor foram 250°C, com o split de 15:1. A programação de temperatura do forno foi de 7°C por 4 min, com aumento de 13°C/min para 175°C, mantida por 27 min, com posterior aumento de 4°C/min para 215°C e mantida por 31 min (Kramer *et al.*, 1997). Os ésteres metílicos de AG foram identificados por comparação com três referências (Mistura Supelco FAME # C4-C24, CLA trans-9, cis 11 # 16413, e CLA trans-10, cis 12 # 04397; Sigma Aldrich). Os isômeros *cis/trans*-18:1 foram identificados de acordo com sua ordem de eluição relatada sob as mesmas condições cromatográficas (Kramer *et al.*, 2002).

8.4.6. Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo SAS (OnDemand for Academics) considerando um nível de significância quando $P \leq 0,05$ e tendência quando $P > 0,05$ e $< 0,10$. As análises de perfil de AG foram realizadas através do PROC MIXED e tratamento, período e a interação foram classificados como efeito fixo e o animal como efeito aleatório.

Para as análises de expressão gênica utilizou-se o PROC TTEST e foi considerado o tratamento como efeito fixo e o animal como efeito aleatório. A análise foi realizada com base no valor normalizado dos genes, os quais são obtidos através da média geométrica dos genes housekeeping (proteína ribossomal S18 e β -actina). Os dados são apresentados como abundância relativa de RNA, considerando o Controle como 100%

Os resíduos estudentizados fora de $\pm 3,0$ foram considerados “outliers” e excluídos da análise estatística. A normalidade dos dados foi confirmada através do teste de Shapiro-Wilk.

8.5. RESULTADOS

8.5.1. Consumo de matéria seca e desempenho animal

O consumo total de matéria seca (CMS) não variou entre os tratamentos, porém, o consumo de silagem foi 8% menor e o de concentrado 12,7% maior nos animais que receberam suplementação com AE. Em relação à ingestão total

de energia metabolizável (EM), observou-se diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,0001$), onde os animais do grupo AE consumiram 5,6% mais EM (2,24 vs. 2,13 Mcal/dia), com um aumento de 11% no consumo de EM proveniente do concentrado (1,61 vs. 1,45 Mcal/dia; $P < 0,0001$). O escore de condição corporal (ECC) também apresentou diferenças entre os tratamentos ($P = 0,004$), sendo 3,8 no grupo AE e 3,4 no grupo Controle. As médias de peso vivo (PV) e ganho médio diário (GMD) não mostraram diferenças significativas.

8.5.2. Perfil de ácidos graxos do tecido adiposo

O perfil de AG do tecido adiposo está apresentado na Tabela 4. O tratamento com AE aumentou o teor dos ácidos láurico (C12:0), palmitoleico (C16:1), C18:1 *cis*-11 e araquidônico (C20:4 n-6) respectivamente em 36,0 ($P = 0,006$), 3,1 ($P = 0,02$), 8,0 ($P = 0,003$) e 7,7% ($P = 0,04$) quando comparado ao Controle (Tabela 4). Além disso, observou-se que houve efeito do período no teor dos AG palmitoleico ($P = 0,008$), AE (C18:0; $P = 0,010$) e araquidônico ($P = 0,04$) e tendência a efeito de período no oleico (C18:1 *cis*-9; $P = 0,06$). Os teores do palmitoleico, do oleico e do araquidônico foram, respectivamente, 10,6, 10,8 e 15,4% maiores no final do período experimental, ao contrário do AE que foi 22,3% menor no período final quando comparado com o inicial. Além disso, houve interação entre tratamento e período nos teores dos AG láurico ($P = 0,009$), esteárico ($P = 0,09$) e CLA *cis*-9 *trans*-11 ($P = 0,08$).

Tabela 4. Efeito da suplementação com ácido esteárico sobre o perfil de ácidos graxos no tecido adiposo de cordeiras.

	Tratamento ¹		EPM ²	Período		EPM ²	P – valor ³		
	CON	AE		Inicial	Final		Tratamento	Período ⁴	Trat x Per. ⁵
C10:0	0,21	0,24	0,01	0,22	0,23	0,01	0,61	0,60	0,26
C12:0	0,16	0,25	0,001	0,19	22	0,0002	0,006	0,91	0,009
C14:0	3,05	2,93	0,07	3,03	2,94	0,01	0,45	0,60	0,28
C14:1	0,20	0,20	0,01	0,21	0,19	0,01	0,45	0,34	0,40
C16:0	26,12	25,55	0,35	26,34	25,33	0,04	0,23	0,17	0,30
C16:1	1,86	1,92	0,04	1,78	1,99	0,01	0,02	0,002	0,44
C18:0	20,49	20,11	0,10	22,85	17,76	0,11	0,82	0,009	0,09
C18:1 <i>trans</i> -9	0,46	0,49	0,01	0,49	0,46	0,002	0,16	0,16	0,34
C18:1 <i>trans</i> -11	1,13	1,10	0,07	1,21	1,01	0,06	0,59	0,16	0,06
C18:1 <i>cis</i> -9	35,49	35,56	0,13	33,50	37,56	0,42	0,98	0,07	0,27
C18:1 <i>cis</i> -11	0,69	0,75	0,02	0,70	0,74	0,003	0,003	0,18	0,43
C18:2 n-6	1,09	1,70	0,01	1,35	1,43	0,01	0,36	0,67	0,22
C18:3 n-3	0,40	0,48	0,03	0,42	0,46	0,03	0,66	0,49	0,11
CLA <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11	0,21	0,21	0,01	0,20	0,23	0,002	0,19	0,24	0,08
C20:4 n- 6	0,12	0,13	0,005	0,11	0,13	0,003	0,04	0,02	0,55

¹Os tratamentos foram Controle e 1,5% de AE no consumo de matéria seca; ²Erro padrão da média; ³Nível de significância (P<0,05);

⁴Significância do tempo de administração dos tratamentos; ⁵Interação entre tratamento e tempo

Sabendo que houve efeito de período e interação entre tratamento e período, realizou-se a análise dos dados avaliando como cada grupo de tratamento se comportou nos distintos períodos (Tabela 5). O tratamento com AE fez com que houvesse um teor de ácido láurico 18,5% maior no final do período experimental quando comparado com o período inicial ($P = 0,0921$). Já o teor de C18:0 no tecido adiposo dos animais que receberam AE foi 33,7% menor no final do período quando comparado com o período inicial ($P = 0,0503$). O único AG com efeito de tratamento entre os períodos nos animais do grupo Controle foi o CLA *cis-9 trans-11* ($P = 0,0418$), o qual foi 28% maior no período final.

Tabela 5. Efeito da suplementação com ácido esteárico sobre o perfil de ácidos graxos no tecido adiposo de cordeiras (tratamento ao longo do tempo) dentro de cada grupo de tratamento.

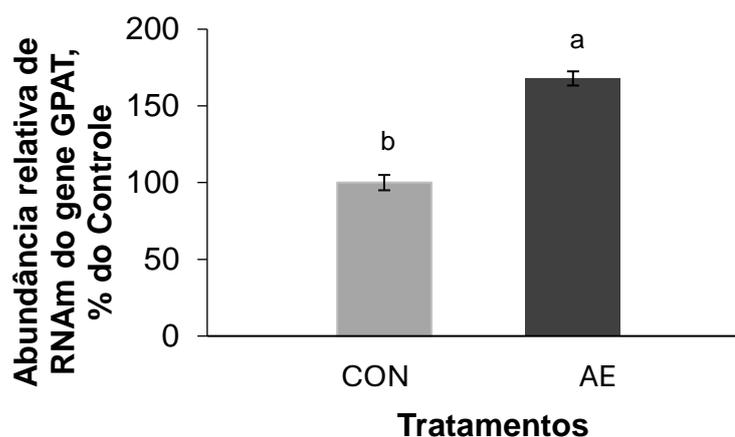
	Tratamento ¹				EPM ²		P – valor ³	
	CON		AE		CON	AE	CON	AE
	Inicial	Final	Inicial	Final				
C10:0	0,21	0,20	0,22	0,26	0,003	0,01	0,7165	0,5403
C12:0	0,16	0,16	0,22	0,27	0,04	0,002	0,1238	0,0921
C14:0	2,88	2,98	3,19	2,91	0,15	0,02	0,2764	0,3340
C14:1	0,20	0,19	0,22	0,19	0,01	0,02	0,7565	0,5383
C16:0	26,25	25,99	26,42	24,68	0,67	0,06	0,4702	0,1612
C16:1	1,77	1,94	1,80	2,05	0,01	0,04	0,1253	0,6261
C18:0	21,52	19,47	24,18	16,04	0,08	0,18	0,1805	0,0503
C18:1 <i>trans-9</i>	0,49	0,43	0,50	0,49	0,02	0,003	0,2332	0,7931
C18:1 <i>trans-11</i>	1,09	1,17	1,34	0,85	0,01	0,07	0,6151	0,5210
C18:1 <i>cis-9</i>	34,65	36,34	32,34	38,77	1,74	0,19	0,7962	0,1077
C18:1 <i>cis-11</i>	0,68	0,70	0,72	0,78	0,03	0,03	0,3061	0,6521
C18:2 n-6	0,93	1,25	1,78	1,62	0,51	0,20	0,9668	0,3525
C18:3 n-3	0,42	0,37	0,43	0,54	0,02	0,04	0,2469	0,9573
CLA <i>cis-9 trans-11</i>	0,18	0,25	0,22	0,21	0,001	0,003	0,0418	0,7174
C20:4 n-6	0,11	0,13	0,12	0,13	0,001	0,003	0,1403	0,4551

¹Os tratamentos foram CON (controle) e 1,5% de AE (ácido esteárico) no consumo de matéria seca; ²Erro padrão da média; ³Nível de significância ($P < 0,05$).

8.5.3. Expressão gênica

A suplementação com AE aumentou a abundância relativa de RNAm do gene GPAT ($P = 0,0103$) em 67,9% quando comparado ao Controle (Figura 1).

Figura 1. Abundância do gene GPAT no tecido adiposo de cordeiras suplementadas com ácido esteárico comparadas ao Controle.



Os valores são apresentados como a média \pm EPM. Letras diferentes demonstram diferenças significativas entre o tratamento AE e Controle ($P < 0,05$).

Não houve efeito do AE ($P > 0,05$) sobre a expressão dos genes envolvidos na síntese *de novo* de AG (ACACA α e FASN), naqueles envolvidos em processos de internalização e transporte (LPL, FABP4 e CD36) de AG, dos envolvidos na regulação gênica (PPAR- γ), assim como nos demais genes envolvidos na síntese de triglicerídeos (DGAT e AGPAT), conforme mostrado na Tabela 6.

Tabela 6. Abundância relativa de RNAm de genes envolvidos na síntese lipídica do tecido adiposo de cordeiras suplementadas com ácido esteárico (AE) comparadas ao Controle (CON).

Abundância relativa de RNAm do gene (%)	Tratamento		SEM	P - value
	CON	AE		
CD36	1,00	1,06	0,02	0,5737
ACC	1,00	1,34	0,04	0,3911
FASN	1,00	1,26	0,03	0,2980
GPAT	1,00	1,68	0,02	0,0103
DGAT	1,00	1,13	0,03	0,5671
AGPAT	1,00	1,03	0,01	0,7189
PPAR	1,00	1,07	0,02	0,6472
LPL	1,00	1,07	0,02	0,6682
FABP4	1,00	1,12	0,02	0,4472

Os valores são apresentados como a média \pm EPM; ACC: Acetil-CoA carboxilase alfa; FASN: Ácido graxo sintetase; CD36: Molécula CD363; LPL: Lipase lipoproteica; FABP4: Proteína ligadora de ácido graxo 4; GPAT: Glicerol-3- fosfato aciltransferase 1; AGPAT: Acilglicerolfosfato aciltransferase 6; DGAT: Diglicerídeo aciltransferase 1; PPAR- γ : Receptores ativados por proliferadores de peroxissomo;

8.6. DISCUSSÃO

Alguns estudos avaliaram a suplementação com fontes ricas em AE sobre respostas produtivas e de desempenho em vacas (BOERMAN et al., 2017) e ovelhas leiteiras (TORAL et al., 2015). No entanto, não é de conhecimento deste autor estudos que avaliaram o efeito do AE em animais em desenvolvimento. Neste estudo observou-se que os animais do grupo AE apresentaram um aumento no teor do ácido láurico (C12:0) no tecido adiposo. Os mecanismos pelos quais isso ocorre não estão claros, mas este achado pode ser considerado benéfico pois estudos mostram que os AG de cadeia média, como é o caso C12:0, auxiliam na síntese de gordura do leite em vacas (VYAS et al., 2012) e têm sido associados a certos benefícios à saúde de quem consome (DAYRIT, 2015). Já o teor do próprio AE no tecido adiposo dos animais que receberam um suplemento rico nesse AG foi 33,7% menor ao final dos 70 dias de suplementação, embora não tenha sido testado neste estudo, o que pode ser

explicado pela digestibilidade do AE, que diminui à medida que sua inclusão na dieta aumenta (FERLAY et al., 1993 e BOERMAN et al., 2015) e assim, conseqüentemente sua absorção e disponibilidade no tecido adiposo também diminuem.

A adição de AE à dieta causa diminuição nos teores de AG sintetizados *de novo*, fato que pode explicar a ausência de observação dos AG de cadeia curta e da maioria de cadeia média no tecido adiposo (HANSEN E KNUDSEN, 1987).

Observamos também que o AE não foi capaz de alterar a expressão de genes envolvidos na síntese de AG (ACACA α e FASN), naqueles envolvidos em processos de internalização e transporte (LPL, FABP4 e CD36) de AG, nos envolvidos na regulação gênica (PPAR- γ), assim como em alguns genes envolvidos na síntese de triglicerídeos (DGAT e AGPAT). Em nosso estudo o único gene que demonstrou diferença na sua abundância no tecido adiposo de cordeiras suplementadas com AE comparadas ao Controle foi o gene GPAT (%). De acordo com Bernard e colaboradores (2006), esse gene é importante no processo final na síntese de gordura, pois os AG são esterificados ao glicerol via glicerol-3-fosfato aciltransferase (GPAT), a qual realiza a acetilação de glicerol-3-fosfato, considerado o primeiro passo para a síntese de triglicerídeos (GONZALEZ-BARO et al., 2006). Além disso, sabe-se que os níveis de expressão de GPAT são mais elevados no tecido adiposo e no fígado, apesar de expressos em outros tecidos como músculo, cérebro, rim e pulmão (COLEMAN et al., 2004; WANG et al., 2007).

Considerando que esperávamos que o AE fosse capaz de aumentar a abundância relativa de outros genes envolvidos na síntese de lipídeos no tecido adiposo, é necessário levar em conta as características no suplemento e sua ação no metabolismo dos animais. Um primeiro ponto seria os possíveis efeitos hipofágicos que podem ocorrer com a suplementação com AG saturados, embora tais efeitos sejam mais pronunciados na utilização de fontes insaturadas de gordura (HARVATINE et al., 2005). Além disso, a digestibilidade do suplemento pode ter influenciado nos resultados que encontramos, uma vez que conforme ocorre um aumento na chegada de AE ao duodeno, há um decréscimo linear da digestibilidade desse AG (BOERMAN et al., 2015), pois estudos têm sugerido que o AE pode ter baixa solubilidade e isso prejudicaria sua incorporação às micelas, reduzindo assim a absorção (PANTOJA et al. 1995).

Piantoni et al. (2015) calcularam a digestibilidade do suplemento com AE descrevendo uma digestibilidade de apenas 28,4%, ressaltando a baixa transferência do AE para gordura do leite, quando comparado com a suplementação de outros AG, como por exemplo C16:0, o que possivelmente também pode acontecer com o tecido adiposo. Em adição, é preciso considerar que as características físicas (granulometria) do suplemento possam ter influenciado na sua digestibilidade (RICO et al., 2014).

Além disso, estudos sugerem que a ausência de efeitos oriundos da suplementação de AG em ovelhas pode estar relacionada ao tempo de suplementação (HORSTMANN et al., 2021), no entanto, pesquisas com duração média entre quatro e sete semanas observaram alterações na composição do perfil de AG e na expressão gênica (TORAL et al., 2010; GÓMEZ-CORTÉS et al., 2011 e CASTRO-CARRERA et al., 2015).

Portanto, pode ser esperado que mudanças na abundância de genes de mRNA envolvidos no metabolismo lipídico também seriam mais facilmente observados após períodos relativamente longos de suplementação, no entanto em nossa pesquisa o tempo de fornecimento do AE foi maior do que em outros estudos e ainda assim os efeitos do AE não foram expressivos.

Além da possível digestibilidade reduzida do AE é plausível considerar que a ausência de efeitos na expressão da maioria dos genes lipogênicos pode estar também relacionada ao balanço energético positivo dos animais, pois dados anteriores em vacas mostraram que uma alta disponibilidade de AG exógeno (através de infusão duodenal de óleo de colza) não teve efeito nas atividades lipogênicas do tecido adiposo durante o início da lactação, mas causou redução após o pico de lactação, quando se observou que a atividade aumentou devido à variação no balanço energético (CHILLIARD et al, 1991).

8.7. CONCLUSÃO

O AE modifica parcialmente o perfil de AG do tecido adiposo de cordeiras. Além disso, o AE não altera a expressão da maioria dos genes envolvidos na síntese e transporte de AG, exceto o gene GPAT, crucial na síntese de triglicerídeos.

8.8. REFERÊNCIAS

BARTOW, S. Use of the autopsy to study ontogeny and expression of the estrogen receptor gene in human breast. *J. Mam. Gland Biol. Neoplasia*, v. 3, p. 37-48, 1998.

BERNARD, L.; LEROUX, C.; CHILLIARD, Y. Characterisation and nutritional regulation of the main lipogenic genes in the ruminant lactating mammary gland. In: SEJRSEN, K.; HVELPLUND, T.; NIELSEN, M.O. (Eds.). *Ruminant Physiology*. Academic, Wageningen, pp. 295-326, 2006.

BIONAZ, M.; THERING, B. J.; LOOR, J. J. Fine metabolic regulation in ruminants via nutrient-gene interactions: saturated long-chain fatty acids increase expression of genes involved in lipid metabolism and immune response partly through PPAR- α activation. *British Journal of Nutrition*, v. 107, n. 02, p. 179-191, 6 jul. 2011. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0007114511002777>.

BOERMAN, J. P.; FIRKINS, J. L.; ST-PIERRE, N. R.; LOCK, A. L. Intestinal digestibility of long-chain fatty acids in lactating dairy cows: A meta-analysis and meta-regression. *J. Dairy Sci.*, v. 98, p. 8889-8903, 2015.

BOERMAN, J.P.; SOUZA, J. DE; LOCK, A.L. Milk production and nutrient digestibility responses to increasing levels of stearic acid supplementation of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v. 100, n. 4, p. 2729-2738, American Dairy Science Association, 2017.

CASTRO-CARRERA, T. et al. Dietary sunflower oil modulates milk fatty acid composition without major changes in adipose and mammary tissue fatty acid profile or related gene mRNA abundance in sheep. *Animal*, v. 9, n. 4, p. 582–591, 2015.

CHILLIARD, Y.; GAGLIOSTRO, G.; FLECHET, J.; LEFAIVRE, J.; SEBASTIAN, I. Duodenal Rapeseed Oil Infusion in Early and Midlactation Cows. 5. Milk Fatty Acids and Adipose Tissue Lipogenic Activities. *Journal of Dairy Science*, v. 74, n. 6, p. 1844–1854, 1991. doi:10.3168/jds.s0022-0302(91)78349-5.

COLEMAN, R.A.; LEE, D.P. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog Lipid Res*, v. 43, p. 134–176, 2004.

DAYRIT, F.M. The properties of lauric acid and their significance in coconut oil. *J Am Oil Chem Soc*, v. 92, p. 1–15, 2015.

de AGUIAR, G.C. et al. Stearic acid does not overcome conjugated linoleic acid trans-10, cis-12-induced milk fat depression in lactating ewes. *Br J Nutr.*, v. 2021 Oct 27:1-7. doi: 10.1017/S000711452100430X.

de SOUZA, J. DE; PRESEAU, C.L.; LOCK, A.L. Altering the ratio of dietary palmitic, stearic, and oleic acids in diets with or without whole cottonseed affects nutrient digestibility, energy partitioning, and production responses of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v. 101, n. 1, p. 172-185, jan. 2018. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-13460>.

GÓMEZ-CORTÉS, P. et al. Effects of different forage: concentrate ratios in dairy ewe diets supplemented with sunflower oil on animal performance and milk fatty acid profile. *J. Dairy Sci.*, v. 94, n. 9, p. 4578-4588, set. 2011. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2010-3803>.

GONZALEZ-BARO, M.R. et al. Regulation of Triglyceride Metabolism II. Function of mitochondrial GPAT1 in the regulation of triacylglycerol biosynthesis and insulin action. *Ajp: Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 292, n. 5, p. 1195-1199, 2006.

HANSEN, H.O.; KNUDSEN, J. Effect of Exogenous Long-Chain Fatty Acids on Lipid Biosynthesis in Dispersed Ruminant Mammary Gland Epithelial Cells: Esterification of Long-Chain Exogenous Fatty Acids. *Journal Of Dairy Science*, v. 70, n. 7, p. 1344-1349, jul. 1987.

HARVATINE, K.J.; ALLEN, M.S. The Effect of Production Level on Feed Intake, Milk Yield, and Endocrine Responses to Two Fatty Acid Supplements in Lactating Cows. *J. Dairy Sci.*, v. 88, n. 11, p. 4018-4027, nov. 2005. American Dairy Science Association. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(05\)73088-5](http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(05)73088-5).

HORSTMANN, R.; AGUIAR, G.C. DE; RIBEIRO, C.V.D.M.; OLIVEIRA, D.E. Stearic acid (C180) reduces the expression of lipogenic genes and productivity in late lactating dairy ewes. *Small Ruminant Research*, v. 195, p. 1-5, 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2020.106296>.

HUSSEIN, M.; HARVATINE, K.H.; WEERASINGHE, W.M.P.B.; SINCLAIR, L.A.; BAUMAN, D.E. Conjugated linoleic acid-induced milk fat depression in lactating ewes is accompanied by reduced expression of mammary genes involved in lipid synthesis. *Journal of Dairy Science*, v. 96, n. 6, p. 3825–3834, 2013. doi:10.3168/jds.2013-6576.

JENKINS, T.C. Lipid Metabolism in the Rumen. *Journal Of Dairy Science*, v. 76, n. 12, p. 3851-3863, dez. 1993.

LOFTEN, J.R. et al. Invited review: Palmitic and stearic acid metabolism in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v. 97, n. 8, p. 4661-4674, 2014. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-7919>.

PANTOJA, J.; FIRKINS, J.L.; EASTRIDGE, M.L. Site of digestion and milk production by cows fed fats differing in saturation, esterification, and chain length. *J. Dairy Sci.*, v. 78, p. 2247–2258, 1995.

PIANTONI, P.; LOCK, A.L.; ALLEN, M.S. Milk production responses to dietary stearic acid vary by production level in dairy cattle. *Journal Of Dairy Science*, v. 98, n. 3, p. 1938-1949, 2015.

STEELE, W.; MOORE, J.H. The effects of a series of saturated fatty acids in the diet on milk-fat secretion in the cow. *Journal Dairy Research*, v. 35, p. 361–370, 1968.

TICIANI, E. et al. Transcriptional regulation of acetyl-CoA carboxylase α isoforms in dairy ewes during conjugated linoleic acid induced milk fat depression. *Animal*, v. 10, p. 1677-1683, 2016.

TORAL, P.G. et al. Changes in milk fatty acid profile and animal performance in response to fish oil supplementation, alone or in combination with sunflower oil, in dairy ewes. *Journal Of Dairy Science*, v. 93, n. 4, p. 1604-1615, abr. 2010.

TORAL, P.G. et al. Comparison of the nutritional regulation of milk fat secretion and composition in cows and goats. *Journal of Dairy Science*, v. 98, n. 10, p. 7277-7297, out. 2015. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-9649>.

TORAL, P.G.; HERVÁS, G.; CARREÑO, D.; FRUTOS, P. Does supplemental 18:0 alleviate fish oil-induced milk fat depression in dairy ewes? *Journal Of Dairy Science*, v. 99, n. 2, p. 1-13, dez. 2016.

VYAS, D.; TETER, B.B.; ERDMAN, R.A. Milk fat responses to dietary supplementation of short- and medium-chain fatty acids in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, v. 95, p. 5194–5202, 2012. doi: 10.3168/jds.2011-5277.

WANG, S.; LEE, D.P.; GONG, N.; SCHWERBROCK, N.M.; MASHEK, D.G.; GONZALEZ-BARÓ, M.R.; STAPLETON, C.; LI, L.O.; LEWIN, T.M.; COLEMAN, R.A. Cloning and functional characterization of a novel mitochondrial N-ethylmaleimide-sensitive glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT2). *Arch Biochem Biophys*, v. 465, p. 347–358, 2007.

CAPÍTULO IV

9. DIGESTIBILIDADE DO ÁCIDO ESTEÁRICO EM OVELHAS

9.1. RESUMO

O uso de fontes de gordura na suplementação de ruminantes é considerado prática comum. No entanto, a forma como cada ácido graxo (AG) é metabolizado varia conforme sua disponibilidade e digestibilidade. O objetivo desse estudo foi avaliar a digestibilidade do ácido esteárico (AE) no trato digestivo total em 8 ovelhas (50% Lacaune x 50% Texel), com 20 meses de vida, divididas através de um delineamento inteiramente casualizado, em dois tratamentos: 1) Controle e 2) AE (1,5% de AE no consumo de matéria seca). O experimento durou 21 dias, divididos entre 15 dias para adaptação das ovelhas ao tratamento e às bolsas coletoras de fezes e 6 dias destinados à coleta de dados. O consumo de silagem e ração e a produção de fezes foram medidos durante o período de 24 horas no decorrer dos seis dias. Duas vezes ao dia foram pesadas as sobras de alimentos e produção total individual de fezes, em seguida amostras diárias representativas de cada período foram coletadas e armazenadas. Ao final dos 6 dias formou-se uma amostra composta de cada animal para posterior análise da digestibilidade do AE. Para os cálculos foi considerada toda a ingestão de AE (dieta e suplemento) e a sua formação através da biohidrogenação (BH) ruminal. A análise estatística foi realizada pelo SAS (OnDemand for Academics) através do PROC MIXED e o tratamento foi classificado como efeito fixo e o animal como efeito aleatório. O tratamento com AE reduziu a sua digestibilidade (63,8%) comparado ao Controle (80,9%; $P = 0,0001$). No geral, este suplemento rico em AE possui baixa digestibilidade no trato gastrointestinal de ovinos.

Palavras chaves: Ácidos graxos, ruminantes, ovinos, nutrição.

9.2. ABSTRACT

The use of fat sources in the supplementation of ruminants is considered common practice. However, the way each fatty acid (FA) is metabolized varies according to its availability and digestibility. The objective of this study was to evaluate the digestibility of stearic acid (SA) in eight sheep (50% Lacaune x 50% Texel), aged 20 months, divided in a completely randomized design into two treatments: 1) Control and 2) SA (1.5% SA in dry matter intake). The experiment lasted 21 days, divided into 15 days for sheep adaptation to the treatment and feces collection bags, and 6 days for data collection. Silage and feed intake and feces production were measured over a 24-hour period during the six days. Twice a day, food leftovers and total individual feces production were weighed, then daily representative samples from each period were collected and stored. At the end of the six days, a composite sample was formed for each animal for subsequent SA digestibility analysis. Calculations considered total SA intake (diet and supplement) and its formation through ruminal biohydrogenation. Statistical analysis was performed using SAS (OnDemand for Academics) through PROC MIXED, with treatment classified as a fixed effect and the animal as a random effect. Treatment with SA impaired its digestibility (63.8%) compared to Control (80.9%; $P = 0.0001$). In general, this supplement rich in EA has low digestibility in the gastrointestinal tract of sheep.

Keywords: Fatty acids, ruminants, sheep farming, nutrition.

9.3. INTRODUÇÃO

O uso de lipídeos na alimentação animal é praticado principalmente como fonte de energia aos animais e com isso o efeito da suplementação de diversos ácidos graxos (AG) é estudado. O ácido esteárico (AE) vem sendo estudado e parece ser mais direcionado ao tecido adiposo, contribuindo para a melhoria no balanço energético dos animais através da participação na regulação do metabolismo lipídico (BIONAZ et al., 2011). No entanto, os mecanismos ligados às respostas do AE no metabolismo lipogênico de ruminantes ainda não são totalmente compreendidos (VELASCO et al., 2001) e existem diversos

questionamentos em relação ao efeito desse AG no organismo dos animais, uma vez que estudos relataram discrepâncias nos resultados, sendo que grande parte demonstraram ausência ou pouca influência desse AG em termos de produção e composição do leite (BOERMAN et al., 2017), desempenho animal, consumo de matéria seca ou em genes lipogênicos (HORSTMANN et al., 2021; AGUIAR et al., 2022; BESSANI et al., 2022).

Sabe-se que para que se observem os possíveis efeitos da suplementação com AE é necessário considerar que a disponibilidade e a digestibilidade são fatores determinantes para sua atuação no organismo animal. Considera-se que a ingestão de um nutriente pode variar conforme a disponibilidade e palatabilidade (YOUSUF et al., 2014) e a eficiência com que esse é utilizado pelo animal varia conforme a digestibilidade (YOUSUF et al., 2013). Estudos prévios utilizando suplementação rica em AE em níveis crescentes na dieta de vacas leiteiras demonstraram que ocorreu uma diminuição na digestibilidade deste AG e de outros, conforme o consumo (RICO et al., 2017). Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar a digestibilidade de um suplemento rico em AE em ovelhas.

9.4. MATERIAIS E MÉTODOS

9.4.1. Desenho experimental, animais e tratamentos

O estudo foi conduzido no Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (latitude: 27°47'32" S e longitude 50°18'23" W), e todos os procedimentos obtiveram aprovação do Comitê de Ética, sob o protocolo nº 8029060422. A duração do experimento foi de 21 dias, divididos entre 15 dias para adaptação das ovelhas ao tratamento e às bolsas coletoras de fezes, e 6 dias destinados à coleta de dados.

Foram utilizadas oito ovelhas (50% Lacaune x 50% Texel), com 20 meses de idade e peso vivo médio de $84,7 \pm 5,2$ kg, alocadas em um delineamento inteiramente casualizado em dois grupos: 1) Controle; e 2) AE (1,5% de AE no consumo de matéria seca). As ovelhas foram alojadas individualmente para evitar o compartilhamento de alimento. A composição do suplemento de AE pode ser consultada na Tabela 1.

Tabela 1. Perfil de ácidos graxos do suplemento lipídico rico em ácido esteárico.

Ácido graxo (AG)	%
C4:0	0,12
C14:0	0,08
C15:0	0,03
C16:0	9,68
C17:0	0,15
C18:0	86,98
C20:0	0,61
C21:0	0,02
C22:0	0,41
C23:0	0,04
C24:0	0,14
C18:1 <i>cis</i> -9	0,10
C18:2 <i>cis</i> -6	0,10
AG Poliinsaturados	0,10
AG Trans	0,00
AG Monoinsaturados	0,10
AG Saturados	98,27
AG Insaturados	0,20
AG Totais	98,47

Suplemento contendo 87% de C18:0 (Prius F100 Nat Dry, Auster Nutrição Animal Ltda., Hortolândia, São Paulo, Brasil).

9.4.2. Dieta e manejos

Todos os animais tiveram acesso livre à água e a dieta foi formulada conforme o SRNS (TEDESCHI et al., 2010), Tabela 2. Os tratamentos foram isoenergéticos e isoproteicos e o concentrado foi fornecido individualmente, sendo o AE inicialmente misturado a uma porção do concentrado para assegurar o consumo total do suplemento pelos animais. Após essa ingestão, os animais recebiam o restante do concentrado. A oferta de silagem e concentrado ocorreu de forma individualizada para garantir o consumo diário individual. A alimentação

foi disponibilizada duas vezes ao dia, numa taxa de 110% do consumo voluntário de matéria seca.

Tabela 2. Ingredientes e composição da dieta experimental.

	Tratamentos	
	Controle	AE
Ingredientes, % de MS		
Silagem de milho	69,3	68,6
Milho moído	9,6	7,4
Farelo de soja	14,9	15,8
Caulim	5,3	5,8
Mineral/ mix vitamínico	0,9	0,8
Composição química, % de MS		
MS	86,3	87,5
PB ¹	13,1	13,2
FDN ²	49,1	48,5
CNE ³	24,9	23,4
Minerais	10,6	11,2
Extrato etéreo	3,4	4,7
AG totais ⁴	2,16	3,38
C18:0, % AG totais	5,39	6,81
EM ⁵ (Mcal/kg)	2,31	2,28
CMS estimado (kg/d)	2,19	2,19

¹Matéria seca; ²Proteína bruta; ³Fibra em detergente neutro; ⁴Carboidratos não estruturais;

⁵Ácidos graxos totais estimados de acordo com NASEM (2021); ⁶Energia metabolizável.

Além disso, antes do início do experimento os animais foram paramentados com arreios de bolsas coletoras de fezes (Figura 1) e passaram por adaptação à essas bolsas e ao manejo de coleta de fezes durante 15 dias. Por se tratar de fêmeas foi necessário fazer uso de sonda uretral para que a urina dos animais não se misturasse às fezes e comprometesse os resultados das análises. Com o auxílio de um espécuro vaginal e um mandril foi inserido uma sonda uretral tipo Foley (nº 14 ou 16 conforme o animal) e posteriormente essa foi acoplada a uma bolsa coletora de urina de 2 litros (Figura 1), a qual era esvaziada durante o dia sempre que necessário. As sondas foram colocadas somente nos 2 dias que antecederam o período de coletas pois um tempo prolongado com a sonda poderia gerar problemas aos animais.

Figura 1. Arreios com bolsas coletoras de fezes e bolsa coletora de urina.



9.4.3. Coletas

Após os 15 dias de adaptação, o consumo de silagem e concentrado foi medido durante o período de 24 horas no decorrer de seis dias de coleta. Duas vezes ao dia foram pesadas as sobras e retiradas amostras diárias de 100 g tanto da silagem oferecida quanto das sobras de silagem de cada animal. Ao término deste período de 6 dias formou-se uma amostra composta do alimento e uma amostra composta das sobras de cada animal. Simultaneamente, a produção total individual de fezes foi medida duas vezes ao dia e amostras diárias representativas (aproximadamente 20%) de cada período foram coletadas e armazenadas. Ao final dos 6 dias formou-se uma amostra composta de cada animal e cerca de 100 g foram coletadas para posterior análise da digestibilidade do AE. As amostras da dieta oferecida, das sobras e das fezes foram secas em estufa com ventilação forçada a $\pm 65^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas, moídas em peneira de 1,0 mm e armazenadas para análises posteriores.

9.4.4. Análises de perfil de ácidos graxos dos alimentos e das fezes

A silagem, a ração e as fezes foram pesadas (± 50 mg) e os AG metilados de acordo com Kramer et al. (1997), utilizando o metóxido de sódio e o cloreto

de acetila como catalisadores básico e ácidos, respectivamente. Os ésteres metílicos de AG resultantes foram determinados por meio de um cromatógrafo gasoso (modelo Focus GC; Termo Científico, Milão, Itália), equipado com detector de ionização de chamas e coluna capilar de sílica fundida SP-2560 (100 m x 25 mm x 0,2 µm de espessura de filme; Supelco, Bellefonte, Pennsylvania). O hidrogênio foi usado como gás transportador (1 ml/min) e o nitrogênio como gás auxiliar. As temperaturas do detector e do injetor foram 250°C, com o split de 15:1. A programação de temperatura do forno foi de 7°C por 4 min, com aumento de 13°C/min para 175°C, mantida por 27 min, com posterior aumento de 4°C/min para 215°C e mantida por 31 min (Kramer *et al.*, 1997). Os ésteres metílicos de AG foram identificados por comparação com três referências (Mistura Supelco FAME # C4-C24, CLA trans-9, cis 11 # 16413, e CLA trans-10, cis 12 # 04397; Sigma Aldrich). Os isômeros *cis/trans*-18:1 foram identificados de acordo com sua ordem de eluição relatada sob as mesmas condições cromatográficas (Kramer *et al.*, 2002).

9.4.5. Análises de extrato etéreo dos alimentos e das fezes

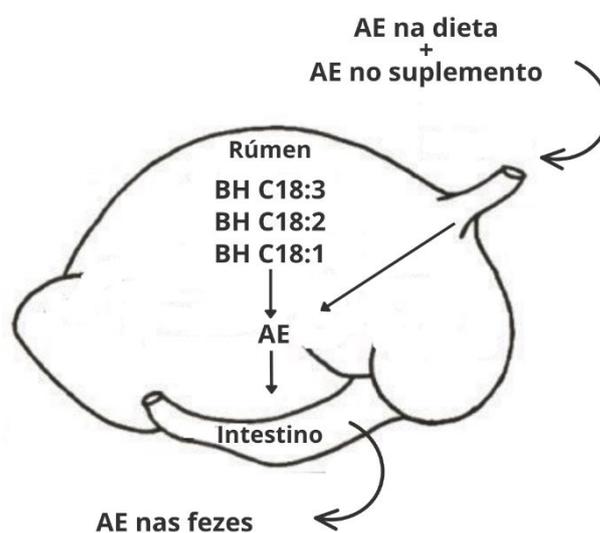
Uma porção das amostras secas e moídas foi extraída por um processo de duas etapas: Na primeira etapa, o cartucho contendo a porção da amostra foi imerso no solvente em ebulição. A mistura da matriz com o solvente quente garante a rápida solubilização dos extraíveis. O cartucho foi então elevado acima do solvente e a porção de teste foi extraída por um fluxo contínuo de solvente condensado. O solvente é evaporado e recuperado por condensação (Extrator de Gordura Automático - Modelo SER 158 - Marca VELP). O resíduo de gordura bruta resultante é determinado gravimetricamente após secagem.

9.4.6. Cálculos e análise estatística

Para os cálculos de digestibilidade aparente do AE foi necessário inicialmente obter o valor de extrato etéreo (EE) da dieta e das fezes e posteriormente identificar o percentual de AG no EE. Para isso se considerou que no concentrado 90,1% do EE é composto por AG (DALEY *et al.*, 2020) e na silagem esse valor corresponde a 61% (DALEY *et al.*, 2020), já para fezes se estabeleceu que a proporção de AG equivale a 36,20 mg para cada 1 grama de fezes (Sukhija e Palmquist, 1988). Além disso, foi necessário estimar o valor de AE oriundo da BH ruminal dos AG C18:1, C18:2 e C18:3 provenientes da dieta

basal ou do suplemento, considerando que a extensão total da BH desses AG é 82,8, 90,4 e 88,6%, respectivamente (BALDIN et al, 2022). Vale destacar que esses valores referem-se a taxa de desaparecimento dos AG C18:1, C18:2 e C18:3 e que o produto final da BH desses AG é, em sua maior proporção, o AE. A forma de obtenção do AE total disponível nas fezes é mostrada na Figura 2.

Figura 2. Desenho esquemático da metodologia de estimativa do ácido esteárico (AE) disponível para absorção intestinal nos animais que receberam o suplemento rico em neste ácido graxo.



BH: Biohidrogenação; C18:3: ácido linolênico; C18:1: ácido linoleico; C18:1: ácido oleico. A mesma metodologia foi utilizada nos animais do grupo controle, exceto o fornecimento de ácido esteárico através de suplementação.

Posteriormente utilizou-se a seguinte fórmula para análise do maior potencial de digestibilidade total de AE oriundo da dieta, do suplemento e da BH:

$$\% \text{ Digestibilidade} = \frac{\text{AE consumido} + \text{BH (g)} - \text{AE excretado nas fezes (g)}}{\text{AE consumido ou BH (g)}} \times 100$$

Em seguida com os dados obtidos a análise estatística foi realizada pelo SAS (OnDemand for Academics) considerando um nível de significância quando

$P \leq 0,05$ e tendência quando $P > 0,05$ e $< 0,10$. As análises foram realizadas através do PROC MIXED e o tratamento foi classificado como efeito fixo e o animal como efeito aleatório.

Os resíduos estudentizados fora de $\pm 3,0$ foram considerados “outliers” e excluídos da análise estatística. A normalidade dos dados foi confirmada através do teste de Shapiro-Wilk.

9.5. RESULTADOS

9.5.1. Consumo de matéria seca e produção de fezes

O CMS de concentrado foi maior nos animais do grupo AE quando comparado ao Controle ($P = 0,037$). O consumo de matéria seca (CMS) de silagem e a produção de fezes não diferiram entre os tratamentos conforme mostrado na Tabela 3.

Tabela 3. Efeito da suplementação com ácido esteárico sobre consumo de matéria seca e produção de fezes.

	Tratamentos ^a		EPM ^h	P- Valor ⁱ
	CON	AE		
CMS conc (kg/dia) ^b	0,335	0,422	0,005	0,0372
CMS sil (kg/dia) ^c	0,638	0,742	0,064	0,4088
Produção de fezes (MS/kg/dia) ^d	0,320	0,364	0,013	0,2028

^aOs tratamentos foram Controle e AE com o fornecimento de 28,6 g/animal/dia (C18:0) na dieta;

^bCMS conc: Consumo de matéria seca de concentrado, medido individualmente; ^cCMS sil: Média do Consumo de matéria seca de silagem de milho, medido individualmente; ^dProdução individual de fezes expressas em matéria seca; ^hErro padrão da média; ⁱNível de significância ($P < 0,05$).

9.5.2. Consumo e digestibilidade do ácido esteárico

O consumo de AE oriundo da silagem não diferiu entre os tratamentos ($P = 0,1993$), no entanto o maior consumo de concentrado pelos animais

suplementados consequentemente ocasionou um maior consumo de AE ($P = 0,0001$). Além disso, o animais do tratamento AE apresentaram maior BH estimada do C18:1 ($P = 0,0031$) quando comparado aos animais do tratamento Controle. Não houve diferença na formação AE proveniente da BH dos AG C18:3 ($P = 0,8379$) e C18:2 ($P = 0,2446$) entre os tratamentos.

Os animais do tratamento AE apresentaram maiores teores desse AG nas fezes quando comparado aos animais do grupo Controle ($P = 0,0001$) e houve diferença na digestibilidade do AE entre os tratamentos ($P = 0,0001$). Os animais que receberam o suplemento rico em AE apresentaram menor digestibilidade do AE ($63,8\% \pm 6,9$) comparado ao Controle ($80,9\% \pm 9,0$), $P = 0,0001$. Vale destacar que o AE disponível nas fezes para essa avaliação da digestibilidade é proveniente da dieta, da BH ruminal (taxa de desaparecimento do C18:3, C18:2 e C18:1) em ambos os tratamentos e da suplementação no grupo que recebeu AE (Tabela 4). A digestibilidade do AE exclusivamente do suplemento, removeu-se do cálculo o percentual de AE disponível na dieta e nas fezes que fossem oriundos da alimentação e da BH, observamos uma digestibilidade de 63,6% (Tabela 5).

Tabela 4. Consumo, biohidrogenação estimada, excreção e digestibilidade do ácido esteárico.

	Tratamento		EPM ⁵	P – Valor ⁶
	CON	AE		
Fonte de C18:0 (g)				
Suplemento (1,5% CMS)	-	28,60	-	-
Concentrado	0,52	0,96	0,001	0,0001
Silagem	1,91	2,22	0,024	0,1993
BH C18:3 ¹	2,95	2,92	0,027	0,8379
BH C18:2 ²	12,28	11,10	0,022	0,2446
BH C18:1 ³	7,84	9,70	0,077	0,0031
Total ⁴	25,51	55,49	0,050	0,0001
C18:0 nas fezes (g)	4,89	20,07	0,1718	0,0001
Digestibilidade (%)	80,9	63,8	0,055	0,0001

Tratamentos foram Controle (CON) e AE (1,5% do CMS – 28,6 g de AE). ¹Formação de C18:0 através da biohidrogenação estimada do C18:3; ²Formação de C18:0 através da

biohidrogenação estimada do C18:2; ³Formação de C18:0 através da biohidrogenação estimada do C18:1; ⁴Somatório de C18:0 oriundo da dieta, suplementação e biohidrogenação ruminal estimada. ⁵Erro padrão da média; ⁶Nível de significância ($P < 0,05$).

Tabela 5. Digestibilidade do ácido esteárico suplementado.

	Tratamento
	AE
Fonte de C18:0 (g)	
Suplemento (1,5% CMS)	28,6
C18:0 nas fezes (g)	10,4
Digestibilidade (%)	63,6

Digestibilidade do AE exclusivamente do suplemento (1,5% do CMS – 28,6 g de AE).

9.6. DISCUSSÃO

Existe uma grande complexidade ao avaliar a digestibilidade do AE, uma vez que esse é produzido através de outros AG por meio da BH e dessa forma é necessário considerar não somente o AE suplementado, mas também o AE produzido no rúmen. Dessa maneira, optamos por avaliar o potencial máximo de digestibilidade do AE através dos valores de BH obtidas por Baldin et al. (2022), sendo de 82,8, 90,4 e 88,6% para C18:1, C18:2 e C18:3, respectivamente. Esses valores consideram a taxa de desaparecimento do C18:1, C18:2 e C18:3 e nisso inclui-se a formação principal de AE, mas sabe-se que há outros AG intermediários.

A conversão de C18:1 em AE é variável (JENKINS et al., 2008), mas varia em torno de 80% (WHITE et al., 1970). E entre seus possíveis intermediários 90% dos isômeros *cis*-2, *cis*-4 e *cis*-5, e 79% do *cis*-11 e dos isômeros *trans*, 45% de *trans*-8, *trans*-9, e *trans*-10 são convertidos em AE (KEMP et al., 1984).

Da mesma forma, aproximadamente 80% do C18:2 é convertido para AE (White et al., 1970) e a conversão de C18:2 em AE incluiu apenas 2 intermediários, que são o CLA *cis*-9, *trans*-11 e 18:1 *trans*-11 (RIBEIRO et al., 2007).

Já o C18:3 é transformado inicialmente em 18:3 *cis*-9, *trans*-11, *cis*-15 e posteriormente hidrogenado em 18:2 *trans*-11, *cis*-15, em seguida ocorre a formação de isômeros do C18:1 e o produto é o AE (HARFOOT e HAZLEWOOD, 1988).

Dessa maneira observamos que apesar de ocorrer a formação de intermediários, boa parte desses são convertidos em AE também, e assim avaliar o potencial máximo da digestibilidade do AE através da taxa de desaparecimento do C18:3, C18:2 e C18:1 pode parecer uma abordagem possível.

Em estudos anteriores usando essa mesma fonte de AE em ovelhas lactantes ou cordeiras, foi observado a ausência de efeitos ou efeitos pouco expressivos, em termos de produção e composição do leite, expressão de genes lipogênicos no tecido adiposo e na glândula mamária, assim como no perfil de AG do tecido adiposo e deposição de gordura corporal de ovinos. Dessa forma, consideramos que umas das possíveis causas estariam relacionadas à baixa digestibilidade do AE ou à baixa solubilidade do suplemento, consequentemente causando pouco aproveitamento pelo organismo animal.

De fato, observamos que a digestibilidade de 80,9% do AE demonstrada em nosso estudo pelos animais do grupo Controle é maior ($P = 0,0001$) que a apresentada pelos animais que receberam esse AG (63,8%). Semelhante ao observado em nossa pesquisa, uma meta-análise citou que a digestibilidade do AE é de 81,9% em vacas leiteiras não suplementadas com fontes de gordura, já a digestibilidade em animais que receberam suplementação com AE é relativamente menor, sendo de 72,8% através de coleta ileal e de 73,7% através de coleta fecal em bovinos em lactação (BOERMAN et al., 2015).

Avaliar a digestibilidade dos AG é importante para o desenvolvimento de estratégias de formulação de dietas e oferece informações essenciais para a suplementação ajustada de AG. No entanto, a digestibilidade de um suplemento de gordura é influenciada por fatores como taxa de alimentação, nível de gordura basal na ração e perfil de AG (BOERMAN et al., 2015; DALEY et al., 2020) e também pode ser afetada pelo nível de ingestão e outros fatores específicos, dificultando a compreensão da digestibilidade (SHEPARDSON E HARVATINE, 2021).

Apesar de a maioria dos estudos que avaliam a digestibilidade do AE relatarem que a diminuição da digestibilidade desse AG é diretamente

proporcional ao seu aumento no fluxo duodenal (FERLAY et al., 1993), os mecanismos que causam a diminuição da digestibilidade de um determinado suplemento podem variar pelas suas características químicas e físicas, pois estas influenciam na forma como o suplemento é absorvido pelo organismo (ELLIOTT et al., 1994; PANTOJA et al., 1995; RICO et al., 2014). O suplemento utilizado em nossa pesquisa é um produto comercial de aparência perolizada e foi obtido através da hidrogenação do óleo de soja, seguido de um processo de atomização semelhante ao da secagem do leite em pó. Essas características, apesar de não testadas em nosso estudo, devem ser consideradas como possíveis influências da baixa digestibilidade do suplemento.

O óleo de soja em sua forma natural é formado principalmente por ácido linolênico, linoleico, oleico, palmítico e esteárico (GERDE et al., 2020), entretanto, após o processo de hidrogenação completa se torna majoritariamente AE (KARABULUT, 2003). Esse processo de hidrogenação na obtenção do suplemento pode ser um fator determinante na digestibilidade do AG, pois o torna inerte no rúmen, mas muitas vezes diminui sua digestibilidade no intestino delgado (FIRKINS e EASTRIDGE, 1994). A saturação dos AG, assim como a esterificação, afeta o uso de gorduras na alimentação animal, no entanto, fontes de gordura hidrogenada de diferentes graus de saturação podem ter diferentes efeitos e as dietas ricas em AG com menor grau de saturação do que o AE possuem maior digestibilidade (WEISBJERG et al., 1992). O grau de esterificação dos suplementos de gordura tem sido sugerido como um fator que pode afetar a digestibilidade dos AG e, conseqüentemente, as respostas produtivas dos animais suplementados (ELLIOTT et al., 1994; PANTOJA et al., 1995)

Além da interferência do processo de hidrogenação e esterificação do suplemento sobre a digestibilidade, o tamanho das partículas hidrogenadas também podem afetar a digestão dos AG (PANTOJA et al., 1996), pois o tamanho das partículas pode limitar a área de superfície disponível para digestão, diminuindo sua digestibilidade geral (RICO et al., 2014). Em nosso estudo não mensuramos o tamanho das partículas do suplemento que utilizamos, entretanto essa característica pode afetar a digestibilidade pois uma pesquisa anterior utilizando gordura hidrogenada em flocos indicou que o tamanho das partículas era crítico para a digestibilidade (MACLEOD e

BUCHANAN-SMITH, 1972) uma vez que fontes de gordura parcialmente hidrogenada em forma granulada ou em flocos para vacas em lactação demonstram digestibilidades totais de AG de 45,7 e 36,7%, respectivamente (FIRKINS E EASTRIDGE, 1991). No entanto, outros pesquisadores relataram digestibilidades de AG semelhantes em vacas alimentadas com suplemento granulado ou em flocos e em adição afirmam que a composição química da fonte de gordura parece ser mais influente na digestibilidade do AG do que o tamanho das partículas (ELLIOTT et al., 1994).

Ainda, além das características físicas do suplemento, estudos descrevem que a digestibilidade total dos AG diminui à medida que a quantidade de AG saturados na dieta aumenta (BOERMAN et al., 2017; CHAMBERLAIN E DEPETERS, 2017) e que o AE pode ter baixa solubilidade, prejudicando sua incorporação às micelas e reduzindo a absorção (PANTOJA et al. 1995; DRACKLEY, 2000). Como exemplo, tanto AG com menores números de cadeias de carbono (C16:0) quanto AG monoinsaturados (C18:1) são mais hidrofílicos e formam micelas mais facilmente do que AE (WU et al., 1992). De acordo com Dracley et al., (2000), as possíveis causas para essa redução na digestibilidade incluem limitações na emulsificação pela lisolecitina ou competição por sítios de absorção. A lisolecitina atua como um anfifílico para os AG saturados, auxiliando na solubilidade e permitindo uma melhor absorção (FREEMAN et al., 1969). Além disso, compostos anfifílicos têm a capacidade de expandir o tamanho da micela e seu interior hidrofóbico, o que pode permitir uma maior incorporação de AG na micela, aumentando assim a digestibilidade desses (FREEMAN et al., 1969). Em adição, a absorção de AG saturados de cadeia longa também foi relatada como sendo baixa no intestino delgado devido ao seu alto ponto de fusão em relação à temperatura corporal (CHENG et al. 1949).

Em estudos futuros e em busca de uma melhor digestibilidade desse AG vale considerar o uso de um agente solubilizante, pois a redução na absorção desse AG possivelmente esteja relacionada à limitada solubilização pelas micelas intestinais, limitando a absorção e reesterificação nos enterócitos (OCKNER et al., 1972). Em um estudo com vacas leiteiras a infusão de curto prazo de um emulsificante exógeno melhorou a digestibilidade dos AG e as respostas de produção de gordura do leite em animais que receberam gorduras saturadas (SOUZA et al., 2020). Uma outra alternativa para tentar melhorar a

digestibilidade seria o uso de AG insaturados adicionais para ajudar na melhora da solubilização e absorção do AE (SHEPARDSON E HARVATINE, 2021), pois trabalhos recentes relatam que o uso de ácido oleico aumenta digestibilidade geral dos AG (PROM et al., 2018).

Por fim, em nosso estudo não observamos diminuição no CMS devido a suplementação lipídica, pois o efeito hipofágico da alimentação com gordura parece ser mais pronunciado para suplementos ricos em AG insaturados do que para aqueles formados principalmente por AG saturados (HARVATINE E ALLEN, 2006), já que o CMS parece diminuir linearmente conforme o grau de insaturação aumenta (DRACKLEY et al., 1992; PANTOJA et al., 1994), já que os AG insaturados geralmente têm maior digestibilidade do que os AG saturados, o que pode ser devido à maior solubilidade dos AG insaturados, facilitando a transferência dos AG para as micelas (FREEMAN, 1969).

Com base nisso podemos considerar que, além do perfil de AG do suplemento, a forma química, o grau de hidrogenação e o tamanho das partículas parecem ser fatores importantes para calcular a digestibilidade do AG.

9.7. CONCLUSÃO

A suplementação com fontes ricas em AE diminui a digestibilidade do AE oriundo também da dieta e da biohidrogenação ruminal.

9.8. REFERÊNCIAS

BALDIN, M. et al. In vivo kinetics of oleic, linoleic, and α -linolenic acid biohydrogenation in the rumen of dairy cow. *Journal of Dairy Science*, Volume 105, Issue 9, 7373 – 7385, 2022.

BOERMAN, J. P., J. L. FIRKINS, N. R. ST-PIERRE, and A. L. LOCK. Intestinal digestibility of long-chain fatty acids in lactating dairy cows: A meta-analysis and meta-regression. *J. Dairy Sci.* 98:8889– 8903, 2015.

BOERMAN, J.P.; SOUZA J. DE; LOCK A.L. Milk production and nutrient digestibility responses to increasing levels of stearic acid supplementation of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, [s.l.], v. 100, n. 4, p. 2729-2738, American Dairy Science Association, 2017.

CHAMBERLAIN, M. B., and E. J. DEPETERS. Impacts of feeding lipids supplements high in palmitic acid or stearic acid on performance of lactating dairy cows. *J. Appl. Anim. Res.* 45:126–135, 2017. <https://doi.org/10.1080/09712119.2015.1124327>

CHENG ALS, MOREHOUSE MG & DEUEL HJ JR. The effect of the level of dietary calcium and magnesium on the digestibility of fatty acids, simple triglycerides, and some natural and hydrogenated fats. *Journal of Nutrition* 37, 237-250, 1949.

de SOUZA, J. DE; PRESEULT, C.L.; LOCK, A.L.. Altering the ratio of dietary palmitic, stearic, and oleic acids in diets with or without whole cottonseed affects nutrient digestibility, energy partitioning, and production responses of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v. 101, n. 1, p. 172-185, jan. 2018. doi: 10.3168/jds.2017-13460.

de SOUZA, J., WESTERN, M., & LOCK, A. L. Abomasal infusion of an exogenous emulsifier improves fatty acid digestibility and milk fat yield of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2020. doi:10.3168/jds.2020-18239

DRACKLEY, J. K., T. H. KLUSMEYER, A. M. TRUSK, and J. H. CLARK. 1992. Infusion of long-chain fatty acids varying in saturation and chain length into the abomasum of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 75:1517–1526, 1992. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)77908-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)77908-9).

DRACKLEY, J. K. Lipid Metabolism. Pp. 97–119 in Farm Animal Metabolism and Nutrition. J. P. F. D'Mello, ed. CABI Publishing, New York, NY, 2000.

EASTRIDGE, M. L., and FIRKINS, J. L. Feeding tallow triglycerides of different saturation and particle size to lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 75(Suppl. 1): 172.(Abstr.), 1992.

ELLIOTT, J. P., T. R. OVERTON, and J. K. DRACKLEY. Digestibility and effects of three forms of mostly saturated fatty acids. *J. Dairy Sci.* 77:789–798, 1994. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77014-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77014-4).

FERLAY, A., J. CHABROT, Y. ELMEDDAH, M. DOREAU. Ruminal lipid balance and intestinal digestion by dairy cows fed calcium salts of rapeseed oil fatty acids or rapeseed oil. *J. Anim. Sci.*, 71, pp. 2237-2245, 1993.

FIRKINS, J. L. and EASTRIDGE, M. L. Assessment of effects of iodine value on fatty acid digestibility, feed intake and milk production. *J. Dairy Sci.* 77: 2357, 1994.

FREEMAN C.P. Properties of fatty acids in dispersions of emulsified lipid and bile salt and the significance of these properties in fat absorption in the pig and the sheep. *Br. J. Nutr.* 23 (5815147): 249-263, 1969. <https://doi.org/10.1079/BJN19690032>.

GERDE, J. A., HAMMOND, E. G., JOHNSON, L. A., SU, C., WANG, T., & WHITE, P. J. Soybean Oil. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, 1 68, 2020.

HARFOOT, C. G., AND G. P. HAZLEWOOD. Lipid metabolism in the rumen. Pages 285–322 in *The Rumen Microbial Ecosystem*. Elsevier Science Publishing, New York, NY, 1988.

HARVATINE, K. J., and M. S. ALLEN. Effects of fatty acid supplements on ruminal and total tract nutrient digestion in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89:1092–1103, 2006.

JENKINS, T. C., WALLACE, R. J., MOATE, P. J., & MOSLEY, E. E. BOARD-INVITED REVIEW: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *Journal of Animal Science*, 86(2), 397–412. [doi:10.2527/jas.2007-0588](https://doi.org/10.2527/jas.2007-0588), 2008.

KARABULUT, I. Determination of changes in some physical and chemical properties of soybean oil during hydrogenation. *Food Chemistry*, 81(3), 453–456, 2003.

KEMP, P., D. J. LANDER, AND F. D. GUNSTONE. The hydrogenation of some cis- and trans-octadecenoic acids to stearic acid by a rumen *Fusocillus* sp. *Br. J. Nutr.* 52:165–170, 1984.

MACLEOD, G. K., and BUCHANAN-SMITH, J. G. Digestibility of hydrogenated tallow, saturated fatty acids, and soybean oil-supplemented diets by sheep. *J. Anim. Sci.* 35:890, 1972.

OCKNER R.K., PITTMAN J.P., YAGER J.L. Differences in the intestinal absorption of saturated and unsaturated long chain fatty acids. *Gastroenterology*. 62 (5029081): 981-992, 1972. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(72\)80115-X](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(72)80115-X)

PANTOJA, J., J. L. FIRKINS, M. L. EASTRIDGE, and B. L. HULL. Effects of fat saturation and source of fiber on site of nutrient digestion and milk production. *J. Dairy Sci.* 77:2341–2356, 1994.

PANTOJA, J., J. L. FIRKINS, and M. L. EASTRIDGE. Site of digestion and milk production by cows fed fats differing in saturation, esterification, and chain length. *J. Dairy Sci.* 78:2247–2258, 1995.

PROM, C.M. , NEWBOLD, J., LOCK, A.L. Impact of abomasal infusion of oleic acid on fatty acid digestibility and milk production of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 101 (Suppl. 2), p. 159, 2018.

RIBEIRO, C. V., M. L. EASTRIDGE, J. L. FIRKINS, N. R. ST-PIERRE, AND D. L. PALMQUIST. Kinetics of fatty acid biohydrogenation in vitro. *J. Dairy Sci.* 90:1405–1416, 2007.

RICO, J. E., M. S. ALLEN, and A. L. LOCK. Compared with stearic acid, palmitic acid increased the yield of milk fat and improved feed efficiency across production level of cows. *J. Dairy Sci.* 97:1057–1066, 2014.

SHEPARDSON, R.P. and HARVATINE K.J. Effects of fat supplements containing different levels of palmitic and stearic acid on milk production and fatty acid digestibility in lactating dairy cows, *Journal of Dairy Science*, v. 104, Issue 7, 7682-7695, 2021.

WEISBJERG. M. R., T. HVELPLUND, e C. F. BORSTING. Digestibility of fatty acids in the gastrointestinal tract of dairy cows fed with tallow or saturated fats rich in stearic acid or palmitic acid. *Acta Agric. Scand.* 42:115, 1992.

WHITE, R. W., P. KEMP, AND R. M. C. DAWSON. Isolation of a rumen bacterium that hydrogenates oleic acid as well as linoleic and linolenic acid. *Biochem. J.* 116:767–768, 1970.

WU, Z., OHAJURUKA, O., e D, L. PALMQUIST. Ruminal synthesis, biohydrogenation, and digestibility of fatty acids by dairy cows. I. *Dairy Sci.* 74:3025, 1991.