



JESUS ALFONSO SÁNCHEZ VIAFARA

**USO DE ÓLEO À BASE DE LINHAÇA NA
DIETA E PERFIS DE ÁCIDOS GRAXOS DO
PLASMA E DO LÍQUIDO FOLICULAR EM
ÉGUAS MANGALARGA MARCHADOR**

LAVRAS - MG

2015

JESUS ALFONSO SÁNCHEZ VIAFARA

**USO DE ÓLEO À BASE DE LINHAÇA NA DIETA E PERFIS DE
ÁCIDOS GRAXOS DO PLASMA E DO LÍQUIDO FOLICULAR EM
ÉGUAS MANGALARGA MARCHADOR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do Título de Mestre.

Orientador

Dr. José Camisão de Souza

Coorientadora

Dra. Raquel Silva de Moura

LAVRAS-MG

2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Viafara, Jesus Alfonso Sánchez.

Uso de óleo à base de linhaça na dieta e perfis de ácidos graxos
do plasma e do líquido folicular em éguas Mangalarga Marchador /
Jesus Alfonso Sánchez Viafara. – Lavras : UFLA, 2015.

79 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de
Lavras, 2015.

Orientador: José Camisão de Souza.

Bibliografia.

1. Suplementação de PUFA. 2. Folículo ovariano. 3. Equídeos.
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

JESUS ALFONSO SÁNCHEZ VIAFARA

**USO DE ÓLEO À BASE DE LINHAÇA NA DIETA E PERFIS DE
ÁCIDOS GRAXOS DO PLASMA E DO LÍQUIDO FOLICULAR EM
ÉGUAS MANGALARGA MARCHADOR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do Título de Mestre.

APROVADA em 8 de junho de 2015.

Dr. Antonio Gilberto Bertechini, UFLA

Dra. Raquel Silva de Moura UFLA

Dr. Alvaro Mendes de Resende PUC

Dr. José Camisão de Souza
Orientador

LAVRAS - MG

2015

Ao Deus da vida, aos meus pais Alfonso Sánchez e Luz Daris Viafara, a minhas irmãs Mileydi e Yajahira, a meus sobrinhos, por alegrarem meus dias e ao maravilhoso país, Brasil, por oferecer esta oportunidade de avançar em meus estudos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço muito a Deus, porque desde que apareceu em minha vida modificou-a para sempre, ajudando a dar o sentido que ela merece; ajudou-me a ter fé em que sempre pode existir um futuro melhor e que depende de mim para que assim seja.

Aos meus pais, por sempre acreditarem em mim, pelo esforço e dedicação e por fazerem o melhor possível para seus filhos. Alfonso Sánchez, uma pessoa honesta e trabalhadora, da qual me sinto orgulhoso e minha amada Mãe Luz Daris Viafara, cheia de paciência e esforço no dia a dia, lutando para ser hoje em dia quem sou. Agradeço muito a vocês que são o meu porto seguro no mar da vida.

As minhas irmãs Mileydi e Yajahira, pelos conselhos que dão para mim, para que eu possa surgir em minha profissão, por sentirem-se orgulhosas de mim, eterna gratidão a vocês.

Aos meus sobrinhos Valentina, Alejandro, Sebastian, Dana Isabela e Juan Jose, por alegrarem meus dias desde seus nascimentos. Não posso mudar o mundo para vocês, mas sempre estarei do lado para dar a mão quando precisarem.

Ao maravilhoso país, Brasil, ao qual tenho muita gratidão. Em princípio não passava em minha cabeça poder vir aqui, mas tive a imensa sorte que Deus me deu em conhecê-lo. Minha permanência no Brasil só deu satisfações no plano profissional e pessoal.

As minhas colegas de estudo Gisvani Lopes e Renata Maculan, pela ajuda constante que me deram, nos momentos nos quais mais necessitava, tudo sempre de última hora, pelas palavras de ânimo que escutava de vocês, pelos conselhos sinceros e as correções para ser um melhor profissional.

Ao Professor José Camisão de Souza, pela orientação recebida, pela paciência no meu direcionamento no âmbito científico, por ter confiança em mim, e por transmitir-me seus conhecimentos. Admiro a sua formação, a qual ajuda-me a enriquecer meus estudos.

Ao Professor e Coordenador do Programa em Ciências Veterinárias o Doutor Márcio Zangerônimo, que acreditou em mim, mostrando que eu tinha capacidade de adiantar o mestrado.

À Professora Raquel Silva de Moura, por acreditar que eu podia finalizar este trabalho, por dar-me esse conselho no momento justo de meus estudos, a quem estou muito agradecido, pela paciência e pelas correções recebidas de uma excelente profissional.

A Paula Rodrigues e a Ricardo Vilhena, por iniciarem este experimento e por estarem sempre ao meu lado para resolver as dúvidas que surgiam diariamente, por sempre responderem a meus chamados, além de eu ter tido a oportunidade de conhecer as excelentes pessoas e profissionais que são vocês.

A Jéssica Silvestre, por me acompanhar nos processos e atividades do presente trabalho, por me dar forças para não desistir e me ajudar a decifrar tudo aquilo que não entendia. Desejo muito sucesso em seus estudos.

Ao CNPq, por conceder minha bolsa de estudos para garantir minha manutenção e desenvolvimento do mestrado, pois, caso contrário, não teria condições de realizar meus estudos. Sou imensamente agradecido.

E “a todos los amigos de Colombia y demás países que conocí, que hicieron que mi estancia fuese más agradable, deseo lo mejor de la vida para cada uno de ustedes y espero continuar teniendo contacto con todos, un gran abrazo”.

“É necessário abrir os olhos e perceber que as coisas boas estão dentro de nós, onde os sentimentos não precisam de motivos nem os desejos de razão. O importante é aproveitar o momento e aprender sua duração, pois a vida está nos olhos de quem saber ver”.

Gabriel García Márquez

RESUMO GERAL

Objetivou-se detectar a presença de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) na circulação sanguínea e no fluido folicular do ovário equino, como resultado da suplementação de óleo de linhaça na dieta. Foram utilizadas seis éguas Mangalarga Marchador entre 2,5 e 22 anos de idade, pesando $397 \pm 31,89$ kg e ECC entre 3 e 6,5, mantidas em pastagem nativa. No desenho experimental, as éguas foram alocadas aleatoriamente para receber 150 ml de óleo vegetal por dia, contendo PUFA n3 (62,23 g ALA, 20,34 g LA, 2,27 g EPA, DHA 2,32 g), (n = 3) ou sem suplementação (n = 3) numa primeira réplica. Quatro amostras de sangue e de fluido folicular foram tomadas no primeiro (D0) e a cada 10 dias até o fim do período de suplementação (D10-D30). Depois de um intervalo de 14 dias, as éguas foram trocadas entre os tratamentos para uma segunda repetição. Perfis lipídicos foram determinados por cromatografia gasosa. Os dados foram submetidos aos procedimentos MIXED e REG do SAS®. No plasma as concentrações de ácido linolênico ALN no total de ácidos graxos foram superiores ($P = 0,006$) nas suplementadas em comparação com o grupo controle ($1,89 \pm 0,13$ vs. $1,49 \pm 0,13\%$). No fluido folicular, as concentrações de ácido linoléico foram semelhantes entre os tratamentos ($10,9 \pm 2,23 \pm 7,61$ vs $2,22\%$) e em períodos ($5,75 \pm 3,33$, $12,87 \pm 4,09$ e $14,2 \pm 4,09\%$ para períodos de 1, 2 e 3 para o grupo suplementado, e $7,55 \pm 3,34$, $9,01 \pm 4,08$ e $6,27 \pm 4,08\%$, para o grupo controle, respectivamente). No entanto, as concentrações de DHA tenderam a ser maior ($P = 0,06$) no grupo controle. Houve correlações positivas entre o ácido linoleico e ácido araquidônico no plasma e no fluido folicular ($P = 0,0106$; $r^2 = 0,13$) e entre o ácido linolênico e EPA no plasma e no fluido folicular ($P = 0,0004$; $R^2 = 0,2544$). Em conclusão, os dados indicam uma baixa à moderada relação entre a suplementação alimentar à base de óleo de linhaça estudado e a circulação e conteúdo de PUFA no fluido folicular em éguas.

Palavras-chave: Folículo ovariano. Suplementação de PUFA. Equídeos. DHA.

GENERAL ABSTRACT

The objective was to detect the presence of polyunsaturated fatty acids (PUFA) in the blood circulation and in the ovarian follicular fluid as a result of linseed oil supplementation in the diet. Six Mangalarga Marchador mares between 2.5 and 22 years old, weighing 397 ± 31.89 kg, with body score of 3 and 6.5, kept on native pasture were used. In a switch over design, mares were randomly allocated to receive 150 ml of vegetable oil daily, containing PUFA n3 (62.23 g ALA, 20.34 g LA, 2.27 g EPA, 2.32 g DHA), (n=3) or no supplementation (n=3) in a first replicate. Blood and follicular fluid samples were taken on the first (D0) and every 10 days until the end of the supplementation period (D10-D30). After a 14 day interval, mares were switched across the treatments for a second replicate. Lipid profiles were determined by gas chromatography. Data were submitted to the MIXED and REG procedures of SAS[®]. In the plasma the concentrations of linolenic LNA acid in total fatty acids were higher ($P=0.006$) in the supplemented compared to the control group (1.89 ± 0.13 VS. $1.49 \pm 0.13\%$). In the follicular fluid the concentrations of linoleic acid were similar between treatments (10.9 ± 2.23 VS. $7.61 \pm 2.22\%$, for supplemented and controls, respectively) and across periods (5.75 ± 3.33 , 12.87 ± 4.09 and $14.2 \pm 4.09\%$ for periods 1 (before treatments started), 2 and 3 (10 and 20 days after treatments started, respectively) for the supplemented group, and 7.55 ± 3.34 , 9.01 ± 4.08 and $6.27 \pm 4.08\%$, for controls, respectively). However the concentrations of DHA tended to be higher ($P=0.06$) in the control group. There were positive correlations between plasma linoleic acid and follicular fluid araquidonic acid ($P=0.0106$; $r^2=0.13$) and between plasma linolenic acid and follicular fluid EPA ($P=0.0004$; $r^2=0.2544$). In conclusion, data indicated a low to moderate relationship between dietary linseed-based oil supplementation studied and circulating and follicular fluid PUFA contents in mares.

Key words: Ovarian follicle. PUFA supplementation. Equine. DHA.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1	Folículo ovariano com células da teca interna e externa, além do mecanismo de conversão do colesterol a estradiol nas células da granulosa do folículo ovariano.....	23
Figura 2	Metabolismo dos PUFA's (Acido linolênico (Ômega 3) e Acido linoleico (Ômega 6).....	29
Figura 3	Estruturas e biossíntese dos ácidos graxos Ômega 3 e 6	30
Figura 4	Representação do metabolismo de n-3 e n dietético 6 acido graxos poliinsaturados (PUFA's) e possíveis mecanismos de regulação da secreção de PGF2a	32

SEGUNDA PARTE - ARTIGO 1

Figure 1.	Experimental protocol	56
Figure 2.	Correlation between plasma LNA and follicular fluid EPA concentrations.	78
Figure 3.	Correlation between plasma LN and araquidonic acid concentrations in the follicular fluid.....	79

LISTA DE TABELAS

PRIMEIRA PARTE

Tabela 1	Composição (%) aproximada dos óleos vegetais e matérias primas	39
----------	--	----

SEGUNDA PARTE - ARTIGO 1

Table 1.	Forage fatty acid composition (%)	55
Table 2.	Effect of linseed-based vegetable with addition of salmon oil Canada supplemetation on the plasma concentrations of poliunsaturated Omega 3 fatty acid (%) in Mangalarga Marchador mares.....	71
Table 3.	Effect of linseed-based vegetable with addition of salmon oil Canada supplemetation on the plasma concentrations of poliunsaturated Omega 6 fatty acid (%)in Mangalarga Marchador mares.....	72
Table 4.	Effect of linseed-based vegetable with addition of salmon oil Canada supplemetation on the follicular fluid concentrations of poliunsaturated Omega 3 fatty acid (%)in Mangalarga Marchador mares.....	73
Table 5.	Effect of linseed-based vegetable with addition of salmon oil Canada supplemetation on the follicular fluid concentrations of poliunsaturated Omega 6 fatty acid (%)in Mangalarga Marchador mares.....	74
Table 6.	Body weight and body condition score during Step 1 of the experiment.	75

Table 7.	Body weight and body condition score during Step 2 of the experiment.	76
Table 8.	Estimation of PUFA concentration in the diet of experiment **, on dry matter basis.	77

LISTA DE SIGLAS

AGP	Ácidos graxos poliinsaturados
AGPCM	Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia muito longa
CG	Células da granulosa
CT	Células da teca
FSH	Hormônio folículo estimulante
HSD	Hidroxiesteróide deshidrogenasa
LH	Hormônio Luteinizante
PGF2 α	Prostaglandina F2 alfa
PUFA	Ácidos graxos poli-insaturados
ALN	Ácido alfa-linolênico
LNA	Ácido alfa-linolênico
UFLA	Universidade Federal de Lavras
AGCM	Ácidos graxos de cadeia muito longa
AGNE	Ácidos graxos não esterificais
SAS	Statistical Analysis System
EPA	Ácido Eicosapentaenoico
DHA	Ácido docosahexaenoico
IGF-1	Fator de crescimento semelhante insulina-1
HDL	Lipoproteína de alta densidade
VLDL	Lipoproteína de muita baixa densidade
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
n-3	Ômega 3
n-6	Ômega 6
PBMC	Células mononucleares periféricas no sangue
NRC	Requisitos nutricionais para equinos
HCG	Gonadotrofina coriônica humana

TMR	tempo médio de retenção do alimento no intestino grosso
IG	Intestino grosso
ID	Intestino delgado
TD	Trato Digestório

LISTA DE SÍMBOLOS

Cm	Centímetro
kg	Quilograma
mm	Milímetro
MHz	Megahertz
n	Número
r^2	Coeficiente de determinação
>	Maior
<	Menor
%	Por cento
vs.	Versus
=	Igual
±	Mais ou menos
Kg	Quilos
mL	Mililitros
g	Gramas
d	Dia
mg	Miligramas
dL	Decilitros
α	Subunidade alfa
β	Subunidade beta
P	Valor da probabilidade estatística
C18:0	Ácido graxo Esteárico n-3
C22: 6	Ácido docosahexaenoico (DHA)
g/d	Gramas por dia
%	Porcentagem
mg/dL	Miligramas por decilitro

U/mL	Unidades por mililitro
MIRG	Capacidade de resposta das células β
g*min*L	Gramas por minutos por litro
mmHg	Milímetros de mercúrio, unidade de medida convencional para medir pressão
WTA	Tecnologia Aplicada Watanabe, empresa brasileira
G	Polegadas das agulhas
KCl	Cloreto de potássio
N ₂	Nitrogênio
M	Massa molar

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO 18
2	REFERENCIAL TEÓRICO 20
2.1	Estrutura e função das células do folículo ovariano equino 20
2.2	Metabolismo de lipídeos nos equinos 24
2.3	Funções dos PUFA 30
2.4	Adição de óleo vegetal na dieta de equinos Mangalarga
	Marchador e suas aplicações na nutracêutica reprodutiva 34
	REFERÊNCIAS 40
	SEGUNDA PARTE – ARTIGO 47
	ARTIGO 1 Use of linseed-based oil in the diet and fatty
	acid profiles of the plasma and follicular fluid of Mangalarga
	Marchador mares 47

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A criação dos equinos se centra em cavalos de corrida, de marcha, companhia, fisioterapia além de outros usos. Motivo pelo qual seu desenvolvimento, sua reprodução e seu crescimento estão sendo mais exigidos. Para obter animais com essas qualidades desejáveis o uso de técnicas de biotecnologias da reprodução é uma excelente alternativa, tais como inseminação artificial e a transferência de embriões.

Se se deseja obter resultados aceitáveis no uso dessas técnicas, os animais devem ter um balanço nutricional para responder da melhor forma esperada. Continuamente, no trabalho rotineiro do haras, encontram-se éguas com crescimento folicular reduzido que, inclusive, não chegam a uma ovulação ou caso de ovularem; a formação do corpo lúteo débil, isso causa risco a prenhez com perdas embrionárias pela baixa produção de progesterona, sendo correlacionados essas adversidades com deficiências nutricionais que afetam o metabolismo de lipídeos e síntese dos hormônios da reprodução necessárias para a produção das gametas nos equinos. É importante que os animais tenham esse equilíbrio nutricional antes de iniciar a estação de monta para se obter bons resultados.

A suplementação com PUFA na dieta de equinos pode melhorar a resposta imune em equinos (McHANEY et al., 2013).

A adição de ácido linolênico (ALN), ômega 3(n-3) na dieta de éguas em reprodução promove uma diminuição direta na secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$, em razão da inibição da ação da prostaglandina H sintase ou, indiretamente, por meio dos produtos da sua dessaturação ácido eicosanpetanoico (EPA) e docosahexanoico (DHA). Além disso, os ácidos graxos n-3 podem promover

insensibilização do corpo lúteo à $\text{PGF}_{2\alpha}$, o que também pode melhorar a taxa de prenhez de fêmeas na fase inicial da gestação (GREGORY et al., 2009). Diante desse contexto, torna-se relevante verificar se essas moléculas (ALN, DHA, EPA) aumentam no líquido folicular quando animais são suplementados.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Estrutura e função das células do folículo ovariano equino

Desde sua origem, os folículos são formados por uma capa de células da granulosa alargadas que contornam o oócito, separados por uma lamina basal que constitui o folículo primordial. Os folículos primordiais começam sua maturação mudando as células da granulosa alargadas em uma capa única de células cubóides maduras. Elas começam a dividir-se, aumentando o número de capas das células da granulosa e seu tamanho, denominando-se, após essa transformação, folículos primários. Os folículos selecionados no processo de crescimento crescem de 50 micrometros de diâmetro no estágio de folículo primordial até 5 a 7 cm de diâmetro na maturidade. Uma capa translúcida é formada pela secreção de mucopolissacarídeos, a partir das células da granulosa. Essa capa é chamada de membrana pelúcida e permite que as células da granulosa formem prolongações citoplasmáticas as quais possibilitam o contato com a membrana do oócito por meio das *gap junctions*.

Depois de iniciar a multiplicação das células da granulosa nos folículos primários, é detectável mudanças nas células do estroma cortical por fora da lâmina basal, dando origem a outra camada de células concêntricas alargadas chamadas de células tecaais. A camada de células da teca interna é formada a partir das células tecaais alargadas mais próximas da lâmina basal, as quais vão se transformando em células epitelióides. Aquelas células que se unem com as células do estroma mantém sua estrutura alargada, formando a camada denominada teca externa (TRESGUERRES; CASTILLO, 2000).

Prosseguindo a multiplicação das células da granulosa e da teca, o tamanho do folículo aumenta, dando lugar a espaços cheios de líquido entre as células da granulosa, que vão se centralizando, formando um espaço

denominado antro. Dessa forma, o folículo nessa fase é denominado antral e apresenta como característica três capas de células da granulosa que rodeiam o oócito, formando o complexo cumulo oóforo (TRESGUERRES; CASTILLO, 2000).

O controle endócrino do sistema reprodutivo é mediado por várias proteínas, entre essas a inibina. Essa proteína é sintetizada pelas células da granulosa presentes nos folículos ovarianos. As subunidades α e β da inibina são comunicadas por pontes de dissulfeto (HAFEZ; HAFEZ, 2004). O número de folículos em crescimento no ovário é mediado pela inibina, pois esta desempenha papel importante na foliculogênese durante o ciclo estral, constituindo-se como sinalizadores químicos na hipófise (HAFEZ; HAFEZ, 2004). A ação de regulação da foliculogênese pela inibina ocorre por meio da diminuição da síntese de FSH (MCKINNON; VOSS, 1993).

Um dímero da subunidade β da inibina é chamado ativina, porém, este exerce uma função contrária da inibina. Seu principal efeito é de incrementar as quantidades de hormônio folículo estimulante (FSH) para liberação na adenohipófise (MCKINNON; VOSS, 1993).

A proliferação das células da granulosa é estimulada pela ativina, induzindo o aumento da expressão de receptores para FSH, a esteroidogênese da célula da granulosa e, conseqüentemente, afetando positivamente a função da aromatase e a produção de estradiol. Além disso, a ativina detém o começo da luteinização e atresia (BEG; GINTHER, 2006).

Durante o ciclo estral o desenvolvimento folicular acontece em por meio de uma onda folicular maior em éguas. Essa onda folicular se inicia na metade de um intervalo interovulatório de 22-24 dias (GINTHER et al., 2001). A emergência da onda folicular é estimulada pelo incremento da concentração plasmática de FSH, e, três dias depois, a onda atinge um pico e ela, então continua a declinar até atingir níveis basais, durante vários dias. Paralelamente,

os folículos crescem até que um deles atinja cerca de 21-23 mm, sendo o folículo maior o qual exerce dominância sobre os outros que são considerados subordinados. Há diminuição do crescimento dos folículos subordinados, sendo considerado essa fase de desvio folicular (GASTAL et al., 2010).

Outra molécula que compõe o líquido folicular e exerce função sobre a foliculogênese é a glicoproteína folistatina (BEG; GINTHER, 2006). Sua ação é similar a da inibina, inibindo a secreção de FSH, ligando-se com a ativina para neutralizar sua ação biológica e exercer um efeito de regulação na liberação de FSH (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Os folículos em crescimento sintetizam o estradiol, que exerce função moduladora da secreção de FSH e do hormônio luteinizante (LH) no hipotálamo (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Entre essas funções estão: estimular a atividade da enzima aromatase; aumentar a expressão de receptores para LH e aumentar a sensibilidade ao FSH e LH. Todas essas funções estão envolvidas no recrutamento do folículo dominante, mais especificamente no incremento do número de receptores para FSH nas células da granulosa (GINTHER et al., 2001).

A produção de estradiol pelas células da granulosa é estimulada pelo IGF-1, juntamente com o FSH (WEBB et al., 2006). O IGF-1 exerce outras funções como a maturação sexual e a síntese e liberação de gonadotrofinas (ZULU; NAKAO; SAWAMUKAI, 2002).

A síntese de estradiol é modulada pela interação das células da granulosa e da teca (FALK, 1959). A produção de estradiol ocorre pelo modelo 2 células, 2 hormônios em folículos antrais preovulatórios em éguas (SIROIS; KIMMICH; FORTUNE, 1991). Isso evidencia que as células da teca produzem andrógenos pela estimulação do LH, sendo as células da granulosa estimuladas pelo FSH e no caso de folículos maturados pelo LH, para que aconteçam a aromatização dos andrógenos produzidos pelas células da teca.

Dentre as funções biossintéticas das células da granulosa nos folículos antrais, encontra-se a síntese *de novo* do colesterol (GORE-LENGTON; ARMSTRONG, 1994), conforme é ilustrado na figura 1. Essa biossíntese ocorre, inicialmente, pela estimulação do FSH e, subsequentemente, pela estimulação do LH (HSUEH et al., 1984). Na síntese de novo do colesterol, envolve-se o precursor da progesterona o qual age sobre a síntese de estradiol, além do FSH e LH (SIMPSON; ROCHELLE; CARR, 1980).

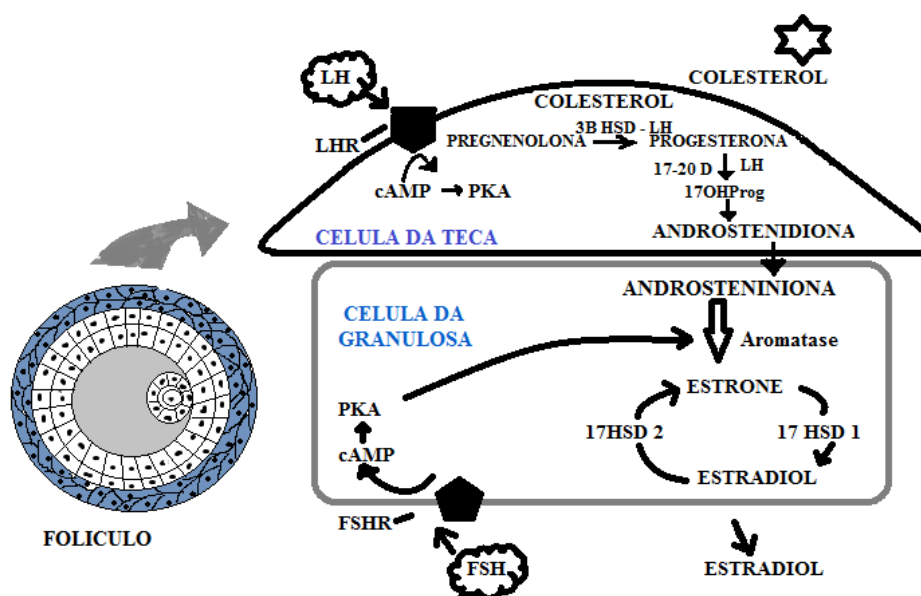


Figura 1 Folículo ovariano com células da teca interna e externa, além do mecanismo de conversão do colesterol a estradiol nas células da granulosa do folículo ovariano

Legenda: LH (hormônio luteinizante), LHR (receptor de LH), PKA (Proteína quinase A), 3β HSD (3β hidroxisteroide desidrogenase), 17-20D (17α,20-dihidroxi-A4-pregnene-3-ona), 17HSD2 (17hidroxisteroide desidrogenase 2), 17HSD1 (17hidroxisteroide desidrogenase 1), 17OHProg (hidroxiprogesterona), FSH (hormônio folículo estimulante), FSHR (receptor de FSH).

Fonte: Adaptado de www.jmidlifehealth.org/showBackIssue.asp?issn=0976.

2.2 Metabolismo de lipídeos nos equinos

Os equinos são herbívoros monogástricos não ruminantes, no qual seu sítio principal de fermentação é a região ceco cólica (BRANDI; FURTADO, 2009).

Os equinos apreendem o alimento por meio de lábios e língua, no ato de pastoreio (substâncias mais firmes e tenras, como tubérculos) e, ainda, com a utilização de incisivos superiores e inferiores. Isso se deve pelo fato de o trato digestivo ser constituído por lábios fortes, permitindo colocar o alimento entre os dentes que são extremamente móveis, permitindo o pastoreio próximo ao solo, cortando a forrageira. Os equinos possuem o hábito de somente mastigar o alimento em um lado da cavidade bucal, com movimentação de mastigação próxima de 60-80 movimentos por minuto (BRANDI; FURTADO, 2009).

O alimento no estômago do cavalo, fica retido de 2 a 6 horas, considerado um período relativamente curto, considerando-se que o órgão apresenta apenas 10% de todo o Trato Digestório (TD), sendo adaptado a receber pequenas quantidades de alimento e, raramente, encontrando-se totalmente vazio. Apresentando, ainda, o esfíncter piloro bastante desenvolvido, além de ter seu centro do vômito pouco desenvolvido, o que os impede de regurgitar (BRANDI; FURTADO, 2009).

Grande parte da mucosa superficial do estômago é recoberta por epitélio aglandular, sendo quase metade de toda a superfície. Sua porção mucosa é restrita a regiões fúndicas e pilóricas, sendo secretado o ácido clorídrico, além de gastrina, pepsina e hormônio polipeptídico. Na alimentação, inicia-se a secreção hormonal, com distensão gástrica nos equinos. Pode-se observar a liberação de gastrina, quando os equinos são alimentados *ad libitum* com feno. As dietas ricas em grãos aumentam consideravelmente rápido o pH, em decorrência da secreção mais lenta de gastrina, quando comparados a volumosos. O grau de digestão de

proteínas é baixo, em razão do pequeno tempo de permanência do alimento no estômago (BRANDI; FURTADO, 2009).

Na região chamada *saccus caecus* (aglandular) ocorre, sob atividade de microrganismos, a fermentação, que degrada açúcares, amido e proteínas. Na região média do estômago há uma variação do pH de 5 a 6, e na região pilórica a variação de pH que atinge até 2,6 com dietas exclusivamente de feno, não sendo observada essa variação em dietas com concentrado (BRANDI; FURTADO, 2009).

O tempo médio de esvaziamento do intestino delgado (ID) para alimentos sólidos é de 1,5 a 2 horas, enquanto que para líquidos o tempo pode variar de 45 minutos a 1 hora. Isso se deve ao fato de o ID do cavalo ser relativamente curto em comparação com outras espécies, em média de 20 a 25 metros, em um cavalo de 450 kg (aproximadamente 30% do TD). Variando a velocidade de movimentação da digestão de 20 cm/min. a 30 cm/min. O jejuno e íleo possuem abundante população de bactérias gram-positivas anaeróbicas obrigatórias (10^8 a 10^9 bactérias/g) (FRAPE, 2008 apud BRANDI; FURTADO, 2009). Há indícios de que exista uma produção fermentativa na composição distal do ID. No entanto, não há confirmação de que essa fermentação apresenta independência da fermentação presente no intestino grosso (IG) ou se, ainda, é somente decorrente do refluxo do conteúdo gástrico do IG (HOFFMAN, 2003 apud BRANDI; FURTADO, 2009).

São várias as secreções presentes no intestino delgado dos cavalos, dentre essas secreções destaca-se o suco pancreático, que apresenta secreção constante e baixas concentrações de enzimas, sendo mediado pela secretina. É uma substância de secreção constante e quando há presença do alimento, uma primeira vez, aumenta de 4 a 5 vezes no intestino delgado dos equídeos. A secreção constante de bile se deve à não presença da estrutura de vesícula biliar,

só sendo interrompida quando o animal se encontra mais de 48 horas em jejum (BRANDI; FURTADO, 2009).

O IG do cavalo possui seções volumosas, articuladas e compartimentalizadas. Distalmente ao íleo, está o ceco, com capacidade média de 25 a 35 litros, ligado ao cólon ventral direito. Juntamente o cólon ventral direito e esquerdo e as porções esquerda e direita do cólon ventral, compõem o cólon maior. Os segmentos do cólon estão conectados por dobras, conhecidas como flexuras, sendo importantes pela mudança na população microbiana de região para região. No ceco apenas há a secreção de enzimas e muco, sendo a digestão tanto de conteúdo do ceco quanto de conteúdo do cólon ventral de responsabilidade de bactérias e protozoários ciliados (BRANDI; FURTADO, 2009).

As floras do ceco e cólon são, principalmente, bactérias, podendo atingir de $0,5 \times 10^9$ a 5×10^9 /g de conteúdo, intestinal. O número de bactérias celulolíticas varia entre 10^4 e 10^7 g/mL no IG (JULLIAND et al., 2001 apud BRANDI; FURTADO, 2009) sendo maior no ceco do que no cólon, indicando que o ceco, provavelmente, seja o principal sítio de digestão de fibras. Foram identificadas as espécies bacterianas *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus* e *Fibrobacter succinogenes* como as principais bactérias celulolíticas no ceco dos equinos. *Clostridium spp.*, *Ruminococcus spp.*, *Butyrivibrio spp.* e *Eubacterium spp.* Também são bactérias celulolíticas e organismos fibrolíticos presentes no ceco (DALY et al., 2001 apud BRANDI; FURTADO, 2009).

No intestino grosso, ocorre a absorção dos ácidos graxos voláteis por difusão passiva na forma de ácidos livres, pela mudança do gradiente de pH (BRANDI; FURTADO, 2009).

A digestão dos lipídios inicia-se na boca, pela ação da lipase lingual. Depois, ao passar pelo estômago, a lipase gástrica atual hidrolisando-os e realizando uma emulsão, no estômago é somente uma fase preparatória e no

duodeno após entrar em contato com a lipase pancreática ocorrerá, realmente, a lipólise (BERME, 2000 apud MORGADO; GALZERANO, 2006).

Os sais biliares promovem a emulsificação dos lipídeos, facilitando a lipólise pela ação da lipase pancreática. Tudo isso é facilitado pela continuidade da secreção de sais biliares no intestino delgado em razão da ausência da vesícula biliar nos equinos. Portanto, há melhor emulsificação do lipídio da dieta, aumentando o contato do lipídio com a água. Tudo isso é acompanhado pela ação conjunta do cofator colipase, o qual hidrolisa os lipídios em monoglicerídeos e ácidos graxos (BERME, 2000 apud MORGADO; GALZERANO, 2006).

Os ácidos graxos e os monoglicerídeos se ligam com os sais biliares, processo no qual são formadas as micelas que são mais absorvíveis por serem mais solúveis em água. As micelas, ao entrarem em contato com as microvilosidades do epitélio do intestino delgado, liberam os ácidos graxos, monoglicerídeos, vitaminas lipossolúveis e o colesterol no interior da mucosa (BERME, 2000 apud MORGADO; GALZERANO, 2006).

A reesterificação dos ácidos graxos e glicerol ou monoglicerídeo acontecem na parede da mucosa do intestino, em companhia de fosfolipídios, colesterol, apolipoproteínas e ésteres de colesterol formando os quilomicrons. Estes serão rapidamente absorvidos para o interior do sistema linfático, transportando fosfolipídios, colesterol, ésteres de colesterol e trigliceróis, para diferentes tecidos e órgãos, servindo como reserva energética e fonte de energia (BERME, 2000 apud MORGADO; GALZERANO, 2006).

Os triacilgliceróis são hidrolisados a diacilglicerol e monoacilglicerol. A maior quantidade dos ácidos graxos ingressam nos espaços intercelulares, sendo depois absorvidos pelas células titulares, porém outros voltam ao plasma (OTHMAN; ROSENSTEIN, 1993; WATSON; BUMS; PACKARD, 1993).

A superfície dos quilomicrons é hidrolisada pela lipoproteína lipase, acontecendo ao mesmo tempo a perda de apolipoproteínas e triacilgliceróis à qual é atribuída a lipoproteína de alta densidade (HDL) que são formadas no fígado e no intestino. Essas lipoproteínas são pequenas e espessas. Sua atividade consiste em transportar e reservar o colesterol dos tecidos até os sais biliares (FRANK; SOJKA; LATOUR, 2002; GAZIANO; MANSON; RIDKER, 2007; VITIC; STEVANOVIC, 1993).

Normalmente, os ácidos graxos são liberados do tecido adiposo até o plasma, onde se juntam com a albumina plasmática e são levados até ao músculo esquelético, coração, fígado e outros tecidos para que aconteça sua oxidação e conversão a outros lipídios. Os ácidos graxos não esterificados apresentam baixas concentrações, mas é rápida sua capacidade de intercâmbio, e aproveitamento como fonte de energia (FRANK; SOJKA; LATOUR, 2002; GAZIANO; MANSON; RIDKER, 2007; VITIC; STEVANOVIC, 1993). Na figura 2, representa-se de forma resumida esse processo de metabolismo dos lipídeos.

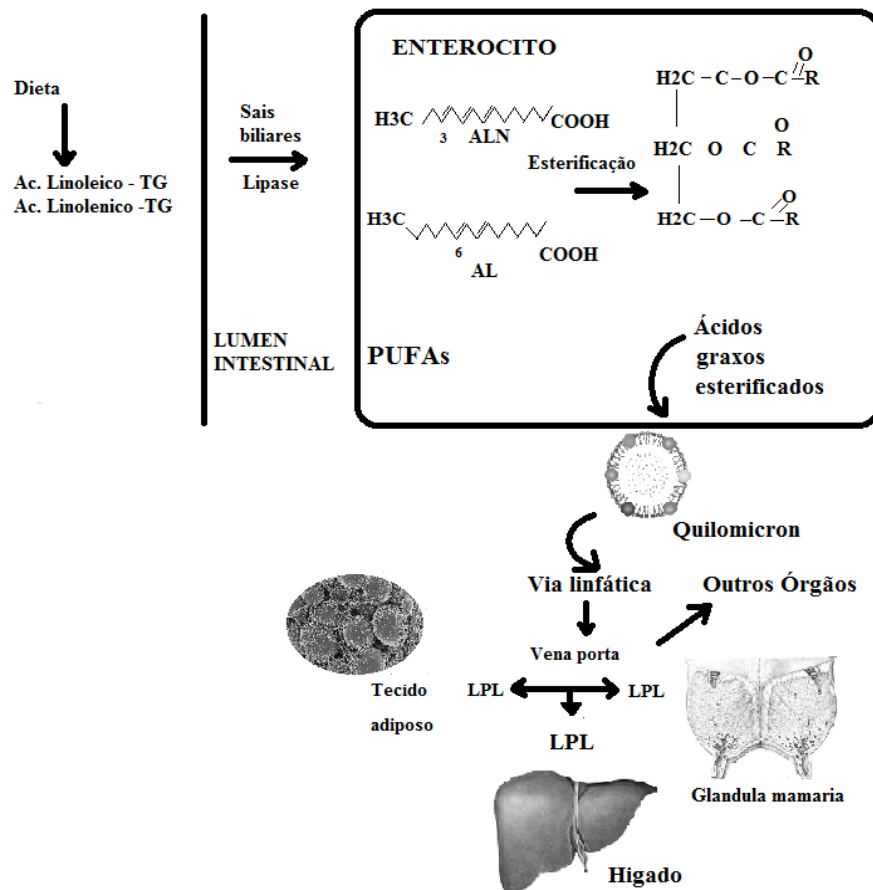


Figura 2 Metabolismo dos PUFAs (Acido linolênico (Ômega 3) e Acido linoleico (Ômega 6)

Fonte: Adaptado de Rodriguez –Cruz et al. (2005).

As lipoproteínas de muita baixa densidade ou VLDL são sintetizadas no fígado, principalmente, e transportam triacilgrlicerois até os tecidos promovendo a sínteses de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) que são responsáveis pelo transporte direto do colesterol, o que será enviado aos tecidos e paredes vasculares (LICHTENSTEIN; HACHEY; MILLAR, 1992; MASANOBU; HIDEITO, 2008; WATSON; BUMS; PACKARD, 1993).

Considerando que equinos podem digerir eficientemente dietas que contenham até 30% da energia digestível sob a forma de gordura (FRAPE, 2008), a adição de óleos vegetais ou gordura animal é um excelente meio para aumentar a concentração energética da dieta sem aumentar o volume de alimento consumido, porque a digestão é mais fácil.

2.3 Funções dos PUFA

Existem alguns PUFAs que possuem a primeira dupla ligação (insaturação) no terceiro átomo de carbono, a partir do carbono metílico terminal. Esses ácidos graxos são conhecidos como ácidos graxos n-3. Enquanto que outros apresentam a primeira insaturação no sexto átomo de carbono e são chamados de ácidos graxos n-6 (Figura 3).

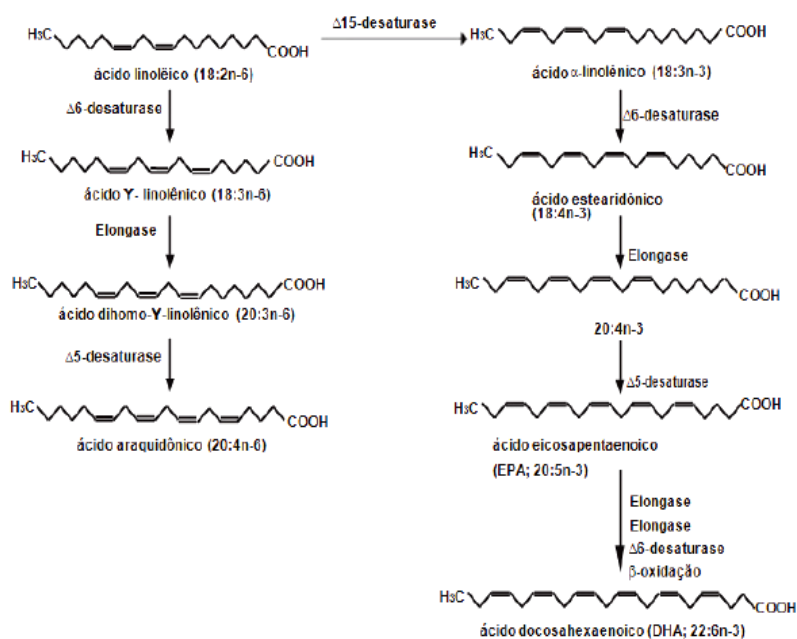


Figura 3 Estruturas e biossíntese dos ácidos graxos Ômega 3 e 6

Fonte: Calder (2011).

Entre os PUFA pode-se citar o palmitoléico, oléico, linoléico, linolênico e araquidônico, que podem ser encontrados em amêndoas óleos vegetais e óleo de peixe (MORGADO; GALZERANO, 2006).

Os principais representantes da família n-3 são o ácido linolênico (18:3), o ácido eicosapentaenóico ou EPA (20:5) e o ácido docosahexaenóico ou DHA (22:6). Os ácidos graxos n-3 têm como principais fontes plantas, algas e animais marinhos. Os vegetais ricos em n-3 são a linhaça, canola e colza (YOUUDIM; MARTIN; JOSEPH, 2000). Os animais marinhos que possuem essa molécula como fonte são o fitoplâncton, algas em geral e peixes de águas frias e profundas, como cavala, sardinha, salmão e truta (CONNOR, 2000).

Entre os principais representantes dos ácidos graxos n-6 estão o ácido linoléico (18:2) e o ácido araquidônico (20:4) (ANDRADE; CARMO, 2006). Essas moléculas são encontradas nos óleos da maioria das sementes e grãos de cereais. As fontes desses ácidos graxos incluem óleo de milho, soja, girassol, castanhas (YOUUDIM; MARTIN; JOSEPH, 2000) e, mais recentemente, óleo de semente de uva e de aveia.

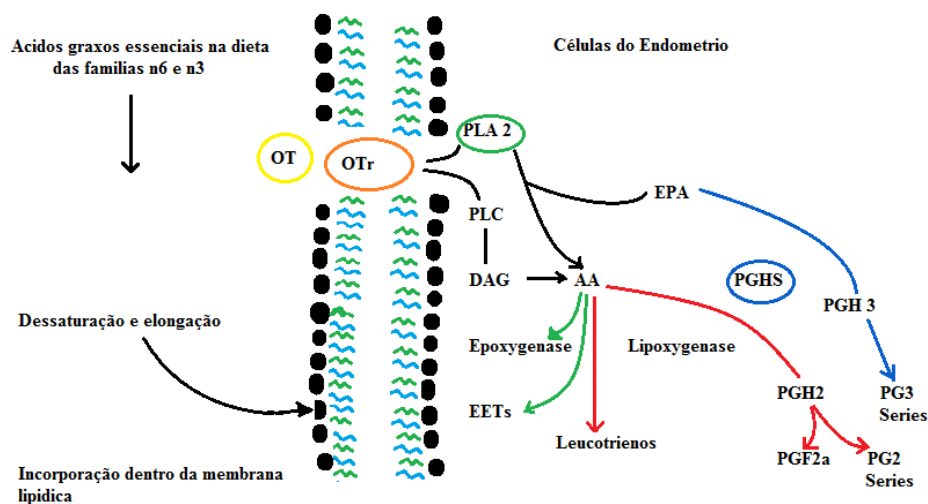


Figura 4 Representação do metabolismo de n-3 e n dietético 6 ácido graxos poliinsaturados (PUFAs) e possíveis mecanismos de regulação da secreção de PGF2a

Fonte: Adaptado de Mattos et al. (2000).

As funções biológicas dos PUFA's ainda não estão totalmente claramente definidas, estando relacionadas com a manutenção da integridade das células endoteliais, prevenção da arteriosclerose e alterações cardiovasculares, estimulação da liberação de insulina, inibição da vasoconstrição e agregação plaquetária, participação no desenvolvimento normal da placenta, crescimento fetal e desenvolvimento neuronal, participação nas funções imunomoduladoras, liberação de citocinas e síntese de eicosanóides (ANDRADE; CARMO, 2006).

Há uma relação inversamente consistente entre a abundância relativa de ácido oleico n9 e ácido araquidônico no soro de ratos, após o controle de outros ácidos graxos. A descoberta levanta a questão de saber se existe uma relação semelhante em outras espécies, e se pode haver uma regulação por feedback metabólico entre os dois ácidos graxos (HOSTMARK; HAUG, 2013).

Clarke (2001) demonstrou que os PUFA's não são utilizados somente como fonte energética e componente estrutural pelo organismo, mas também como importantes mediadores da expressão gênica. Grimm et al. (2002) e Kaur et al. (2011) afirmaram que os ácidos graxos n-3 atuam como sinalizadores intracelulares, suprimindo a expressão gênica de genes envolvidos na lipogênese e induzindo a transcrição de genes envolvidos na oxidação lipídica e termogênese.

Os ácidos graxos são utilizados como substrato direto na síntese de colesterol, são precursores da progesterona, dos hormônios esteróides e das prostaglandinas. Dependendo do tipo de PUFA, n-3 ou n-6, são sintetizados diferentes tipos de prostaglandinas. O ácido graxo n-6 é precursor das prostaglandinas das séries 1 e 2 via ácido araquidônico enquanto que o ácido graxo n-3 é precursor das prostaglandinas da série 3 via EPA, menos bioativas do que as prostaglandinas das séries 1 e 2 (GREGORY et al., 2009). Fontes de ácido alfa linolênico suplementadas na dieta podem suprimir a secreção de prostaglandina F2 α ou por meio de fontes dos ácidos graxos derivados da dessaturação e elongação do alfa linolênico como EPA e DHA (AMBROSE; KASTELIC, 2003) contribuindo a reduzir as perdas embrionárias (MATTOS; STAPLES; THATCHER, 2000). A suplementação alimentar com óleo de peixe (EPA e DHA) diminui as delta desaturase 6, 5 e 9 diminuindo a dessaturação de ácido linoleico e linolênico nos microsomas hepáticos e a concentração de ácido araquidônico nos fosfolípidios das células hepáticas (CHRISTIANSEN et al., 1991; GARG et al., 1988). A síntese de prostaglandina da série 2 como a prostaglandina F2 α pode ser reduzida se diminuirmos a síntese do ácido araquidônico.

Os ácidos graxos n-3 não fornecem apenas os precursores para a síntese de prostaglandinas, eles podem também modular o padrão de muitas enzimas

chaves envolvidas no metabolismo de esteróides e das próprias prostaglandinas (WATHES et al., 2007).

2.4 Adição de óleo vegetal na dieta de equinos Mangalarga Marchador e suas aplicações na nutracêutica reprodutiva

Atualmente, vários estudos vêm sendo realizados para o melhor entendimento dos efeitos da restrição e/ou excesso de lipídeos na dieta de equinos. Um dos hormônios cuja ação vem sendo cada vez mais estudada é a leptina. Esse hormônio protéico produzido pelos adipócitos pode atuar como mediador dos efeitos de uma dieta desequilibrada sobre a liberação dos hormônios hipotalâmicos. Animais submetidos à restrição energética, éguas muito jovens e durante o anestro estacional apresentam baixas concentrações sistêmicas desse hormônio (GASTAL et al., 2010).

O efeito benéfico da suplementação dietética com ácidos graxos essenciais não pode ser relacionado apenas com o aumento do consumo energético. Os PUFA's são capazes de exercer uma grande influência sobre a reprodução, obtendo maior crescimento folicular e aumentando o número de folículos, além de incrementar as concentrações plasmáticas de progesterona por diminuir o metabolismo das prostaglandinas, dessa forma, incrementando a vida média do corpo lúteo. A suplementação com esses ácidos graxos consegue inibir a Cicloxigenase em tecido endometrial da vaca, suprimir a secreção de PGF2a, prevenindo a morte embrionária, por a supressão do 17β e decrescendo sensibilidade do corpo lúteo pela PGF2a (STAPLES; BURKE; THATCHER, 1998).

Segundo Gregory et al. (2009), entre os efeitos nutracêuticos da adição de PUFA's na dieta estão o aumento na produção de hormônios esteroides, decorrente do aumento no tamanho do folículo pré-ovulatório, maior volume do

corpo lúteo, inibição da produção e liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$, melhora na taxa de fertilização e no desenvolvimento embrionário. Em bovinos, os PUFA's são capazes de exercer influência sobre o número e tamanho de folículos ovarianos, taxa de ovulação, produção de progesterona e tempo para ocorrência da luteólise (WATHES et al., 2007).

Vacas suplementadas com fontes de PUFA's apresentaram melhores taxas de crescimento folicular quando comparadas com vacas que receberam dietas com ácidos graxos saturados, o que pode estar relacionado com maiores concentrações de insulina circulantes (THOMAS; BAO; WILLIAMS, 1997). Além disso, quanto maior a taxa de crescimento folicular e o tamanho do folículo ovulatório, maior e mais volumoso será o corpo lúteo resultante, característica que pode melhorar a taxa de prenhez de vacas (GREGORY et al., 2009).

Como grande parte das perdas embrionárias precoces ocorre por volta do 10º dia de gestação, estas podem estar relacionadas a falhas na função lútea das células (MORENO et al., 2003). A adição de PUFA's na dieta pode ser uma estratégia para diminuir essas perdas, em decorrência do aumento de progesterona que esses ácidos graxos são capazes de promover, pelo fato de aumentarem o tamanho e volume do folículo pré-ovulatório e do corpo lúteo subsequente.

Resultados similares foram observados por Munsterman et al. (2005), os quais concluíram que a suplementação com ácidos graxos n-3 pode combater o aparecimento e retardar a progressão de osteoartrite comumente observada em cavalos esportistas, reduzindo a extensão de doenças locomotoras dolorosas e aumentando a vida útil desses animais. Isso pode ser explicado pela capacidade de redução da produção de eicosanóides inflamatórios que o DHA e o EPA possuem, justificando seu uso em determinadas patologias de cavalos esportistas (ANDRADE; CARMO, 2006).

A suplementação dietética de cavalos com PUFA's n-3 aumenta ($P < 0,001$) significativamente as concentrações de n-3 no plasma de fosfolipídios em células mononucleares periféricas no sangue (PBMC) em cavalos pôneis McHANEY et al., 2013).

Os Poneis que receberam PUFA n-3 apresentaram maiores concentrações de EPA ($P < 0,0001$) e DHA ($p < 0,0001$) comparados com cavalos alimentados com concentrado ou gordura animal (FURTNEY et al., 2009).

Concentrações de ácido linoleico foram maiores ($P < 0,0001$) nos animais alimentados com uma dieta com concentrado comparada com uma dieta contendo PUFA n-3. Cavalos Pôneis tiveram concentrações mais elevadas de C18:0 (Ácido graxo Esteárico) ($P < 0,007$) e C22: 6 n-3 (DHA) ($P < 0,02$) quando foram alimentadas com n3-PUFA, quando comparados com éguas alimentadas concentrado (FURTNEY et al., 2009).

O organismo dos equinos responde rapidamente à adição de ácidos graxos n-3 na dieta, principalmente de EPA e DHA. King et al. (2008) observaram que logo no 3º dia após o início da suplementação (10g/d até 40g/d) já é possível observar aumento significativo de sua concentração no organismo, com pico próximo ao 7º dia de fornecimento para, então, manter um platô. Contudo, os PUFA's possuem vida muito curta no organismo, sofrendo queda superior a 75% nas concentrações sanguíneas de EPA e DHA, no 9º dia após sua remoção da dieta.

Os ácidos graxos ômega-3 exercem efeitos anti-inflamatórios, por sua incorporação em fosfolipídios das membranas celulares e organelas. Essa incorporação ocorre, pela presença do ácido EPA e DHA e resulta em reduzida produção de eicosanóides inflamatórios de ácido araquidônico (CALDER, 2006).

Estudos com ratos e humanos mostraram que os PUFA's alteram a composição de ácidos graxos dos fosfolipídios que cercam os receptores de

insulina encontradas no músculo (RASIC-MILUTINOVIC et al., 2007) e reduz a inflamação quando incorporados em células brancas do sangue (CALDER, 2008).

Normalmente, equinos submetidos a trabalho intenso recebem dietas baseadas em cereais, onde os principais ácidos graxos são da série n-6. Por outro lado, equinos sob pastejo recebem dietas na qual os óleos adicionados à dieta derivam de folhas, contendo maior proporção de n-3. Ocorre, então, uma competição entre esses PUFA's ocasionada pelos ácidos graxos n-3 durante o alongamento, dessaturação e metabolismo da ciclooxigenase dos ácidos graxos n-6 promovendo, dessa forma, uma supressão parcial da síntese dos intermediários inflamatórios (FRAPE, 2008).

Um dos efeitos sugeridos da adaptação ao uso de lipídeos é o aumento na concentração plasmática de ácidos graxos não esterificados (AGNE's), com subsequente aumento da oxidação de ácidos graxos em detrimento da oxidação da glicose sanguínea e do glicogênio muscular como fonte de energia (MARCHELLO; SCHURG; MARCHELLO, 2000).

Otabachian et al. (2011) mostraram que éguas tratadas com uma formulação de ácido graxo contendo ácido α -linolênico n-3 (18:3) com uma adição de levedura de cromo e outros minerais e vitaminas tiveram menores ($P < 0,01$) concentrações de glicose no plasma ($91,2 \pm 2,10$ mg/dL) e insulina ($9,6 \pm 1,0$ μ U/mL), bem como menor ($P < 0,04$) resposta pancreática beta (MIRG= $4,9 \pm 0,37$), comparada com antes do tratamento ($98,0 \pm 1,9$ mg/dL de glicose; $13,8 \pm 0,9$ μ U / ml de insulina; MIRG = $5,9 \pm 0,33$).

Entretanto, pouca ou nenhuma atenção tem sido dada à composição dos ácidos graxos dos óleos adicionados à dieta de cavalos atletas. Os lipídeos mais comumente utilizados são provenientes do óleo de milho e óleo de soja, alimentos pobres em ácidos graxos n-3, EPA e DHA (O'CONNOR; LAWRENCE; HAYES, 2007). Ao contrário, óleos de peixe e de alguns vegetais

como a linhaça, são fontes extremamente ricas de PUFA's. A suplementação da dieta com óleo de peixe aumentou ($P < 0,01$) no plasma sanguíneo quando os animais foram suplementados com EPA e DHA, enquanto reduziu ($P = 0,032$) a concentração de glicose no plasma ($45,7 \pm 7,84 \text{ g} \cdot \text{min} \cdot \text{L}^{-1}$) comparada com a dieta controle ($77,4 \pm 9,03 \text{ g} \cdot \text{min} \cdot \text{L}^{-1}$) (HOFFMAN et al., 2011). Na tabela 1, esta apresentada a composição química de lipídeos em óleos vegetais e farelo de trigo.

Tabela 1 Composição (%) aproximada dos óleos vegetais e matérias primas

Fontes	Saturados				Insaturados			Referências
	14:0	16:0	18:0	18:1	18:2 (w6)	18:3 (w3)	20:4	
Óleo de Amendoim	-	11,00	3,90	53,50	29,0	0,30	-	BERTECHINI, 2012
	-	11,42	2,82	41,69	33,46	1,17	-	FONSECA, H & GUTIERREZ, L.E. 1974
Óleo de Girassol	-	5,50	5,00	20,50	69,00	-	-	BERTECHINI, 2012
	0,08	8,36	5,03	27,65	56,30	2,06	-	FONSECA, H & GUTIERREZ, L.E. 1974
Óleo de Soja	0,20	12,00	4,30	23,00	53,00	8,00	-	BERTECHINI, 2012
	0,20	11,35	4,15	25,30	50,60	8,20	-	FONSECA, H & GUTIERREZ, L.E. 1974
Óleo de Milho	-	9,5	4,50	35,50	49,00	0,50	-	BERTECHINI, 2012
	-	14,03	3,30	35,00	44,40	1,96	-	FONSECA, H & GUTIERREZ, L.E. 1974
Óleo de Algodão	1,40	23,00	1,00	24,00	49,60	-	-	BERTECHINI, 2012
	-	20,13	3,10	22,86	50,16	1,32	-	FONSECA, H & GUTIERREZ, L.E. 1974
Óleo de Canola	1,00	5,00	2,00	59,00	22,00	10,00	-	BERTECHINI, 2012
Óleo de Linhaça	-	-	-	22,20	20,50	55,0	1,00	BERTECHINI, 2012
Óleo de Coco	76,00	10,00	4,00	7,00	3,00	-	-	BERTECHINI, 2012
Óleo de peixe	-	-	-	-	7,80	30,80	-	BERTECHINI, 2012
Farelo de trigo		25,50	1,90	32,90	39,7	-	-	MOREIRA et al. 2010
Óleo de chia		7,53	3,33	7,56	19,23	61,73		AYERZA. 2011

Fonte: Adaptado de Maynard; Loosli (1982); Emken (1997); Vineyard et al. (2009) apud Bertechini (2012); Fonseca; Gutierrez (1974); Moreira, Oliveira e Badiale-Furlong (2010); Ayerza (2011).

REFERÊNCIAS

- AMBROSE, D. J.; KASTELIC, J. P. Dietary fatty acids in dairy cow fertility. **Advances in Dairy Technology**, Canadá, v. 15, p. 35-47, 2003.
- ANDRADE, P. M. M.; CARMO, M. G. T. Ácidos graxos n-3: um link entre eicosanóides, inflamação e imunidade. **MN–Metabólica**, Porto Alegre, v. 3, n. 8, p. 135-143, jul./set. 2006.
- AYERZA, R. Conteúdo de óleo e composição de ácidos graxos de sementes de chia (*salvia hispanica* l.) Var. Iztac 1 cultivadas em seis ecossistemas tropicais diferentes. **Agronomical Engineer**, Arizona, v. 6, n. 8, p. 621-623, ago. 2011.
- BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Follicle selection in cattle and horse: role of intra follicular factors. **Reproduction: the official journal of the society for the study of fertility**, Cambridge, v. 132, n. 3, p. 365-377, Sept. 2006.
- BERME, R. M.; LEVY, M. N. **Fisiologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1034 p.
- BERTECHINI, A. G. **Nutrição de monogástricos**. Lavras: Editora da Ufla, 2012. 70 p.
- BRANDI, R. A.; FURTADO, C. E. Importância nutricional e metabólica da fibra na dieta de equinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, nesp., p. 246-258, jul. 2009.
- CALDER, P. C. Fatty acids and inflammation: the cutting edge between food and pharma. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 668, n. 1, p. 50-58, Sept. 2011.
- CALDER, P. C. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. The **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 83, n. 6, p. 1505-1519, June 2006.
- CALDER, P. The relationship between the fatty acid composition of immune cells and their function, prostaglandins. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, Edinburgh, v. 79, n. 3-5, p. 101-108, Sept./Nov. 2008.

CHRISTIANSEN, E. N. et al. Effect of dietary n-3 and n-6 fatty acids on fatty acid desaturation in rat liver. **Biochimica et Biophysica Acta**, Netherlands, v. 1082, n. 1, p. 57–62, Feb. 1991.

CLARKE, S. D. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. **Journal of Nutrition**, Rockville, v. 131, n. 4, p. 1129-1132, Apr. 2001.

CONNOR, W. E. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 71, n. 1, p. 171–175, Jan. 2000. Suplemento.

DALY, K. et al. Bacterial diversity within the equine large intestine as revealed by molecular analysis of cloned 16S rRNA genes. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 38, n. 2-3, p. 141-151, Dec. 2001.

EMKEN, E. A. Valor nutricional del aceite de soya en comparación con otras grasas y aceites. **Soyanoticias**, México, p. 1-8, Enero-Mar. 1997.

FALK, B. Site of production of estrogens in rat ovary as studied by microtransplants. **Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum**, Stockholm, v. 47, n. 163, p. 1-101, 1959.

FONSECA, H.; GUTIERREZ, L. E. Composição em ácidos graxos de óleos vegetais e gorduras animais. **Anais de E.S.A**, São Paulo, p. 1-6, 1974.

FRANK, N.; SOJKA, J. E.; LATOUR, M. A. Effect of withholding feed on concentration and composition of plasma very low density lipoprotein and serum nonesterified fatty acids in horses. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 63, n. 7, p. 1018-1021, July 2002.

FRAPE, D. **Nutrição & alimentação de equinos**. 3. ed. São Paulo: Rocca, 2008. 602 p.

FURTNEY, S. R. et al. Omega-3 supplementation in quarter and miniature horse mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar, v. 29, n. 5, p. 1-53, 2009.

GARG, M. L. et al. Delta 6- desaturase activity in the liver microsomes of rats fed diets enriched with cholesterol and/or n-3 fatty acids. **Biochemistry Journal**, Ottawa, v. 249, n. 2, p. 351–356, Jan. 1988.

GASTAL, M. O. et al. Short-term feed restriction decreases the systemic and intrafollicular concentrations of leptin and increases the vascularity of the preovulatory follicle in mares. **Theriogenology**, Los Altos, v. 73, n. 9, p. 1202–1209, June 2010.

GAZIANO, M.; MANSON, J. E.; RIDKER, P. M. Primary and secondary prevention of coronary heart disease. In: LIBBY, P. et al. (Ed.). **Braunwald's heart disease: a textbook of cardiovascular medicine: volume 8**, 2007. Chap. 45, p. 1057-1084.

GINTHER, O. J. et al. Follicle selection in monovular species. **Biology of Reproduction**, New York, v.65, n. 3, p. 638-647, Sept. 2001.

GORE-LENGTON, R. E.; ARMSTRONG, D. T. Follicular steroidogenesis and its control. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. D. (Ed.). **The Physiology of reproduction: volume 1**. 2. ed. New York: Raven, 1994. p. 571-627.

GREGORY, R. M. et al. Ácidos graxos poliinsaturados e seus efeitos no desempenho reprodutivo da vaca. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, n. 6, p. 153-156, dez. 2009.

GRIMM, H. et al. Regulatory potential of n3 fatty acids in immunological and inflammatory processes. **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 87, n. 1, p. 59-67, Jan. 2002. Supplementy.

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

HOFFMAN, R. M. et al. Dietary fish oil supplementation affects plasma fatty acids and glycemic response but not insulin sensitivity in horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar, v. 31, n. 5, p. 230-356, 2011.

HOSTMARK, A. T.; HAUG, A. Percentage oleic acid is inversely related to percentage arachidonic acid in total lipids of rat serum. **Lipids in Health and Disease**, London, v. 12, p. 40, Mar. 2013.

HSUEH, A. J. W.; ADASHI, E. Y. P.; JONES, P. C. B. Hormonal regulation of the differentiation of cultures ovarian granulosa cells. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 5, n. 1, p. 76-127, 1984.

JULLIAND, V. et al. Feeding and microbial disorders in horses. 3. Effects of three hay:grain ratios on microbial profile and activities. **Journal of Equine Veterinary Science**, Amsterdam, v. 21, n. 11, p. 543-546, Nov. 2001.

KAUR, G. et al. Docosapentaenoic acid (22:5n-3): a review of its biological effects. **Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids**, Oxford, v. 50, n. 1, p. 28-34, Jan. 2011.

KING, S. S. et al. Circulating fatty acid profiles in response to three levels of dietary omega-3 fatty acid supplementation in horses. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, n. 5, p. 1114-1123, May 2008.

LICHTENSTEIN, A. H.; HACHEY, D. L.; MILLAR, J. S. Measurement of human apolipoprotein B-48 and B-100 kinetics in triglyceride – rich lipoproteins using [5,5,5-2H3] leucine. **Journal of Lipid Research**, Memphis, v.33, n. 6, p. 907-914, June 1992.

MARCHELLO, E. V.; SCHURG, W. A.; MARCHELLO, J. A. Changes in lipoprotein composition in horses fed a fat supplemented diet. **Journal of Equine Veterinary Science**, Amsterdam, v. 20, n. 7, p. 453-458, July 2000.

MASANOBU, H.; HIDEOTO, T. Utilization in healthy subjects consuming diacylglycerol oil diet: dietary and whole body fat oxidation lipids. **Lipids**, Chicago, v. 43, n. 6, p. 517-525, June 2008.

MATTOS, R.; STAPLES, R. C.; THATCHER, W. W. Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. **Reviews of Reproduction**, Colchester, v. 5, n. 1, p. 38-45, Jan. 2000.

MAYNARD, L. A.; LOOSLI, J. K. **Nutrição animal**. Sao Paulo: Livraria Freitas Bastos, 1974. 550 p.

McHANEY, A. M. et al. Omega-3 fatty acid supplementation affects selected phospholipids in peripheral white blood cells and in plasma of full-sized and miniature mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, Amsterdam, v. 33, n. 10, p. 779-786, Oct. 2013.

McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea e Febiger, 1993. 3288 p.

MOREIRA, C. D. S.; OLIVEIRA, M. D. S.; BADIALE-FURLONG, E. Conteúdo lipídico e perfil em ácidos graxos de farelos submetidos à fermentação por *aspergillus oryzae* em estado sólido. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 28, n. 1, p. 133-140, jan./jun. 2010.

MORENO, D. et al. Concentraciones plasmáticas de progesterona, área del cuerpo lúteo y índices de preñez en vacas receptoras de embriones. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, 1., 2003, Córdoba. **Proceedings...** Córdoba: [s.n.], 2003.

MORGADO, E.; GALZERANO, L. Utilização de óleo em dietas para equinos. **Revista Eletrônica de Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 10, p. 1-14, out. 2006.

MUNSTERMAN, A. S. et al. Effects of the omega-3 fatty acid, alpha-linolenic acid, on lipopolysaccharide-challenged synovial explants from horses. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 66, n. 9, p. 1503–1508, Sept. 2005.

O'CONNOR, C. I.; LAWRENCE, L. M.; HAYES, S. H. Dietary fish oil supplementation affects serum fatty acid concentrations in horses. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, n. 9, p. 2183-2189, Sept. 2007.

OTABACHIAN, S. et al. Effects of a feed supplement containing fatty acids and chromium on insulin sensitivity in old mares: a preliminary study. **Journal of Equine Veterinary Science**, Amsterdam, v. 31, n. 5, p. 230-356, May 2011.

OTHMAN, A.; ROSENSTEIN, F. Copper deficiency increases in vivo hepatic synthesis of fatty acids, triacylglycerols and phospholipids in rats. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Malden, v. 204, n. 1, p. 97-103, Oct. 1993.

RASIC-MILUTINOVIC, Z. et al. Effects of n-3 pufas supplementation on insulin resistance and inflammatory biomarkers in hemodialysis patients. **Renal Failure**, London, v. 29, n. 3, p. 321-329, 2007.

RODRIGUEZ-CRUZ, M. et al. Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud. **Revista de Investigación Clínica**, México, v. 57, n. 3, p. 457-472, May/June 2005.

SIMPSON, E. R.; ROCHELLE, D. B.; CARR, B. R. Plasma lipoproteins in follicular fluido human ovaries. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Springfield, v. 51, n. 6, p. 1469-1471, Dec. 1980.

SIROIS, J.; KIMMICH, T. L.; FORTUNE, J. E. Steroidogenesis by equine preovulatory follicles: relative roles of theca interna and granulosa cells. **Endocrinology**, Los Angeles, v. 128, n. 2, p. 1159-1166, Feb. 1991.

STAPLES, C. R.; BURKE, J. M.; THATCHER, W. W. Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.81, n. 3, p. 857-871, Mar. 1998.
THOMAS, M. G.; BAO, B.; WILLIAMS, G. L. Dietary fats varying in their fatty acid composition differentially influence follicular growth in cows fed isoenergetic diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 75, n. 9, p. 2512-2519, Sept. 1997.

TRESGUERRES, J. A. F.; CASTILLO, C. **Fisiología del eje hipotálamo-hipófiso-ovárico**. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana, 2000. 122 p.

VINEYARD, K. R.; WARREN, L. K.; KIVIPERTO, J. Effect of dietary omega-3 fatty acid source on plasma and red blood cell membrane composition and immune function in yearling horses. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 88, n. 1, p. 248-257, Jan. 2009.

VITIC, J.; STEVANOVIC, J. Comparative studies of the serum lipoproteins and lipids in some domestic, laboratory and wild animals. **Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry**, Oxford, v.106, n. 1, p. 223-229, Sept. 1993.

WATHES, D. C, et al. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. **Biology of Reproduction**, New York, v. 77, n. 2, p. 190-201, Aug. 2007.

WATSON, T. D.; BUMS, L.; PACKARD, C. J. Effects of pregnancy and lactation on plasma lipid and lipoprotein concentrations, lipoprotein composition and post-heparin lipase activities in Shetland pony mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 97, n. 2, p. 563-568, Mar. 1993.

WEBB, R. et al. Desenvolvimento folicular em espécies mono e poliovatórias: do feto à fertilização. *Acta Scientiae Veterinariae*, Porto Alegre, v. 34, n. 1, p. 95-114, 2006.

YOUDIM, K. A.; MARTIN, A.; JOSEPH, J. A. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. **International Journal of Developmental Neuroscience**: the official journal of the International society for developmental neuroscience, Oxford, v. 18, n. 4-5, p. 383-399, July/Aug. 2000.

ZULU, V. C.; NAKAO, T.; SAWAMUKAI, Y. Insulin-like growth factor-1 as a possible hormonal mediator of nutritional regulation of reproduction in cattle. **Theriogenology**, Los Altos, v. 64, n. 8, p. 657-665, Aug. 2002.

1 **SEGUNDA PARTE – ARTIGO**

2 **ARTIGO 1 Use of linseed-based oil in the diet and fatty acid profiles of the**
 3 **plasma and follicular fluid of Mangalarga Marchador mares**

4

5

6

7

8

9 **Artigo formatado segundo as normas da revista Pesquisa**

10 **Agropecuária Brasileira**

11

12 Jesus Alfonso Sánchez Viafara⁽¹⁾, Gisvani Lopes de Vasconcelos⁽¹⁾,
 13 Jéssica Silvestre⁽¹⁾, Paula Rodrigues⁽¹⁾, Raquel Silva de Moura⁽¹⁾, Ricardo
 14 Vilhena Portilho⁽¹⁾, Renata Maculan⁽¹⁾, Marcelo El Azzi⁽¹⁾, Dante
 15 Pazzanese Lanna⁽¹⁾ and José Camisão de Souza⁽¹⁾

16

17 ⁽¹⁾Federal University of Lavras (UFLA), Department of Veterinary
 18 Science, Campus Universitário, PO Box 3037, CEP 37200-000, Lavras,
 19 MG, Brazil.

20 E - mail: jesusveterinario85@posgrad.ufla.br,

21 gisvani_lopes@hotmail.com, jessicasilvestre.ar@hotmail.com,

22 paularodrigues@hotmail.com, raquelmoura@dzo.ufla.br,

23 rportilho@hotmail.com, renatamaculan@yahoo.com.br,

24 marceloelazzi@gmail.com, dplanna@usp.br, jcamisao@dzo.ufla.br.

25 ⁽²⁾Federal University of Lavras (UFLA), Department of Zootecnia,
 26 Campus Universitário, PO Box 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG,
 27 Brazil.

28 E - mail: gisvani_lopes@hotmail.com, renatamaculan@yahoo.com.br.

Abstract - The objective was to detect the presence of polyunsaturated fatty acids (PUFA) in the blood circulation and in the ovarian follicular fluid as a result of linseed oil supplementation in the diet. Six Mangalarga Marchador mares between 2.5 and 22 years old, weighing 397 ± 31.89 kg, with body score of 3 and 6.5, kept on native pasture were used. In a switch over design, mares were randomly allocated to receive 150 ml of vegetable oil daily, containing PUFA n3(62.23 g ALA, 20.34 g LA, 2.27 g EPA, 2.32 g DHA), (n=3) or no supplementation (n=3) in a first replicate. Blood and follicular fluid samples were taken on the first (D0) and every 10 days until the end of the supplementation period (D10-D30). After a 14 day interval, mares were switched across the treatments for a second replicate. Lipid profiles were determined by gas chromatography. Data were submitted to the MIXED and REG procedures of SAS[®]. In the plasma the concentrations of linolenic LNA acid in total fatty acids were higher ($P=0.006$) in the supplemented compared to the control group (1.89 ± 0.13 VS. $1.49 \pm 0.13\%$). In the follicular fluid the concentrations of linoleic acid were similar between treatments (10.9 ± 2.23 VS. 7.61 ± 2.22 %, for supplemented and controls, respectively) and across periods (5.75 ± 3.33 , 12.87 ± 4.09 and $14.2 \pm 4.09\%$ for periods 1 (before treatments started), 2 and 3 (10 and 20 days after treatments started, respectively) for the supplemented group, and 7.55 ± 3.34 , 9.01 ± 4.08 and $6.27 \pm 4.08\%$, for controls, respectively). However the concentrations of DHA tended to be higher ($P=0.06$)

50 in the control group. There were positive correlations between plasma linoleic
51 acid and follicular fluid araquidonic acid ($P=0.0106$; $r^2=0.13$) and between
52 plasma linolenic acid and follicular fluid EPA ($P=0.0004$; $r^2=0.2544$). In
53 conclusion, data indicated a low to moderate relationship between dietary
54 linseed-based oil supplementation studied and circulating and follicular fluid
55 PUFA contents in mares.

56 Index terms: ovarian follicle, PUFA supplementation, equine, DHA.

57

58 **Uso de óleo a base de linhaça na dieta e perfis de ácidos graxos do**
59 **plasma e do líquido folicular em éguas Mangalarga Marchador**

60

61 Resumo- Objetivou-se de detectar a presença de ácidos graxos
62 poliinsaturados (PUFA) na circulação sanguínea e no fluido folicular do
63 ovário equino, como resultado da suplementação de óleo de linhaça na
64 dieta. Foram utilizadas seis éguas Mangalarga Marchador entre 2,5 e 22
65 anos de idade, pesando $397 \pm 31,89$ kg e ECC entre 3 e 6,5, mantidas em
66 pastagem nativa. No desenho experimental, as éguas foram alocados
67 aleatoriamente para receber 150 ml de óleo vegetal por dia, contendo
68 PUFA n3 (62,23 g ALA, 20,34 g LA, 2,27 g EPA, DHA 2,32 g), ($n = 3$)
69 ou sem suplementação ($n = 3$) numa primeira réplica. Quatro amostras de
70 sangue e de fluido folicular foram tomadas no primeiro (D0) e a cada 10
71 dias até ao fim do período de suplementação (D10-D30). Depois de um
72 intervalo de 14 dias, as éguas foram trocadas entre os tratamentos para
73 uma segunda repetição. Perfis lipídicos foram determinados por

74 cromatografia gasosa. Os dados foram submetidos aos procedimentos
75 MIXED e REG do SAS®. No plasma as concentrações de ácido
76 linolênico ALN no total de ácidos graxos foram superiores ($P = 0,006$)
77 nas suplementadas em comparação com o grupo controle ($1,89 \pm 0,13$ vs.
78 $1,49 \pm 0,13\%$). No fluido folicular as concentrações de ácido linoléico
79 foram semelhantes entre os tratamentos ($10,9 \pm 2,23 \pm 7,61$ vs $2,22\%$) e
80 em períodos ($5,75 \pm 3,33$, $12,87 \pm 4,09$ e $14,2 \pm 4,09\%$ para períodos de
81 1, 2 e 3 para o grupo suplementado, e $7,55 \pm 3,34$, $9,01 \pm 4,08$ e $6,27 \pm$
82 $4,08\%$, para o grupo controle, respectivamente). No entanto, as
83 concentrações de DHA tenderam a ser maior ($P = 0,06$) no grupo
84 controle. Houve correlações positivas entre o ácido linoleico e ácido
85 araquidônico no plasma e no fluido folicular ($P = 0,0106$; $r^2 = 0.13$) e
86 entre o ácido linolênico e EPA no plasma e no fluido folicular ($P = 0$
87 0004 ; $R^2 = 0,2544$). Em conclusão, os dados indicam uma baixa à
88 moderada relação entre a suplementação alimentar à base de óleo de
89 linhaça estudado e a circulação e conteúdo de PUFA no fluido folicular
90 em éguas.
91
92 Termos para indexação: folículo ovariano, suplementação de PUFA,
93 equídeos, DHA.

94 Introduction

Equine nutrition has recently been conducted towards the improvement of reproductive, immunological, and exercise endurance aspects. Equine reproduction is under constant challenge considering the various uses horses are involved in, such as racing, ring shows, company, physiotherapy, transport and cattle handling. Usually, equine reproduction must rely on biotechniques such as artificial insemination and embryo transfer, which are widespread among Mangalarga breeders in Brazil.

A good nutritional balance must be applied in order to keep up with such diversity and maintain adequate reproduction efficiency, especially for mares during the reproductive season. If nutrition is inadequate, often times, poor follicular development is found in mares which, as a consequence, do not ovulate normally or have deficient corpora lutea, leading, in turn, to early embryonic losses or underdeveloped fetuses. Nutritional inadequacies may affect reproduction by disrupting lipid transport and the synthesis of hormones linked to the genesis of gametes as well as the general reproductive processes ensuing fertilization. It is important that animals have this nutritional balance before starting the breeding season to get good results.

113 Polyunsaturated fatty acid (PUFA) supplementation has the
114 potential to affect directly the transport of cholesterol in the bloodstream.
115 In addition, it is involved in the metabolization of cholesterol into esters
116 which are soluble in the cell membrane. Thus, the importance of lipid
117 metabolism in reproductive physiology is centered on the availability of
118 substrates for estradiol synthesis in the follicles which is essential for
119 normal follicular growth and ovulation.

120 The objective was to determine the concentrations of
121 polyunsaturated fatty acids in the plasma and in the follicular fluid in
122 mares supplemented with a linseed-based vegetable oil.

123 It was hypothesized that dietary 18:3n3 (omega 3)
124 supplementation increases PUFA in the plasma and ovarian follicular
125 fluid in mares, as a result of elongation and dessaturation in the organism.
126 A secondary hypothesis is that the concentrations of PUFAs in the plasma
127 are correlated to those of the follicular fluid.

128

Material and methods

This article is in accordance with the guidelines established by the Ethical Committe for the use of Animals in Research of the Universidade Federal de Lavras (Comissão de Ética no Uso de Animais da UFLA, Protocolo nº 005/11).

Replicate 1

Animals and facilities

Six Mangalarga Marchador mares between 2.5 and 22 years old, weighing 397 ± 31.89 kg with body score of 3 to 6.5 (method of visual observation and palpation of different areas animal body carried, which has a numerical scale ranging from 1 (excessively lean animal) to 9 (excessively obese animal) (Henneke et al., 1983)). Were used mares were kept during the dry season on native pastures in a continuous grazing system, and with access to water, concentrate and mineral salt feeders. All animals were previously dewormed and evaluated clinically and declared sound by an experienced clinician.

147 The diet consisted of native grass pasture as forage, water and a
148 mineral mix *ad libitum*, and 2 Kg/mare of a concentrate (18% crude
149 protein), fed twice daily (7 a.m. and 3 p.m.). The concentrate were
150 prepared by owners and were a mix of corn grain, soybean meal and
151 wheat bran. In the table 8 was estimated the proportion of PUFA in the
152 diet. In these estimation the relationship n6/n3 was estimated in 1.03/1.

153

154 **Treatments**

155 Mares were randomly allocated to one of two treatments:
156 Treatment A (n=6): unsupplemented or controls; Treatment B (n = 6
157 animals) = A diet plus 150 mL of PUFA n3 oil was offered on top of the
158 concentrate, divided into two 75mL in the morning and 75mL in the
159 afternoon feeding.

160 The linseed-based vegetable oil used contained poly and mono
161 unsaturated fatty acids with addition of salmon oil Canada (Comércio e
162 Indústria Uniquímica Ltda, São Paulo). The fatty acid composition of the
163 oil was determined by gas chromatography: 62.23 g of linolenic acid,
164 20.34 g of linoleic acid, 2.27 g of EPA and 2.32 g of DHA, considering
165 that density of linseed oil was 0.9285 (Clark et al., 1929). The anti-

166 nutritional factors were deactivated and the supplement enriched with
167 vitamin E.

168 Animals received the full supplement only after a 10 day adaptation
169 period during 20 days in an attempt to avoid any metabolic disorder (King
170 et al., 2008). During the first five days of the adaptation period 40 mL of
171 the oil were offered in the morning and again in the afternoon on top of
172 the concentrate. In the next five days this amount was increased to 75 mL,
173 adding to a total of 150 mL daily.

174 After the first replicate, an interval of 14 days was established
175 before the 10 day adaptation period of the second replicate (King et al.,
176 2008). Mares were switched across the treatments, so that, those in the
177 unsupplemented group of the first replicate received the PUFA-n3 oil and
178 the other group did not.

179

180 **Table 1.** Forage fatty acid composition (%)

Linolenic Acid (18:3) n3	EPA ¹ (20:5) n3	DHA ² (22:6) n3	Linoleic Acid (18:2) n6	C20: 3n6 (dihomo- gammalinol enic)	Arachidonic Acid (20:4) n3
40.55	0.003	-	19.48	0.53	-

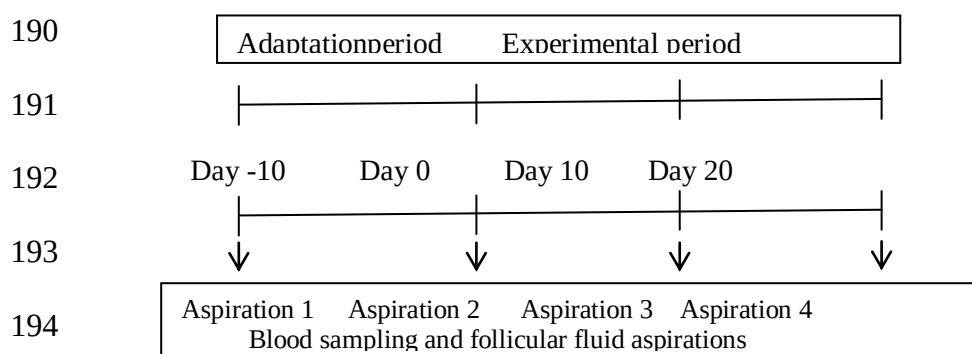
181 ¹EPA= eicosapentaenoic acid

182 ²DHA= docosahexaenoic acid

183

184 Follicular fluid and blood samples

185 Before initiation of the experiment (Day -7) mares received an
 186 intra muscular (IM) injection of 5 mg of dinoprostromethamine
 187 (Lutalyse®, Zoest- USA -). Mares were submitted to four follicular
 188 aspirations (largest follicle detected) at 10-days intervals from Day -10 to
 189 Day 30 (Figure 1).



195 **Figure 1.** Experimental protocol

197 A mild sedation and epidural anesthesia were given before
 198 follicular aspirations according to previously described procedures
 199 (Carnevale; Ginther, 1993) and (Bergfelt; Adams, 1996). A minimum of
 200 0.5 mL of follicular fluid was obtained from the largest follicle detected
 201 on either ovary.

202 The follicular aspiration was guided by a 5.0 MHz microconvex
 203 transducer (UST974-5) with an Aloka SSD 500V unit connected to an

204 extension (WTA, Cravinhos, SP, Brasil), and using an 18G needle and
205 aspiration line and 50 mL centrifuge tubes connected to a vacuum pump
206 adjusted for 150 mmHg (Mozzaquatro et al., 2008). Once the procedure
207 was finished mares received antibiotic and anti-inflammatory
208 combination IM injection (1 mL per 25 kg of bodyweight, Pencivet[®] Plus,
209 Intervet do Brasil Veterinária Ltda, São Paulo).

210 The follicular fluid was immediately stored in sterile plastic tubes
211 at 4°C; later the fluid was centrifuged (1500 x g for ten minutes) and the
212 supernatant collected and stored at -20°C until analysis (Gastal et al.,
213 2010).

214 Blood samples (5 mL) were obtained by jugular venipuncture in a
215 closed system (Vacutainer[®]; BD Diagnostics[®], New Jersey, USA)
216 containing EDTA in the same day as the follicular aspirations. Blood
217 samples were centrifuged (1500 x g for ten minutes). Plasma was
218 separated and stored at -20°C (Soncin et al., 2009).

219

220 **Laboratory Analyses**

221 Determination of the lipid profile was according to a previously
222 described methodology (Folch; Lees; Stanley; 1957).

223 Once the original samples were prepared, 1 mL subsamples
224 were used for the chromatography readings, which were done at the
225 Animal Metabolism and Growth Laboratory of the University of São
226 Paulo (USP) in Piracicaba- SP- Brazil. A 1 µL aliquot of the esterified
227 extract was injected into the chromatography unit and the identification of
228 the fatty acids done by comparison between the retention times and the
229 percentage of the fatty acids present, performed with the *Chromquest 4.1*
230 software (Thermo Electron, Italy). The standard from Supelco TM
231 Component FAME Mix, cat 18919 (Supelco, Bellefonte, PA- USA) was
232 used. It was used a column of gas chromatography of 100m.

233

234 **Statistical Analyses**

235 All data were analyzed by the procedures of the SAS® package
236 (Statistical Analysis System®, Cary NC, EUA, 1998). The fixed effects
237 of treatment, time and interactions on follicular fluid and plasma lipid
238 concentrations were submitted to the Mixed procedure using the lowest

239 Akaikecriterium value as the covariance structure in each case. The effect
240 of animal within treatment was the error term. Means were compared by
241 orthogonal contrasts. The GLM procedure was used to obtain the means
242 and the standard errors.

243 Variables were checked for residual normality (Univariate) and
244 submitted to the Bartlett test to evaluate variance homogeneity. Data
245 which did not meet analysis of variance criteria were transformed (base-
246 10 logarithm; inverse - $1/X$; or squared- X^{*-2}). Variables that could not
247 be adjusted to normality (non-parametric) after transformation were
248 evaluated by the Wilcoxon test (NPAR1WAY) and submitted to the
249 Genmod procedure considering the Poisson and repeated options.

250 Statistical differences and tendencies were defined as probabilities
251 of 5 and 15%.

252 Serum fatty acid concentrations were regressed onto those of the
253 follicular fluid by the Reg procedure.

254

255 **Results and Discussion**

256 Omega 3 and 6 supplementation increased the concentration of
257 linolenic acid in the plasma ($P=0.006$). The sampling period also

258 influenced ($P=0,0001$) plasma LNA, although no interaction was
259 observed between period and treatment (Table 2). The concentration of
260 LNA (Table 2) was lower ($P=0.0001$) in period 1 compared to those of
261 periods 2 e 3. The amount of fatty acids present in the oils offered to the
262 animals influences their plasma concentrations.

263 The plasma concentrations of EPA tended to be greater ($P= 0.11$)
264 in period 2 compared to those of period 1 (Table 2). It has been shown
265 that EPA and DHA were only found in appreciable amounts in the plasma
266 of horses supplemented with oils that contained these fatty acids, e.g.,
267 fish-based oils (Vineyard et al., 2009). Thus, the lower concentrations of
268 EPA and DHA observed in the plasma of the supplemented group (Table
269 2) in respect to an experiment (King et al., 2008) in which higher doses of
270 10, 20 e 40 g/day of EPA (17.81 g) and DHA (21.32 g) containing oil
271 sources were used. This fact could be explained by the low fatty acid
272 concentrations (2.27 g of EPA and 2.32 g of DHA in the diet, density
273 used for linseed oil was 0.9285 (Clark et al., 1929) offered in the
274 supplement used elsewhere.

275 The concentrations of linoleic acid LN tended to be lower ($P=$
276 0.10) in period 1 compared to those of period 3 (Table 3). The

277 concentration of LNA in period 2 was higher ($P=0.05$) compared to those
278 of periods 1 and 3 (Table 4). The concentrations of EPA in the follicular
279 fluid tended ($P=0.11$) to be lower in period 1 compared to that of period
280 2, but were similar to that of period 3 (Table 4). A greater ($P=0.06$)
281 concentration of DHA was found in the follicular fluid of controls mares
282 compared to supplemented (Table 4).

283 The low concentration of EPA and DHA in the plasma of mares
284 supplemented with linseed oil (63.23g of LNA) demonstrates that the
285 conversion rate of PUFA's is limited in equines. The utilization of the
286 same source of supplementation as the one used in the present experiment
287 (61.1 g of LNA) was not enough for the detection of EPA or DHA in the
288 circulation, which reinforces the current observations (Vineyard et al.,
289 2009). Overall, the findings indicate that equines, similarly to humans,
290 have low ability to convert LNA into fatty acids of very long chain, since
291 other authors did not observe increases in LNA derived fatty acids by
292 supplementing humans with linseed oil (Arterburn et al., 2006).

293 In humans the bioconversion rate from LNA to EPA is lower than
294 10% and to DHA is below 0.10% (Williams & Burdge, 2006).

295 Vegetable oil rich in Omega 3 was offered to the animals,
296 expecting its bioconversion into its derivatives (EPA and DHA).
297 According to one previous report (Pawlosky et al., 2001), only 0.2% of
298 the linolenic acid was used for the biosynthesis of EPA in human plasma.
299 The best biosynthetic pathway for very long chain fatty acids is from
300 EPA, so that supplementing with this fatty acid is a better alternative to
301 obtain DHA and that the utilization of linolenic acid may not be the best
302 option (Pawlosky et al., 2001). Therefore, it is concluded that the Omega
303 3 amount offered was minimally used for its main purpose (very long
304 chain fatty acid synthesis), which was demonstrated by the low DHA
305 concentrations in the plasma.

306 Alfa linolenic (LNA) acid may be metabolized by elongation and
307 dessaturation to EPA, DPA and DHA. The eicosapentaenoic acid (DPA,
308 22:5n3) is formed by the elongation of the EPA chain and this conversion
309 occurs in various steps. Firstly, the elongation of EPA to DPA (22:5n3)
310 takes place, followed by the dessaturation of the tetracosapenthaenoic
311 acid (24:5n3) to tetracosahexaenoic (24:6n3) and finally the oxidation to
312 DHA (22:6 n3) in the peroxisome (Kaur et al., 2011).

313 The high LNA percentage (45.1%) offered as a supplement may
314 explain the low DHA concentrations observed in the plasma of linseed
315 oil- supplemented animals.

316 It has been demonstrated that diets with high concentrations of
317 LNA may inhibit the tetracosapentaenoic acid (24:5n3) metabolism to
318 tetracosahexaenoic acid (24:6 n3), limiting the conversion to DHA (Kaur
319 et al., 2011; Pawlosky et al., 2001).

320 The highest concentration of DHA in the control group could be
321 due to a residual effect the first stage. 14 day intervals for the change of
322 groups were left, this time may have been insufficient to reduce the
323 follicular fluid PUFA this being a limitation of the experimental design
324 (Table 4).

325 Linoleic acid uses $\Delta 6$ desaturase for its bioconversion into its
326 metabolites, similarly to the α -linolenic acid. Thus, they compete for this
327 enzyme, resulting in greater concentrations of omega 6 fatty acids.
328 Moreover, the $\Delta 6$ desaturase have greater affinity for the omega3 series
329 fatty acids and this cause a restriction dependent on the omega 6 diet
330 content. Therefore, the maintenance of an adequate balance between the
331 dietary sources of omega 3 and 6 in human nutrition is very important

332 (Perini et al., 2010). However, the current concentrations of omega 6 and
333 omega 3, respectively, 19.10 and 1.89 % observed indicate that the
334 bioconversion favored the omega 6 end point. This may be related to a
335 greater previous reserve of omega 6 in the mares, considering that even
336 the control animals had also high concentrations of omega 6.

337 The concentrations of the omega 3 fatty acid series were lower
338 (EPA 0.07% e DHA 0,03%) than those of the omega 6series (dihomo-
339 gamalinolenic 0.16% and araquidonic acid 4.40%) in the circulation
340 (Tables 2 and 3). This suggests that a greater bioconversion of the series 6
341 into series 3 fatty acid may have occurred. Higher omega 6 fatty acid
342 concentrations in the follicular fluid were also evident (Table 5).

343 In humans an elevated linolenic acid flux rate was observed,
344 which has decreased the biosynthesis of fatty acids derived from omega 3.
345 Moreover, the oxidation of the α -linolenic acid is high, according to some
346 authors (Vermunt et al., 2000). In the linolenic acid metabolism, there
347 was a significant loss of this fatty acid through the skin (Pawlosky et al.,
348 2001).

349 There was a positive correlation ($P=0.0140$; $r^2=0.2677$) between
350 plasma LNA and follicular fluid EPA concentrations (Figure 2).

351 Similarly, there was a positive correlation ($P=0.0238$; $r^2=0.2113$) between
352 plasma LN and araquidonic acid concentrations in the follicular fluid
353 (Figure 3).

354 The positive correlations between plasma linolenic acid and
355 follicular fluid EPA and between linoleic and araquidonic acid
356 concentrations in the follicular fluid indicate the possible conversion of the
357 former fatty acid in these two later very long chain derivatives. These
358 correlations establish an important link between nutrition and
359 reproductive function.

360 It is suggested that this fatty acid is transported through its
361 lipoproteins to different body tissues in the organism, improving the
362 permeability functions of the cells, probably influencing immune
363 responses and exercise endurance. With longer supplementation periods,
364 it would be expected that greater elongation rates and dessaturation of this
365 fatty acid would occur, which could be benefic to equine reproduction.

366 There were no effects of treatment, period or interaction on the
367 other PUFA plasma or follicular fluid concentrations analyzed (Tables 2
368 to 5).

369 **Conclusion**

370 The dietary supplementation with linseed oil enriched with 63.23
371 g of α -linolenic acid, 20.34 g of linoleic acid, 2.27 g of EPA and 2.32 g of
372 DHA influence their concentrations of this fatty acid in the plasma of
373 supplemented mares however did not influence the n3 PUFA
374 concentrations in follicular fluid. This demonstrates that there is low
375 conversion in the horse body, it is necessary to provide nutritional sources
376 with higher concentrations of EPA and DHA for a period exceeding 20
377 days of treatment, to be potential for its use as a reproductive
378 nutraceutical in mares.

379

380 **Acknowledgements**

381 We thank the ABCCMM for providing the financial support that
382 made possible to analyze the fatty acid profiles.

383 We thank Fazenda Casa Branca for providing the animals and
384 facilities for this experiment, as well as, for their warm reception to our
385 crews.

386 To the CNPq for the scholarship provided.

387 To Drs. José Figueiredo de Souza Júnior, Saulo Araújo Naves and
388 Ricardo Vilhena Portilho for their tremendous enthusiasm and help with
389 the field procedures for follicular aspirations.

390 To Drs. Peter Bitencourt Faria for his help in processing the
391 samples laboratory experiment.

392 We thank Syntec do Brasil for providing the anesthetics used for
393 follicular aspirations.

394 To the GERE members who were so kind to dedicate their time
395 and efforts for this project

396 To the Graduate Program in Veterinary Sciences-UFLA and to
397 Professors José Camisão de Souza, Paula Gomes Rodrigues and Raquel
398 Silva Moura.

399

400 **References**

401

402 ARTERBURN, L.M.; BAILEY, E.H.; OKEN, H. Distribution,
403 interconversion, and dose response of n3 fatty acids in humans. **Am.**
404 **J.Clin.Nutr.**, v.83, p.1467S–76S, 2006.

- 405 BERGFELT, D.R.; ADAMS, G.P. Ovarian synchronization following
406 follicle ablation in mares. **Theriogenology**, v.45, p.327-331, 1996.
- 407 CARNEVALE, E.M.; GINTHER, O.J. Use of a linear ultrasonic
408 transducer for the transvaginal aspiration and transfer of oocytes in the
409 mare. **J. Equi. Vet. Sci.**, v.13, p.331-333, 1993.
- 410 CLARK,G.L.;TSCHENTKE, H.L. Physico-Chemical Studies on the
411 Mechanism of the Drying of Linseed Oil'I-Changes in Density of Films.
412 **Industrial and Engineering Chemistry**, v.21, p.621-627, 1929.
- 413 FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. **J. Biol. Chem.**, p. 226-497,
414 1957.
- 415 GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Short-
416 term feed restriction decreases the systemic and intrafollicular
417 concentrations of leptin and increases the vascularity of the preovulatory
418 follicle in mares. **Theriogenology**, v.73, p.1202–1209, 2010.
- 419 HENNEKE, D.R.; POTTER, G.D.; KRIEDER, J.L.; YEATS, B.F.
420 Relationship between body condition score, physical measurements and
421 body fat percentage in mares. **Equi. Vet. J.**, v. 15, p. 371-372, 1983.

- 422 KAUR,G.; CAMERON-SMITH,D.; GARG, M.; SINCLAIR, A. J.
423 Docosapentaenoic acid (22:5n-3): A review of its biological effects. **Prog.**
424 **Lipid. Res.**, v.50, p.28-34, 2011.
- 425 KING, S.S.; ABUGHAZALEH, A.A.; WEBEL, S.K.; JONES, K.L.
426 Circulating fatty acid profiles in response to three levels of dietary
427 omega-3 fatty acid supplementation in horses. **J. Anim. Sci.**, v.86,
428 p.1114-1123, 2008.
- 429 MOZZAQUATRO, F. D. **Aspiração folicular na égua para indução da**
430 **função lútea.** 2008. 69p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de
431 Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul.
- 432 **Nutrient Requirements of Horses:** Sixth Revised Edition, 2007.
- 433 PAWLOSKY, R.J.; HIBBELN, J.R.; NOVOTNY, J.A.; SALEM, N.J.
434 Physiological compartmental analysis of α -linolenic acid metabolism in
435 adult humans. **J. Lipid.Research**, v.42, p.1257-1265, 2001.
- 436 PERINI, J. A. L.; BRAIDOTTI, F. S.; CYLÉIA, S.; LAGUILA, J. E. V.;
437 MACHADO, M. O. D.; MATSHUSHITAM, EVELÁZIO, N.S.,
438 VERGÍLIO, J.V.:Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo
439 em mamíferos e resposta imune. **Nutr**, v. 23, 2010.

- 440 SONCIN, M. R. S. P.; FURTADO, C. E.; SILVA, A. A.; RIGOLON,
441 L.P.; CAVALIERI, F. L. B.; MORAES, G. V. Digestibilidade aparente,
442 crescimento folicular e concentração de metabólitos sanguíneos de éguas
443 recebendo concentrado com semente de linhaça integral (*Linum*
444 *usitatissimum* L.). **ActaScientiarum Anim. Sci.**, v.31, p.191-197, 2009.
- 445 VERMUNT, S.H.; MENSINK, R.P.; SIMONIS, M.M.; HORNSTRA, G.
446 Effects of dietary alpha-linolenic acid on the conversion and oxidation of
447 ¹³C-alpha-linolenic acid. **Lipids**, v.35,p.137–142, 2000.
- 448 VINEYARD, K.R.; WARREN, L.K.; KIVIPELTO, J. Effect of dietary
449 omega-3 fatty acid source on plasma and red blood cell membrane
450 composition and immune function in yearling horses. **Animal Science**,
451 v.88, p.248-257, 2009.
- 452 WILLIAMS, C.M.; BURDGE, G. Long-chain n-3 PUFA: Plant v. marine
453 sources. **Proc. Nutr. Soc.**, v.65, p.42–50, 2006.

Table 2. Effect of linseed-based vegetable with addition of salmon oil Canada supplemetation on the plasma concentrations of poliunsaturated Omega 3 fatty acid (%) in Mangalarga Marchador mares.

Fatty Acid	Treatment	N	Period (N) ¹			Mean	Effect P=		
			1 (6)	2 (6)	3 (6)		T	P	TxP
C18:3 n3 (Linolenic Acid)	Supplemented	6	1,26±0,21	1,84±0,24	2,57±0,24	1,89±0,13 ^a	0,006	0,0001	0,66
	Control	6	1,03±0,19	1,74±0,24	1,67±0,24	1,48±0,13 ^b			
	Mean		1,14±0,14 ^a	1,79 ±0,17 ^b	2,12±0,17 ^b				
C20:5 n3 (EPA)	Supplemented	6	0,06±0,01	0,10±0,02	0,06±0,02	0,07±0,01	0,11	0,11	0,23
	Control	6	0,03±0,01	0,07±0,02	0,05±0,02	0,04±0,01			
	Mean		0,04±0,01 ^A	0,08±0,01 ^B	0,05±0,01 ^{AB}				
C22:6 n3 (DHA)	Supplemented	6	0,04±0,02	0,04±0,04	0,01±0,05	0,03±0,02	0,92	0,49	0,38
	Control	6	0,07±0,03	-0,02±0,06					
	Mean		0,06±0,01	0,01±0,03					

Distinct letter indicate differences (P<0,05) and tendencies (P<0.10). ¹Period 1: 10 dias antes do início dos tratamentos days before theini; initiation of the treatments; Periods 2 and 3: 10 and 20 days after initiation ot the treatments.

Table 3. Effect of linseed-based vegetable with addition of salmon oil Canada supplementation on the plasma concentrations of polyunsaturated Omega 6 fatty acid (%) in Mangalarga Marchador mares.

Fatty Acid	Treatment	N	Period (N) ¹			Mean	Effect P=		
			1 (6)	2 (6)	3 (6)		T	P	TxP
C18:2 n6 (Linoleic Acid)	Supplemented	6	14,40±2,30	19,75±2,77	25,73±2,77	19,1±1,54	0,17	0,10	0,58
	Control	6	15,56±2,26	24,84±2,81	28,60±2,81	23,0±1,56			
	Mean		14,10±1,60 ^A	22,30±1,95 ^{AB}	27,17±1,95 ^B				
C20:3n6 (dihomo-gama linolênic)	Supplemented	6	0,16±0,03	0,13±0,03	0,20±0,03	0,16±0,02	0,21	0,87	0,15
	Control	6	0,11±0,02	0,13±0,03	0,09±0,03	0,11±0,02			
	Mean		0,13±0,02	0,13±0,02	0,14±0,02				
C20:4 n6 (Arachidonic Acid)	Supplemented	6	4,26±0,70	3,76±0,80	5,13 ±0,80	4,40±0,44	0,60	0,23	0,62
	Control	6	4,49±0,64	4,40±0,80	4,53 ±0,80	4,50±0,43			
	Mean		4,38±0,46	4,08±0,55	4,83 ±0,55				

Distinct letter indicate differences (P<0,05) and tendencies (P<0,10). ¹Period 1: 10 dias antes do início dos tratamentos days before theini; initiation of the treatments; Periods 2 and 3: 10 and 20 days after initiation of the treatments.

Table 4. Effect of linseed-based vegetable with addition of salmon oil Canada supplemetation on the follicular fluid concentrations of poliunsaturated Omega 3 fatty acid (%)in Mangalarga Marchador mares.

Fatty Acid	Treatment	N	Períod (N) ¹			Mean	Effect P=		
			1 (6)	2 (6)	3 (6)		T	P	TxP
C18:3 n3 (Linolenic Acid)	Supplemented	6	0,32±0,10	0,80±0,12	0,31±0,12	0,47 ±0,07	0,48	0,05	0,43
	Control	6	0,44±0,10	0,49±0,12	0,28 ±0,12	0,40 ±0,07			
	Mean		0,38±0,07 ^a	0,63±0,09 ^b	0,30 ±0,09 ^a				
C20:5 n3 (EPA)	Supplemented	6	0,08±0,03	0,08±0,04	0,07±0,04	0,08 ±0,02	0,11	0,08	0,74
	Control	6	0,06±0,04	0,26±0,04	0,19±0,04	0,16±0,02			
	Mean		0,07±0,02 ^A	0,17±0,03 ^B	0,13 ±0,03 ^{AB}				
C22:6 n3 (DHA)	Supplemented	6	0,01±0,01	0,00±0,01	0,01±0,01	0,01±0,00 ^A	0,06	0,49	0,92
	Control	6	0,02±0,01	0,07±0,02	0,03±0,01	0,04±0,00 ^B			
	Mean		0,02±0,00	0,04±0,01	0,03±0,01				

Distinct letter indicate differences (P<0,05) and tendencies (P<0,10). ¹Period 1: 10 dias antes do início dos tratamentos days before theini; initiation of the treatments; Periods 2 and 3: 10 and 20 days after initiation ot the treatments.

Table 5. Effect of linseed-based vegetable with addition of salmon oil Canada supplementation on the follicular fluid concentrations of polyunsaturated Omega 6 fatty acid (%) in Mangalarga Marchador mares.

Fatty Acids	Treatment	N	Períod (N) ¹			Mean	Efeito P=		
			1 (6)	2 (6)	3 (6)		T	P	TxP
SC18:2 n6 (linoleic acid)	Supplemented	6	5,75±3,33	12,87 ±4,09	14,21 ±4,09	10,9±2,23	0,74	0,31	0,75
	Control	6	7,55±3,34	9,01±4,08	6,27±4,08	7,61±2,22			
	Mean		6,65±2,36	10,94±2,90	10,24±2,90				
C20:3n6 (dihomo-gama linolênic)	Supplemented	6	0,07±0,02	0,11 ±0,02	0,07 ±0,03	0,08±0,01	0,71	0,43	0,72
	Control	6	0,10±0,02	0,09±0,03	0,07±0,03	0,09±0,02			
	Mean		0,09±0,01	0,10±0,02	0,07±0,02				
C20:4 n6 (Arachidonic acid)	Supplemented	6	6,39±1,41	6,11±1,72	10,41±1,72	7,64±0,94	0,94	0,95	0,92
	Control	6	7,13±1,41	8,16±1,72	9,18±1,72	8,16±0,93			
	Mean		6,76±1,00	7,14±1,22	9,80±1,22				

Distinct letter indicate differences (P<0,05) and tendencies (P<0,10). ¹Period 1: 10 dias antes do início dos tratamentos days before theini; initiation of the treatments; Periods 2 and 3: 10 and 20 days after initiation of the treatments.

Table 6. Body weight and body condition score during Step 1 of the experiment.

Mare	Age(years)	Treatment	Period 1		Period 2		Period 3		Period 4	
			(19/04/2012)		(30/04/2012)		(10/05/2012)		(22/05/2012)	
			BW* (kg)	ECC*	BW*(kg)	ECC*	BW*(kg)	ECC *	BW*(kg)	ECC*
1	3,5	S	368	4	350	4	380	4,5	380	4
2	6	S	413	5	390	4,5	413	4,5	470	5
3	2,5	S	345	4,5	390	5	390	5,5	370	5
4	8,5	C	440	6	450	6	440	6	440	6
5	3,5	C	375	4,5	390	5	330	4,5	345	4
6	22	C	390	3,5	400	4	400	4	413	4
Mean± Standard deviation			388,5±30,95	4,58±0,86	395±29,29	4,75±0,75	392,16±33,66	4,83±0,75	403±46,77	4,66±0,81

*Body weight

*Condition score

Table 7. Body weight and body condition score during Step 2 of the experiment.

Mare	Age(years)	Treatment	Period 5		Period 6		Period 7		Period 8	
			(5/06/2012)		(14/06/12)		(22/06/2012)		(4/07/2012)	
			BW* (kg)	ECC*	BW*(kg)	ECC*	BW*(kg)	ECC *	BW*(kg)	ECC*
1	3,5	S	380	4	370	3,5	400	4	370	4
2	6	S	480	5	461	4,5	420	4	436	4,5
3	2,5	S	400	5,5	370	5	390	5,5	370	5,5
4	8,5	C	461	6,5	436	6	460	6	420	6
5	3,5	C	345	4	330	4	345	4,5	350	4,5
6	22	C	390	3,5	420	4	375	3,5	370	3
Mean± Standard deviation			409,33±51,2 3	4,75±1,12	397,83±49,17	4,5±0,89	398±39,32	4,58±0,97	386±33,82	4,58±1,06

*Body weight

*Condition score

Table 8. Estimation of PUFA concentration in the diet of experiment **, on dry matter basis.

SOURCE	Composition of feed [17]			Quantidade consumed			
	EE (%)	Omega 6 (%)	Omega 3 (%)	Intake# (Kg/DM/day)	Intake n6 (g/d)	Intake n3 (g/d)	Relation n6/n3
Corn grain	4,20	49	0,5	1,10	22.63	0.23	98/1
Soybean meal	1,10	53.0	8,0	0,43	2.51	0.38	66/1
Wheat bran	4,3	0	0	0,18	3.07	0	0
Native pasture	2,00	19,48	40,55	6,2	24.15	50,28	1/2.08
Oil UFLA					20,34	62,23	1/3.06
Total	11,6	121.48	49,05	7,91	72,7	113,09	1/1.55

*Analyzed values by gas chromatographic.

Fonte: [17] NRC (2007).

2% BW of 400 kg, concentrated 1,8 Kg, forage DM 6,2 Kg.

** Hypothetical estimate of preparation of grains in concentrated (18% CP: 61% corn grain, 24% soybean meal, 10% wheat bran.

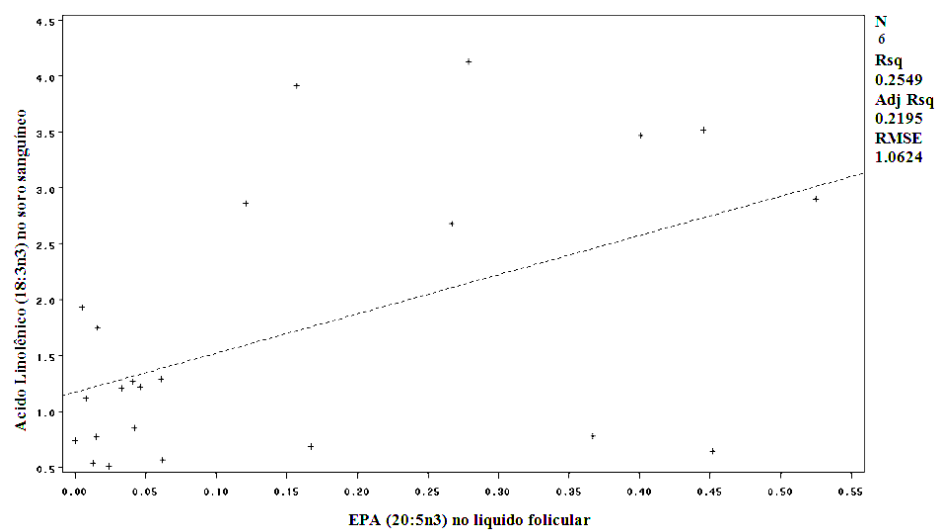


Figure 2. Correlation between plasma LNA and follicular fluid EPA concentrations.

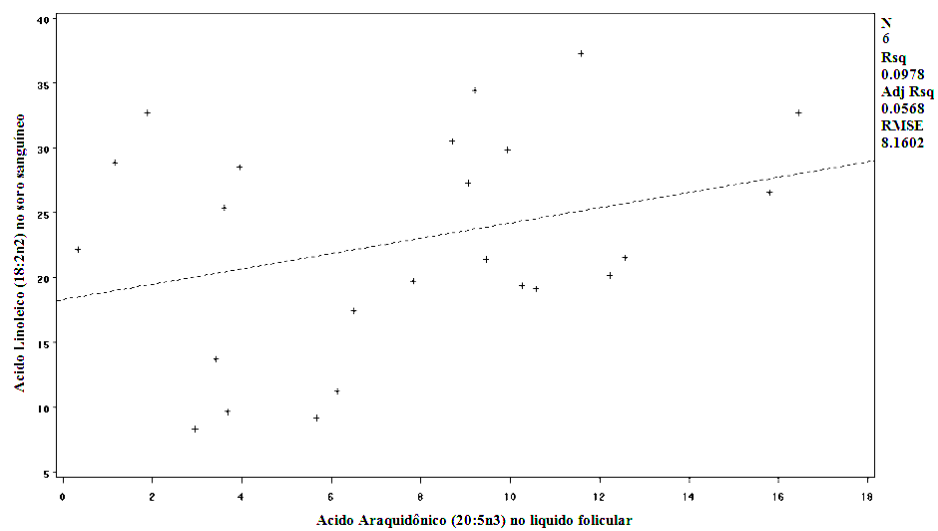


Figure 3. Correlation between plasma LN and araquidonic acid concentrations in the follicular fluid.