

UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

LETÍCIA RODRIGUES FARIA

**PERFIL METABÓLICO E DINÂMICA FOLICULAR DE
CORDEIRAS SANTA INÊS COM CONSUMO *AD-LIBITUM* OU
RESTRITO DE DIETA COM INCLUSÃO DE SOJA GRÃO
TOSTADA**

LAVRAS-MG

2020

LETÍCIA RODRIGUES FARIA

**PERFIL METABÓLICO E DINÂMICA FOLICULAR DE CORDEIRAS SANTA INÊS
COM CONSUMO *AD-LIBITUM* OU RESTRITO DE DIETA COM INCLUSÃO DE
SOJA GRÃO TOSTADA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes, para a obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Nadja Gomes Alves

Orientadora

LAVRAS-MG

2020

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

Faria, Letícia Rodrigues.

Perfil metabólico e dinâmica folicular de cordeiras Santa Inês com consumo *ad-libitum* ou restrito de dieta com inclusão de soja grão tostada / Letícia Rodrigues Faria. - 2020.

64 p.

Orientador(a): Nadja Gomes Alves.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. lipídeos. 2. dinâmica folicular. 3. ômega-6. I. Alves, Nadja Gomes. II. Título.

LETÍCIA RODRIGUES FARIA

**PERFIL METABÓLICO E DINÂMICA FOLICULAR DE CORDEIRAS SANTA INÊS
COM CONSUMO *AD-LIBITUM* OU RESTRITO DE DIETA COM INCLUSÃO DE
SOJA GRÃO TOSTADA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 08 de outubro de 2020.

Dr. José Camisão de Souza/UFLA

Dr. Renato Ribeiro de Lima/UFLA

Dr. Rafael Fernandes Leite/UFSJ

Dra. Nadja Gomes Alves

Orientadora

LAVRAS-MG

2020

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

LETÍCIA RODRIGUES FARIA – Filha de Itamar Rodrigues de Faria e Gilcélia Couto Quintiliano, nascida na cidade de Formiga – MG, no dia 07 de Julho de 1994. Ingressou no curso de Zootecnia em 2012 na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) em Jaboticabal – SP. No ano de 2013, realizou transferência externa para a Universidade Federal de Lavras, onde se graduou em Zootecnia no ano de 2018. Em agosto de 2018 ingressou no curso de Mestrado em Zootecnia, na área de Produção e Nutrição de Ruminantes na Universidade Federal de Lavras, sob a orientação da Profa. Dra. Nadja Gomes Alves. Em 08 de outubro de 2020, submeteu-se a defesa da dissertação, tendo sido considerado APROVADA pela comissão examinadora.

Aos meus avós Maria Semeliana (*in memoriam*) e José Antônio (*in memoriam*) por serem meus exemplos de vida, por todo amor e cuidado.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e por tudo que Ele me proporcionou. À Nossa Senhora Aparecida por me amparar e aumentar a minha fé.

Aos meu pais Itamar e Gilcélia, pelo apoio, ensinamentos e ajuda em todos momentos sem cessar. A minha irmã Lavínia e minha afilhada Eduarda, por me tornarem uma pessoa melhor.

À minha querida avó Maria Semeliana (*in memoriam*), pelo amor, conversas e tempo que passamos juntas, sendo a pessoa a quem me recordo e me espelho todos os dias. Ao meu avô, José Antônio (*in memoriam*) pelo ombro acolhedor.

A toda a minha família por me propocionarem momentos únicos e pelo incentivo constante. Aos meus amigos que tornaram tudo mais fácil e alegre.

Ao Wesley, por todo amor, companheirismo e conselhos. Por acreditar em nós e por me fazer feliz.

À minha orientadora Nadja Gomes Alves, que fez com que a nossa relação se tornasse amizade. Pela orientação, conselhos e por me fazer acreditar que com otimismo, tudo é possível.

Ao Matheus e a Adelir do Departamento de Química (DQI) pela parceria e amizade cultivada no desenvolvimento do projeto.

Aos professores José Camisão, Renato e Rafael por toda ajuda e por terem aceito de bom grado o convite para participar na banca de defesa.

A todos os integrantes do Núcleo de Estudos em Nutrição e Reprodução Animal (NUTRAN) pela ajuda e por todos esses anos de aprendizado.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Zootecnia (DZO) em especiais aos professores, por todo conhecimento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À todos aqueles que torceram por mim, muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
RESUMO INTERPRETATIVO E RESUMO GRÁFICO	13
CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO	14
1 INTRODUÇÃO	14
2 UTILIZAÇÃO DE LIPÍDEOS PELOS RUMINANTES	15
3 METABOLISMO RUMINAL DE LIPÍDEOS	17
4 FONTES LIPÍDICAS	21
5 METABOLISMO PÓS-RUMINAL DE LIPÍDEOS.....	23
6 DINÂMICA FOLICULAR OVARIANA EM OVELHAS.....	25
6.1 RESTRIÇÃO ALIMENTAR	28
7 OS LIPÍDEOS NA REPRODUÇÃO DE RUMINANTES	30
8 CONSIDERAÇÕES GERAIS	34
REFERÊNCIAS.....	36
CAPÍTULO 2 – ARTIGO	42
ABSTRACT	43
1 INTRODUCTION.....	44
2 MATERIAL AND METHODS.....	45
2.1 Animals, experimental diets and feeding	45
2.2 Weighing and feed conversion.....	47
2.3 Follicular dynamics	48
2.3 Hormone and metabolites.....	48
2.4 Fatty acid extraction.....	49
2.5 Statistical analyses	50
3 RESULTS	51
3.1 Feed intake and performance	51
3.2 Blood metabolites, insulin and fatty acids	53
3.3 Follicular dynamics	55
4 DISCUSSION.....	58
5 CONCLUSIONS.....	61
REFERENCES	61

PERFIL METABÓLICO E DINÂMICA FOLICULAR DE CORDEIRAS SANTA INÊS COM CONSUMO *AD LIBITUM* OU RESTRITO DE DIETA COM INCLUSÃO DE SOJA GRÃO TOSTADA

RESUMO – A restrição alimentar pode comprometer o desenvolvimento folicular ovariano. A suplementação lipídica além de aumentar o conteúdo energético da dieta, atua positivamente na dinâmica folicular e pode ser uma estratégia para reduzir possíveis efeitos prejudiciais da restrição alimentar na atividade ovariana. Os objetivos desse estudo foram avaliar o efeito da suplementação lipídica na forma de soja grão tostada e quebrada e da restrição alimentar moderada sobre a concentração sanguínea de ácido linoleico, no perfil metabólico e no desenvolvimento folicular ovariano de cordeiras Santa Inês que ovularam ou não antes da avaliação da dinâmica folicular. As hipóteses testadas foram: 1) cordeiras que receberam suplementação lipídica com soja grão tostada têm maior concentração de ácido linoleico no sangue; 2) a suplementação lipídica relaciona-se positivamente ao desenvolvimento folicular ovariano 3) a restrição alimentar moderada compromete o desenvolvimento folicular; 4) a suplementação lipídica com soja grão tostada reduz os efeitos prejudiciais da restrição alimentar moderada no desenvolvimento folicular e 5) as cordeiras que ovularam durante o período experimental tiveram melhor perfil metabólico e melhor desenvolvimento folicular do que aquelas que não ovularam. Trinta e cinco cordeiras Santa Inês com $21,5 \pm 1,7$ kg de peso corporal e $95,0 \pm 7,9$ dias de idade foram aleatoriamente distribuídas em delineamento em blocos desbalanceados, com oito blocos com quatro animais e um bloco com três animais. Os tratamentos foram organizados em um fatorial $2 \times 2 \times 2$, onde o fator A foi o consumo (*ad-libitum* ou restrito), o fator B a suplementação lipídica (sem ou com suplementação lipídica com soja grão tostada) e o fator C o status fisiológico (ausência ou ocorrência de ovulação). As dietas foram fornecidas até $37,4 \pm 2,95$ kg. A restrição alimentar imposta foi de 15% do consumo *ad-libitum*. A ocorrência da ovulação foi determinada pela concentração sérica de progesterona maior ou igual a 1 ng/mL. O perfil metabólico foi avaliado aos $29,9 \pm 0,56$ e $35,0 \pm 0,39$ kg de peso corporal. A dinâmica folicular foi avaliada aos $30,7 \pm 1,17$ e $36,0 \pm 0,91$ kg de peso corporal por 17 ± 5 dias consecutivos em cada ocasião. A concentração de ácido linoleico e esteárico no sangue foi determinada aos $>26-28$, $>28-32$, $>32-34$, $>34-38$ kg de peso corporal nos animais alimentados *ad-libitum* e naqueles sob restrição que consumiram soja tostada. Na análise de consumo de nutrientes, ganho de peso médio diário, conversão alimentar, metabólitos sanguíneos, insulina, número de ondas, número de folículos, diâmetro do maior e do segundo maior folículo e taxa de crescimento do maior folículo foram considerados os efeitos de consumo (*ad-libitum* ou restrito), suplementação lipídica e status fisiológico e as respectivas interações duplas e a tripla. Na análise de ácido linoleico e esteárico foi considerado o efeito de tratamento. O consumo de matéria seca foi maior ($P < 0,05$) nos animais com consumo *ad-libitum* sem suplementação lipídica que ovularam; enquanto foi menor nos animais com consumo *ad-libitum* com suplementação lipídica que ovularam (interação consumo x suplementação lipídica x status fisiológico, $P < 0,05$). Considerando os animais alimentados *ad-libitum* e que receberam suplementação lipídica aqueles que não ovularam tiveram maior consumo de extrato etéreo ($P < 0,05$); enquanto aqueles que ovularam tiveram menor consumo de extrato etéreo (interação consumo x suplementação lipídica x status fisiológico, $P < 0,05$). O ganho de peso médio diário foi menor ($P < 0,05$) nos

animais de consumo *ad-libitum* com suplementação lipídica e que ovularam em comparação aos que não ovularam. A conversão alimentar foi menor ($P < 0,05$) nos animais com consumo restrito do que naqueles com consumo *ad-libitum*. As concentrações glicose e de triglicerídeos foram maiores ($P > 0,05$) nos animais que receberam suplementação lipídica; enquanto que nenhuma alteração foi observada na concentração de insulina ($P > 0,05$). As concentrações séricas de HDL e colesterol foram maiores ($P < 0,05$) nos animais que não receberam suplementação lipídica e com consumo restrito em comparação aos animais com consumo *ad-libitum*; enquanto não houve diferença entre os animais que receberam suplementação lipídica (interação consumo x suplementação lipídica, $P < 0,05$). A concentração de HDL foi maior ($P < 0,05$) nos animais que ovularam em relação aos que não ovularam. A concentração de colesterol não diferiu ($P > 0,05$) de acordo com o status fisiológico. As concentrações séricas de ácido linoléico e esteárico não foram alteradas ($P > 0,05$) pelo consumo ou pela suplementação lipídica. O número de ondas foi maior ($P < 0,05$) nos animais com consumo *ad-libitum* do que nos animais de consumo restrito. Os efeitos principais de tratamento, bem como as interações dupla e tripla não foram significativos ($P > 0,05$) no número de folículos, diâmetro do maior e do segundo maior folículos e taxa de crescimento do maior folículo. A suplementação lipídica com soja grão tostada melhorou o status metabólico, sem efeitos concomitantes na concentração de ácido linoleico no sangue e na dinâmica folicular. Exceto pela redução no número de ondas, a dinâmica folicular não foi comprometida pela restrição alimentar moderada. Apesar da maior concentração de HDL no sangue das cordeiras que ovularam, esses animais não apresentaram melhora no desenvolvimento folicular.

Palavras-chave: restrição alimentar, lipídeos, ácido linoleico, desenvolvimento folicular, ômega-6.

METABOLIC PROFILE AND FOLLICULAR DYNAMICS OF SANTA INÊS EWE LAMBS WITH AD LIBITUM OR RESTRICTED INTAKE OF DIET WITH INCLUSION OF ROASTED WHOLE SOYBEANS

ABSTRACT – Feed restriction can compromise ovarian follicular development. Lipid supplementation, increases the energy content of the diet and acts positively on follicular dynamics and may be a strategy to reduce possible harmful effects of feed restriction on ovarian activity. The objectives of this study were to evaluate feed restriction and lipid supplementation as roasted whole soybeans on serum concentrations of linoleic acid, on metabolic profile and on follicular dynamics of Santa Ines ewe lambs that ovulated or not before ovarian assessments. Thus, we hypothesized that 1) ewe lambs fed with roasted soybean had greater concentration of linoleic acid in the blood, 2) lipid supplementation is positively related to follicular dynamics, 3) feed restriction compromises follicular development, 4) lipid supplementation with roasted whole soybeans reduces the harmful effects of feed restriction on follicular development and 5) ewe lambs having ovulation during the experimental period had better metabolic profile and enhanced follicular development than those no having ovulation. Thirty-five Santa Ines ewe lambs with 21.5 ± 1.7 kg of body weight and 95.0 ± 7.9 days of age, were randomly distributed in unbalanced block design with eight blocks with four animals and one block with three animals. Treatments were arranged in a factorial $2 \times 2 \times 2$ based on level of intake (*ad-libitum* – AL or restricted – FR), on lipid supplementation (without or with lipid supplementation with roasted whole soybeans) and on the physiological status (absence or occurrence of ovulation). Diets were supplied to 37.4 ± 2.95 kg (mean \pm standard deviation). The feed restriction was 15% of *ad-libitum* intake. Ovulation was detected by a serum progesterone concentration ≥ 1 ng/mL. The metabolic profile was assessed at 29.9 ± 0.56 and 35 ± 0.39 kg of body weight. Follicular dynamics were assessed at 30.7 ± 1.17 and 36.0 ± 0.91 kg of body weight at 17 ± 5 consecutive days in each occasion. The serum linoleic acid concentration was determined at 26-28, 28-32, 32-34 and 34-38 kg of body weight in AL-fed animals fed and FR-fed animals that consumed roasted whole soybeans. In the analyze of nutrients intake, average daily weight gain, feed conversion, blood metabolites, insulin, number of waves, number of follicles, diameter of the largest and second largest follicle and growth rate of the largest follicle, the intake level (*ad-libitum* or restricted) were considered, lipid supplementation and physiological status and the respective two- and three-way interactions. For the linoleic and stearic acid serum concentration, the treatment effect were considered. Dry matter intake was greater ($P < 0.05$) in unsupplemented-AL animals that ovulated compared to those not-ovulated; conversely, dry matter intake was lower in supplemented-AL animals that ovulated compared to those not-ovulated (three-way interaction, $P < 0.05$). Considering that supplemented-AL animals, those that not-ovulated had a greater ether extract intake ($P < 0.05$); while those ovulated had ether extract intake (intake level \times lipid supplementation \times physiological status interaction, $P < 0.05$). The average daily weight gain was lower ($P < 0.05$) in supplemented-AL animals that ovulated compared to those that not-ovulated. Feed conversion was lower ($P < 0.05$) in FR-fed than AL-fed animals. Glucose and triglyceride concentrations were higher ($P > 0.05$) in supplemented animals; while no changes were observed in the insulin concentration ($P > 0.05$). HDL and cholesterol serum concentrations were higher ($P < 0.05$) in unsupplemented-FR compared to AL-fed animals; while there was no

difference between animals that received lipid supplementation (intake level x lipid supplementation interaction, $P < 0.05$). The HDL concentration was higher ($P < 0.05$) in the animals that ovulated compared to not-ovulated animals. Cholesterol concentration did not differ ($P > 0.05$) according to physiological status. Linoleic and stearic acid serum concentrations were not altered ($P > 0.05$) by intake level or lipid supplementation. The number of waves was higher ($P < 0.05$) in AL-fed than FR-fed animals. The main treatment effects, as well as the two- and three-way interactions were not significant ($P > 0.05$) for the number of follicles, diameter of the largest and second largest follicles and growth rate of the largest follicle. In conclusion, lipid supplementation with roasted whole soybeans improve the metabolic status, with no concomitant effect on linoleic acid blood concentration and on follicular dynamics. Except by reduction in number of waves, the follicular dynamics was not compromised by moderate feed restriction. Despite the higher HDL blood concentration in ovulated ewe lambs, these animals did not present enhanced follicular development.

Keywords: feed restriction, lipids, linoleic acid, follicular development, ω -6.

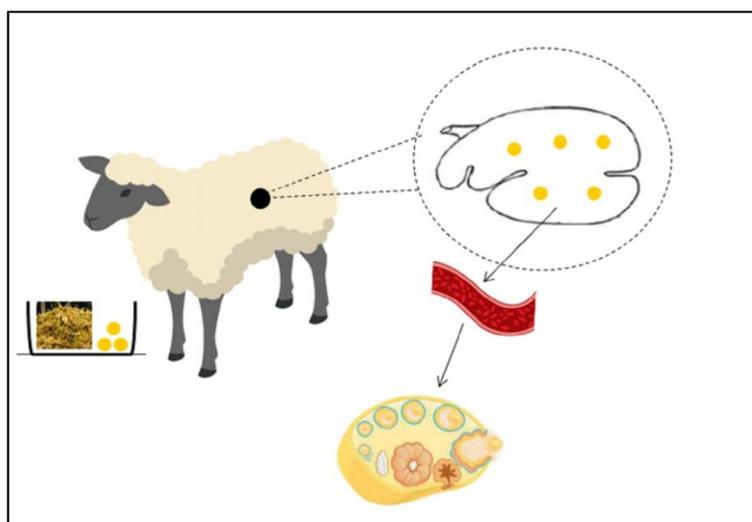
RESUMO INTERPRETATIVO E RESUMO GRÁFICO

Perfil metabólico e dinâmica folicular de cordeiras Santa Inês com consumo *ad libitum* ou restrito de dieta com inclusão de soja grão tostada

Elaborado por **Letícia Rodrigues Faria** e orientado por **Nadja Gomes Alves**

A nutrição é um dos fatores que mais impactam na reprodução animal. Em condições de restrição alimentar, o desempenho reprodutivo pode ser prejudicado. A suplementação lipídica pode ser uma estratégia para contornar os possíveis efeitos prejudiciais da restrição alimentar no desenvolvimento folicular. Porém, a quantidade desses ácidos graxos que chega ao intestino para absorção pode ser diferente da dieta, devido ao metabolismo no sistema digestivo dos ruminantes. Nesse sentido, os objetivos do trabalho foram avaliar o efeito da suplementação lipídica com soja grão tostada e quebrada e da restrição alimentar sobre a concentração sanguínea de ácido linoleico, no perfil metabólico e no desenvolvimento folicular ovariano de cordeiras Santa Inês que ovularam ou não antes da avaliação ovariana.

O consumo de matéria seca e de nutrientes foi menor nos animais recebendo suplementação lipídica, com consumo restrito. Apesar da redução do consumo, o ganho de peso foi maior, possibilitando melhor conversão alimentar nesses animais. O perfil metabólico melhorou nos animais que receberam suplementação lipídica. Já as concentrações de ácido linoleico e esteárico não foram afetadas pelo consumo e pela suplementação lipídica. Houve menor número de ondas foliculares para os animais com consumo restrito. O número de folículos, o diâmetro do maior e do segundo maior folículo e a taxa de crescimento do maior folículo não foram afetados pelos tratamentos. A suplementação lipídica com soja grão tostada melhora o status metabólico, sem efeitos concomitantes na concentração de ácido linoleico no sangue e na dinâmica folicular. Exceto pela redução no número de ondas, a dinâmica folicular não foi comprometida pela restrição alimentar moderada. Apesar da maior concentração de HDL no sangue das cordeiras que ovularam, esses animais não apresentaram melhora no desenvolvimento folicular.



Efeitos da suplementação lipídica com soja grão tostada no perfil de ácidos graxos no sangue e dinâmica folicular de cordeiras Santa Inês. Soja grão tostada (). ●

1 CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO

2

3 1 INTRODUÇÃO

4

5 A nutrição é um dos principais fatores que afetam o desenvolvimento folicular,
6 a esteroidogênese, a ovulação e, conseqüentemente, o desempenho reprodutivo
7 dos animais (BARTLEWSKI; BABY; GIFFIN, 2011). Nas condições de restrição
8 alimentar, pode ocorrer redução das concentrações plasmáticas de glicose e de
9 insulina (FERRARETTO et al., 2014), prejudicando o desenvolvimento folicular
10 (YING et al., 2011). A suplementação lipídica pode ser uma estratégia para
11 contornar os possíveis efeitos prejudiciais da restrição alimentar no desenvolvimento
12 folicular. Os ácidos graxos poli-insaturados das famílias ômega 3 e 6, principalmente
13 o ácido linoleico e linolênico, influenciam a reprodução de ruminantes (PALMQUIST;
14 JENKINS, 2017). A atuação positiva desses ácidos graxos na reprodução se dá por
15 meio do fornecimento de energia ou por mecanismos independentes desse
16 (MATTOS; STAPLES; THATCHER, 2000), tais como na esteroidogênese, produção
17 de prostaglandinas e dinâmica folicular ovariana (STAPLES; BURKE; THATCHER,
18 1998).

19 A quantidade desses ácidos graxos que chega no intestino para ser absorvida
20 pode ser diferente da fornecida na dieta, devido ao processo de biohidrogenação
21 ruminal (DOREAU et al., 2016). Nesse processo, são formados ácidos graxos
22 saturados a partir de insaturados, que são considerados tóxicos para as bactérias
23 ruminais (JENKINS, 1993). No sentido de reduzir a taxa de biohidrogenação ruminal
24 dos ácidos graxos insaturados, podem ser utilizadas as sementes oleaginosas,
25 como a soja grão, que têm reduzida taxa de liberação de lipídeos no rúmen. A
26 adoção de tratamento térmico como a tostagem nessas sementes oleaginosas
27 contribuem ainda mais para a redução da taxa de biohidrogenação (REDDY;
28 MORRILL; NAGARAJA, 1994). Quando as sementes oleaginosas são submetidas
29 ao processo de tostagem ocorre a complexação de aldeídos com proteínas
30 protegendo os ácidos graxos poli-insaturados da biohidrogenação ruminal
31 (TROEGELER-MEYNADIER et al. 2014).

32 A soja grão é um alimento rico em ácidos graxos poli-insaturados, com mais
33 da metade do seu conteúdo lipídico sendo composto por ácido linoleico (DOREAU et
34 al., 2016). Com a utilização dessa fonte lipídica, é possível aumentar a concentração
35 de ácido linoleico no sangue (LIU et al., 2008; ZACHUT et al., 2008), que pode ser
36 direcionado para atuar no sistema reprodutivo dos animais. Porém, esses estudos
37 são com vacas leiteiras, que têm exigência e metabolismo diferentes de pequenos
38 ruminantes. Aliado a isso, para a associação entre suplementação lipídica e
39 desenvolvimento folicular é importante que a quantidade de ácido linoleico
40 consumido e sua concentração no sangue sejam conhecidos e que seja relacionada
41 ao desenvolvimento folicular.

42 Com base nesse contexto, as hipóteses testadas no estudo foram: 1)
43 cordeiras que receberam suplementação lipídica com soja grão tostada têm maior
44 concentração de ácido linoleico no sangue; 2) a suplementação lipídica relaciona-se
45 positivamente ao desenvolvimento folicular ovariano; 3) a restrição alimentar
46 moderada compromete o desenvolvimento folicular; 4) a suplementação lipídica com
47 soja grão tostada reduz os efeitos prejudiciais da restrição alimentar moderada no
48 desenvolvimento folicular e 5) as cordeiras que ovularam durante o período
49 experimental tiveram melhor perfil metabólico e melhor desenvolvimento folicular do
50 que aquelas que não ovularam. Os objetivos deste estudo foram avaliar o efeito da
51 suplementação lipídica na forma de soja grão tostada e quebrada e da restrição
52 alimentar moderada sobre a concentração sanguínea de ácido linoleico, no perfil
53 metabólico e no desenvolvimento folicular ovariano de cordeiras Santa Inês que
54 ovularam ou não antes da avaliação ovariana.

55

56 **2 UTILIZAÇÃO DE LIPÍDEOS PELOS RUMINANTES**

57

58 Os lipídeos são importantes componentes de membranas celulares e
59 aumentam a capacidade de absorção de vitaminas lipossolúveis. Além dessas
60 funções, ao serem suplementados na dieta de animais ruminantes o principal foco é
61 como fonte energética, pois fornecem 2,25 vezes mais energia do que os
62 carboidratos. Porém, normalmente, o custo da inclusão de lipídeos em substituição a
63 carboidratos pode ser maior, além dos efeitos prejudiciais do excesso de lipídeos no

64 metabolismo ruminal. Por isso, os lipídeos têm sido utilizados principalmente como
65 moduladores dos sistemas imune e reprodutivo. A suplementação lipídica propicia
66 também redução da metanogênese, que pode aumentar a retenção de energia pelo
67 animal e reduzir as emissões de metano para o meio ambiente (LOURENÇO;
68 RAMOS-MORALES; WALLACE, 2010). Além disso, com a suplementação lipídica
69 pode ocorrer aumento de isômeros do ácido linoleico conjugado (CLAs) nos
70 produtos de origem animal, considerados benéficos para a saúde humana
71 (PALMQUIST et al., 2005; JENKINS et al., 2007).

72 Nas forragens e nos grãos, que são os alimentos mais utilizados nas dietas
73 de ruminantes, os lipídeos estão presentes na forma de triglicerídeos, fosfolipídeos e
74 glicolipídeos (DOREAU et al., 2016; JENKINS et al., 2007), que contêm
75 principalmente ácidos graxos insaturados. Há predominância do ácido linolênico (cis-
76 9, cis-12, cis-15, 18:3) nas forragens e linoleico (cis-9, cis-12, 18:2) nos grãos
77 (DOREAU et al., 2016). A dieta basal, contém cerca de 4% de lipídeos (NRC, 2001)
78 sendo que, aproximadamente, a metade são ácidos graxos poli-insaturados
79 (SANTOS et al., 2008). Com a suplementação lipídica, esse teor pode chegar a 7%,
80 pois acima desse valor podem ocorrer efeitos prejudiciais dos lipídeos no
81 metabolismo ruminal (NRC, 2001).

82 Ao considerar o limite máximo de lipídeos na dieta, frequentemente a
83 contabilização da quantidade de ácidos graxos insaturados que chega no rúmen-
84 retículo é feita apenas com os ácidos graxos insaturados oriundos da
85 suplementação, contudo, recomenda-se que essa contabilização seja a partir
86 daqueles da dieta total (JENKINS; KLEIN; MECHOR, 2009). Essa recomendação é
87 indicada pois, se for contabilizada somente a quantidade de ácidos graxos
88 insaturados da suplementação, pode ocorrer variação nas respostas entre os
89 estudos. A contabilização tanto da quantidade de ácidos graxos insaturados da
90 suplementação quanto da dieta basal é definida como "*rumen unsaturated fatty acid*
91 *load*" - RUFAL (JENKINS; KLEIN; MECHOR, 2009). A RUFAL é calculada pela soma
92 da quantidade de ácido oleico, linoleico e linolênico, que são os principais ácidos
93 graxos insaturados da dieta. A relação da RUFAL em dietas sem suplementação
94 lipídica e em dietas com suplementação lipídica, em levantamento realizado por
95 Jenkins, Klein e Mechor (2009), foi de 0,68. Essa relação indica que 68% da RUFAL
96 é oriunda da dieta basal, o que destaca a importância de realizar essa
97 contabilização.

98

99 **3 METABOLISMO RUMINAL DE LIPÍDEOS**

100

101 O metabolismo de lipídeos em ruminantes tem certas peculiaridades que o
102 diferenciam em comparação com monogástricos. Os lipídeos consumidos são
103 metabolizados no rúmen antes de serem absorvidos no intestino delgado (DOREAU
104 et al., 2016). O perfil de ácidos graxos que alcança o intestino delgado e,
105 conseqüentemente, é absorvido na corrente sanguínea não é o mesmo do perfil
106 ingerido. Os ácidos graxos consumidos são majoritariamente insaturados, já os
107 ácidos graxos que chegam no intestino delgado são principalmente saturados
108 (Jenkins et al., 2007). Essa transformação é feita por microrganismos ruminais por
109 dois processos principais: lipólise e biohidrogenação.

110 No processo de lipólise ocorre quebra dos lipídeos em ácidos graxos livres e
111 glicerol por enzimas denominadas lipases. No fluido ruminal não há lipases oriundas
112 de plantas, portanto, os lipídeos são hidrolisados por lipases microbianas (JENKINS
113 et al., 2007). As lipases microbianas são produzidas principalmente por bactérias da
114 espécie *Anaerovibrio lipolytica*, (DOREAU et al., 2016). Além de ácidos graxos não
115 esterificados, no processo de lipólise também há produção de glicerol e galactose,
116 que são convertidos a ácidos graxos voláteis, principalmente propionato e butirato
117 (DOREAU; FERLAY, 1994). A lipólise pode ser influenciada pelo ponto de fusão dos
118 ácidos graxos, considerando maior taxa de lipólise para os ácidos graxos com menor
119 ponto de fusão, como os oriundos de sementes de oleaginosas (PALMQUIST et al.,
120 2005). Após a lipólise, o radical carboxila está livre, possibilitando que os ácidos
121 graxos possam ser isomerizados e hidrogenados por isomerases e redutases
122 microbianas, respectivamente (DOREAU et al., 2016) no processo de
123 biohidrogenação.

124 Inicialmente, acreditava-se que o processo de biohidrogenação ocorria como
125 mecanismo para eliminação de equivalentes redutores no rúmen. Porém, o consumo
126 de equivalentes redutores no processo de biohidrogenação é muito baixo. Portanto,
127 a teoria mais aceita na literatura é que o processo de biohidrogenação é um
128 mecanismo de defesa das bactérias ruminais aos ácidos graxos insaturados, que
129 são considerados tóxicos para as mesmas (JENKINS, 1993). Por serem
130 considerados tóxicos, os ácidos graxos insaturados podem afetar o crescimento

131 microbiano (JENKINS, 1993; JENKINS; KLEIN; MECHOR, 2009), prejudicando a
132 digestibilidade da fibra (JENKINS, 1993) e o consumo de matéria seca (JENKINS et
133 al., 2007). A suplementação lipídica pode reduzir (STAPLES; BURKE; THATCHER,
134 1998; BARLETTA et al., 2016) ou não o consumo de matéria seca (STAPLES;
135 BURKE; THATCHER, 1998; JUNQUEIRA et al., 2019). A influência da
136 suplementação lipídica no consumo de matéria seca depende do perfil de ácidos
137 graxos que chega ao rúmen. Ácidos graxos insaturados têm menor ponto de fusão
138 no fluido ruminal adquirindo capacidade de penetrar na membrana das bactérias e
139 causar morte celular, sendo considerados mais prejudiciais do que os saturados
140 para o metabolismo ruminal. As bactérias gram positivas são as mais susceptíveis a
141 esse mecanismo, que resulta em redução do número total de bactérias celulolíticas
142 e, conseqüentemente, da digestibilidade ruminal da fibra, limitando o consumo de
143 matéria seca. Além disso, o perfil de ácidos graxos que chega ao duodeno também
144 pode afetar o consumo de matéria seca, pois os ácidos graxos insaturados podem
145 ser absorvidos e oxidados no fígado mais rapidamente, gerando equivalentes
146 redutores e aumentando a saciedade, em comparação aos ácidos graxos saturados
147 (ALLEN, 2000).

148 No processo de biohidrogenação ocorre redução das ligações duplas e
149 formação de isômeros intermediários, até a completa hidrogenação do ácido graxo.
150 A via de biohidrogenação do ácido linoleico inicia com a isomerização para a
151 formação de um ácido linoleico conjugado (CLA), o ácido rumênico (*cis-9, trans-11*
152 *C18:2*). O ácido rumênico é então hidrogenado a ácido vaccênico (*trans-11 C18:1*),
153 que posteriormente é hidrogenado a ácido esteárico (*C18:0*), como passo final da
154 biohidrogenação ruminal (DOREAU et al., 2016; JENKINS, 1993; JENKINS; KLEIN;
155 MECHOR, 2009). Esses processos são realizados por bactérias do grupo A, que
156 realizam a hidrogenação do ácido linoleico em ácido rumênico e vaccênico, das
157 quais a principal é a *Butyrivibrio fibrisolvens*; e por bactérias do grupo B que
158 convertem o ácido vaccênico em ácido esteárico, sendo a principal a *Butyrivibrio*
159 *proteoclasticus* (LOURENÇO; RAMOS-MORALES; WALLACE, 2010). Normalmente,
160 as bactérias do grupo B são mais sensíveis aos efeitos tóxicos dos ácidos graxos
161 insaturados do que as bactérias do grupo A (PALMQUIST et al., 2005). Portanto, os
162 dois grupos são o ponto chave da biohidrogenação dos lipídeos e vão determinar
163 quais ácidos graxos serão produzidos no processo de biohidrogenação e,
164 posteriormente, absorvidos no intestino. A principal espécie de bactérias que estão

165 relacionadas ao processo é a *Butyrivibrio fibrisolvens* (LOURENÇO; RAMOS-
166 MORALES; WALLACE, 2010). A ação de protozoários no processo de
167 biohidrogenação é praticamente nula, no entanto, os mesmos têm influência
168 significativa na disponibilidade de CLAs para o animal (JENKINS et al., 2007). Isso
169 ocorre possivelmente porque os protozoários incorporam esses intermediários a
170 partir da ingestão de bactérias ruminais e os liberam no conteúdo ruminal quando
171 ocorre morte e lise celular, aumentando o fluxo desses ácidos graxos para a
172 absorção intestinal (LOURENÇO; RAMOS-MORALES; WALLACE, 2010).

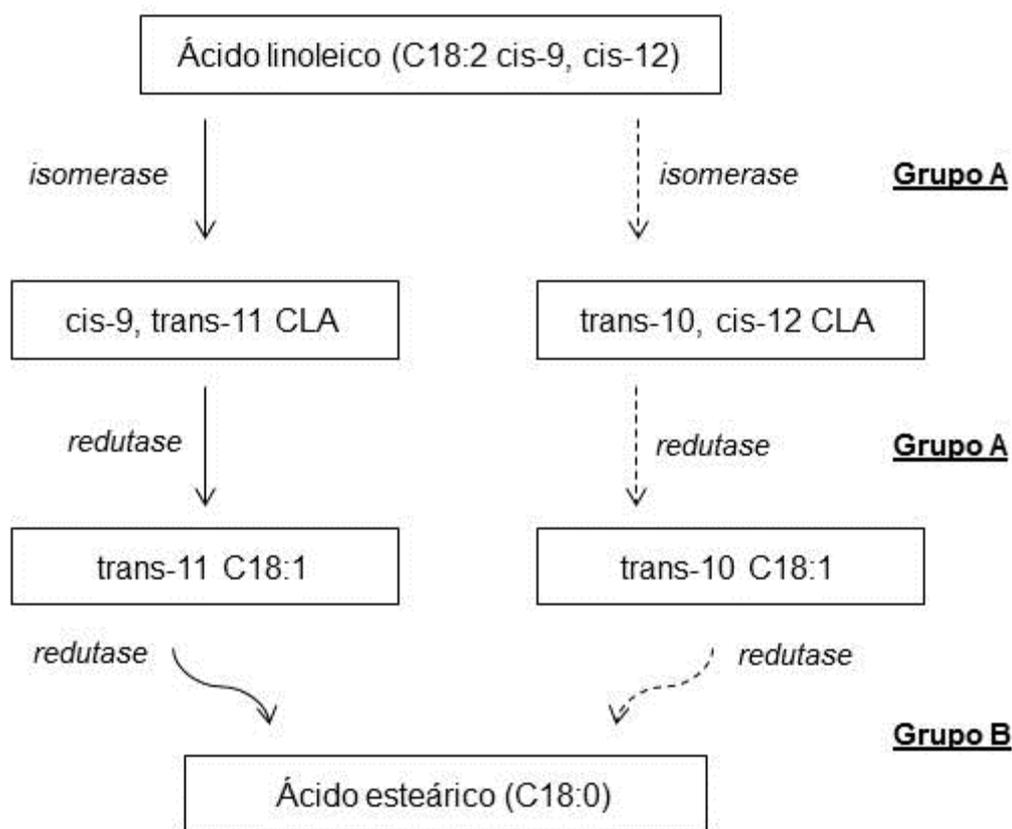
173 A biohidrogenação ruminal é influenciada por vários fatores como a
174 frequência de alimentação (NRC, 2001), o consumo de matéria seca, a taxa de
175 passagem da digesta, a taxa de liberação do óleo contido nas sementes (STAPLES;
176 BURKE; THATCHER, 1998), a quantidade de forragem (KUCUK et al., 2001) e a
177 presença de ionóforos na dieta (LOURENÇO; RAMOS-MORALES; WALLACE,
178 2010), a quantidade de ácido graxo consumida (JENKINS; KLEIN; MECHOR, 2009;
179 STAPLES; BURKE; THATCHER, 1998) e o pH ruminal (VAN NEVEL; DEMEYER,
180 1996). Devido a todos esses fatores, a taxa de biohidrogenação do ácido linoleico
181 pode variar de 65 a 95% (GLASSER et al., 2008) ou até mesmo de 25 a 100%
182 (DOREAU; FERLAY, 1994). Nas situações em que há alta quantidade de ácidos
183 graxos insaturados na dieta e redução do pH ruminal, a via da biohidrogenação é
184 alterada para uma via intermediária, com formação de outro isômero de CLA, o
185 *trans*-10, *cis*-12 C18:2. Isso ocorre pois nessas condições há alterações na
186 distribuição da população microbiana, favorecendo as bactérias que são mais
187 resistentes ao baixo pH ruminal, que participam da via de produção do *trans*-10, *cis*-
188 12 C18:2 (Figura 1 – DOREAU et al., 2016; JENKINS; KLEIN; MECHOR, 2009).
189 Além dos fatores mencionados, os diferentes métodos analíticos e as adaptações
190 utilizadas nos estudos durante os processos de extração e esterificação do ácido
191 linoleico contribuem para a variação entre estudos na proporção desse ácido graxo
192 que é biohidrogenada (DOREAU; FERLAY, 1994).

193

194

195

196 Figura 1 – Representação esquemática da biohidrogenação ruminal do ácido
 197 linoleico (C18:2 *cis*-9, *cis*-12) pela via normal (setas sólidas) e pela via alterada
 198 (setas pontilhadas) realizada por bactérias do grupo A e por bactérias do grupo B.



199

200

Fonte: Adaptado de Jenkins, Klein, Mechor (2009).

201 De acordo com esses fatores, o processo de biohidrogenação pode ser
 202 alterado impactando na composição de ácidos graxos do conteúdo duodenal
 203 (DOREAU et al., 2016; FIEVEZ et al., 2007). Embora as principais vias metabólicas
 204 estejam bem documentadas, a diversidade de vários intermediários na digesta, nos
 205 tecidos e nos produtos de origem animal indica a complexidade dos processos de
 206 biohidrogenação e das bactérias ruminais envolvidas (PALMQUIST et al., 2005).
 207 Segundo os autores, prever o resultado de mudanças na dieta é complicado devido
 208 aos inúmeros fatores que influenciam a biohidrogenação e pelas interações do
 209 ambiente ruminal, o que dificulta a estimativa da quantidade de intermediários que
 210 são gerados no processo e tornam-se disponíveis para absorção.

211

212 4 FONTES LIPÍDICAS

213

214 Devido aos efeitos adversos da suplementação lipídica no metabolismo
215 ruminal, tem crescido o interesse na utilização de fontes lipídicas que são pouco
216 afetadas pela biohidrogenação ruminal e disponibilizam maior quantidade de ácidos
217 graxos insaturados para a absorção intestinal. Segundo Lourenço, Ramos-Morales e
218 Wallace (2010) a eficácia dos suplementos lipídicos no controle da biohidrogenação
219 ruminal varia de acordo com a forma física do suplemento. Nesse sentido,
220 nutricionistas têm utilizado principalmente sementes oleaginosas e os sabões de
221 cálcio de ácidos graxos como fonte de ácidos graxos insaturados nas dietas para
222 ruminantes.

223 Com a utilização de sementes oleaginosas e sabões de cálcio de ácidos
224 graxos na dieta ocorre redução da taxa de biohidrogenação do ácido linoleico e
225 aumento do seu fluxo abomasal em comparação a outras fontes lipídicas, como o
226 óleo (BARLETTA et al., 2016). Isso ocorre porque, a taxa com que os ácidos graxos
227 insaturados são liberados dos alimentos expostos aos microrganismos ruminais
228 determina o quanto a fermentação ruminal vai ser afetada (NRC, 2001). As paredes
229 das células de sementes oleaginosas funcionam como proteção física parcial contra
230 a biohidrogenação, devido aos lipídeos estarem das mesmas (DOREAU et al.,
231 2016). A utilização de sementes oleaginosas tem sido preconizada em relação aos
232 sabões de cálcio de ácidos graxos, pois são uma fonte lipídica mais econômica por
233 não passarem por processamento industrial algum (FREITAS JR. et al., 2018) e
234 contribuem como fonte de outros nutrientes para a dieta (NRC, 2001). Além disso,
235 nos dias atuais, algumas técnicas de proteção dos ácidos graxos, como a utilização
236 de tratamentos químicos com formaldeído tem sido questionadas por consumidores,
237 devido a possível presença de resíduos nos alimentos de origem animal e em alguns
238 países a utilização é proibida (DOREAU et al., 2016).

239 Como fonte de semente oleaginosa, a soja grão tem sido amplamente
240 utilizada nas dietas de ruminantes. A soja grão tem na sua composição 20% de
241 ácidos graxos, sendo que 53,5% destes correspondem ao ácido linoleico (DOREAU
242 et al., 2016), característico da composição lipídica de sementes oleaginosas não
243 processadas, que contêm grande proporção de ácidos graxos poliinsaturados de

244 cadeia longa (STAPLES; BURKE; THATCHER, 1998). Ao utilizar esse fonte lipídica,
245 como a taxa de liberação dos ácidos graxos no rúmen é lenta, os efeitos adversos
246 da suplementação lipídica no consumo de matéria seca podem ser evitados. Childs
247 et al. (2008) não observaram redução no consumo de matéria seca em novilhas de
248 corte alimentadas com soja grão, em dieta com 16,9% de extrato etéreo. Essa
249 resposta também foi observada em vacas leiteiras com a inclusão de 12, 18 ou 24%
250 de soja grão tostada na dieta (KNAPP; GRUMMER; DENTINE, 1991) e em cordeiras
251 que receberam dieta com inclusão de 29,2% de soja grão tostada, totalizando 9,8%
252 de extrato etéreo na dieta (JUNQUEIRA et al., 2019). Segundo Knapp, Grummer e
253 Dentine (1991), a inclusão de soja grão tostada em teores até 24% na dieta não
254 afeta o consumo de matéria seca e o metabolismo ruminal.

255 A forma com que essa fonte lipídica pode ser utilizada varia, podendo ser *in*
256 *natura*, com algum processamento ou tratamento térmico. Chouinard, Girard e
257 Brisson (1997) avaliaram a suplementação de soja grão com ou sem tratamento
258 térmico no desempenho de vacas leiteiras. Nesse estudo, foi observado que o
259 consumo de matéria seca tendeu a reduzir nos animais alimentados com soja grão
260 *in natura* moída em comparação ao grupo alimentado com soja grão tostada porém,
261 a produção de leite não diferiu, resultando em maior eficiência alimentar no grupo
262 alimentado com soja grão tostada. Com relação ao processamento, os autores
263 observaram que o maior tamanho de partículas da soja grão tostada reduz a
264 biohidrogenação ruminal de ácidos graxos poli-insaturados (CHOUINARD; GIRARD;
265 BRISSON, 1997). Isso possivelmente ocorreu pela redução da área de contato das
266 bactérias nessas partículas maiores que propiciou reduzida taxa de biohidrogenação
267 ruminal. Já Tice, Eastridge e Firkins (1994) observaram que a suplementação
268 lipídica com soja grão tostada não afetou a biohidrogenação ruminal independente
269 do tamanho de partículas. Ou seja, mesmo que essa fonte lipídica tenha taxa de
270 liberação lenta dos ácidos graxos no rúmen, a eficiência em controlar a
271 biohidrogenação pode variar, afetando o fluxo desses ácidos graxos para o intestino.
272 Porém, em ambos estudos com redução ou não da taxa de biohidrogenação
273 (CHOUINARD; GIRARD; BRISSON, 1997; TICE; EASTRIDGE; FIRKINS, 1994), a
274 concentração de ácido linoleico no leite das vacas alimentadas com soja grão
275 tostada não foi influenciada pelo tamanho das partículas do alimento.

277 5 METABOLISMO PÓS-RUMINAL DE LIPÍDEOS

278

279 Os ácidos graxos de cadeia curta (até 12 átomos de carbono) são absorvidos
280 no epitélio ruminal e os de cadeia média e longa estão presentes na digesta ruminal
281 composta de partículas de alimentos, células microbianas e células endoteliais de
282 descamação (DOREAU; FERLAY, 1994). Ao chegarem no intestino delgado, para
283 que ocorra a absorção é necessário que os ácidos graxos sejam solubilizados no
284 meio aquoso. Esse processo de solubilização é feito pelos sais biliares e pela
285 lisolecitina, que são adicionados na digesta, com a posterior formação das micelas
286 (LOCK et al., 2006). As micelas são absorvidas principalmente na região do jejuno e
287 ocorre a re-esterificação dos ácidos graxos nas células epiteliais intestinais onde
288 triglicerídeos e fosfolipídeos são incorporados em quilomícrons e em lipoproteínas
289 de muito baixa densidade (DOREAU; FERLAY, 1994) para serem transportados na
290 corrente sanguínea.

291 Esse processo de absorção é influenciado pelo consumo e pela
292 digestibilidade intestinal dos ácidos graxos. O consumo de ácidos graxos é
293 positivamente relacionado com a absorção e inversamente relacionado a
294 digestibilidade intestinal dos ácidos graxos (NRC, 2001). O maior consumo de
295 ácidos graxos afeta negativamente a digestibilidade total dos ácidos graxos
296 saturados ou insaturados (BOERMAN et al., 2015). A digestibilidade intestinal dos
297 ácidos graxos também pode ser influenciada pelo consumo de matéria seca e pelas
298 características próprias dos ácidos graxos (NRC, 2001), como o tamanho da cadeia,
299 o grau de insaturação e a posição das duplas ligações (MATTOS; STAPLES;
300 THATCHER, 2000). Dessa forma, os ácidos graxos insaturados, que têm menor
301 ponto de fusão, são mais solúveis no fluido ruminal, apresentam maior
302 digestibilidade intestinal e portanto, são absorvidos mais facilmente do que os ácidos
303 graxos saturados.

304 A digestibilidade intestinal de ácidos saturados como o ácido palmítico e
305 esteárico varia de 68 a 78% e dos insaturados como o ácido linoleico e linolênico de
306 74 a 82% (BOERMAN et al., 2015). No levantamento de 22 estudos feito por Glasser
307 et al. (2008), a digestibilidade do ácido linoleico foi de aproximadamente 72%, com
308 variação de 20%. Segundo Doreau e Ferlay (1994), a forma física dos suplementos
309 lipídicos não altera a digestibilidade intestinal dos ácidos graxos. Porém, na meta-

310 análise de Boerman et al. (2015) foi observado que a digestibilidade intestinal dos
311 ácidos graxos foi maior quando os animais foram suplementados com sabões de
312 cálcio de ácidos graxos do que quando os animais foram suplementados com
313 sementes de oleaginosas. Segundo os autores, isso possivelmente ocorreu pela
314 maior disponibilidade dos ácidos graxos oriundos dos sabões de cálcio no intestino
315 delgado, em relação aos ácidos graxos das sementes de oleaginosas. Essa
316 divergência com relação a influência da forma física dos suplementos lipídicos na
317 digestibilidade intestinal dos ácidos graxos pode ser por diferenças no
318 processamento desses suplementos. A proteção dos sabões de ácidos graxos pode
319 gerar quebra parcial da matriz proteica conduzindo a liberação de ácidos graxos
320 livres no fluido ruminal ou a proteção pode ser tão forte, que reduz a absorção
321 intestinal de ácidos graxos (DOREAU et al., 2016). Com relação as sementes
322 oleaginosas pode ocorrer quebra dessas sementes pelos processos de mastigação
323 e ruminação ou até mesmo durante o processamento (JENKINS; BRIDGES, 2007),
324 aumentando a taxa de liberação dos ácidos graxos no rúmen, que podem influenciar
325 o fluxo duodenal desses ácidos graxos.

326 Além da influência da fonte lipídica, o fluxo duodenal dos ácidos graxos, pode
327 ser influenciado por tratamentos térmicos das fontes lipídicas. No estudo de Reddy,
328 Morrill e Nagaraja (1994), o processo de tostagem reduziu a taxa de
329 biohidrogenação dos ácidos graxos oriundos de soja grão, em comparação aos da
330 soja grão crua. Essa redução da taxa de biohidrogenação pode ocasionar em
331 aumento do fluxo desses ácidos graxos para o duodeno e, conseqüentemente,
332 maior absorção desses ácidos graxos.

333 A absorção do total de ácidos graxos no intestino delgado de ruminantes é
334 linear até 1.200 g/dia, que é aproximadamente 6% do consumo de matéria seca
335 (THATCHER et al., 2004). Lock et al. (2006) relataram dados de 20 estudos de
336 metabolismo e digestão de lipídeos e observaram que para o ácido linoleico a
337 quantidade que está prontamente disponível para a absorção é menor do que a
338 quantidade consumida (56 vs. 272 g/dia), devido ao processo de biohidrogenação
339 ruminal desse ácido graxo. Já com relação ao ácido esteárico, observa-se o
340 contrário, com maior quantidade prontamente disponível para a absorção do que a
341 quantidade consumida (397 vs. 97 g/dia), pois esse ácido graxo é o mais produzido
342 pelo processo de biohidrogenação ruminal. Com a utilização de soja grão, a

343 quantidade de ácido linoleico disponível para absorção no intestino delgado pode
344 variar de 30 a 120 g/dia em animais consumindo 300 g/dia desse ácido graxo
345 (STAPLES; BURKE; THATCHER, 1998). Utilizando essa mesma fonte lipídica, a
346 concentração plasmática de ácido linoleico aumentou de 49,60 g/100g do total de
347 ácidos graxos no sangue de vacas do grupo controle para 51,94 g/100g no grupo
348 que recebeu suplementação lipídica (LIU et al., 2008). Zachut et al. (2008)
349 analisaram o perfil de ácidos graxos do plasma sanguíneo de vacas leiteiras
350 recebendo suplementação lipídica com fontes com alta ou baixa quantidade de
351 ácidos graxos insaturados. Os animais alimentados com alta quantidade de ácidos
352 graxos insaturados tiveram maior concentração de ácido linoleico no plasma do que
353 os animais alimentados com baixa quantidade desses ácidos graxos (56,24 vs.
354 53,68 g/100g do total de ácidos graxos). Já a concentração de ácidos graxos
355 saturados foi maior nos animais que receberam baixa quantidade do que naqueles
356 que receberam alta quantidade de ácidos graxos insaturados. Essa maior
357 quantidade de ácido linoleico no sangue, faz com que esse ácido graxo esteja
358 disponível para atuar no organismo do animal.

359

360 **6 DINÂMICA FOLICULAR OVARIANA EM OVELHAS**

361

362 O ciclo estral em ovelhas tem duração de 16 a 17 dias, dividido em fase lútea
363 (dia 2 a 13) e fase folicular (dia 14 a 1; DRIANCOURT; GIBSON; CAHILL, 1985). O
364 desenvolvimento folicular em ovelhas inicia quando os folículos alcançam 2 mm e
365 chegam até 6 a 8 mm, sendo considerados folículos ovulatórios (DRIANCOURT,
366 1991). O processo contínuo de crescimento e regressão de folículos que conduz ao
367 desenvolvimento do folículo ovulatório é definido como dinâmica folicular (LUCY et
368 al., 1992). Normalmente, esse processo ocorre em ondas, sendo observadas duas a
369 três ondas (EVANS et al., 2000) ou três a quatro ondas por ciclo estral em ovelhas
370 (BARTLEWSKI; BABY; GIFFIN, 2011, LAZARIN et al., 2012).

371 A onda folicular é definida como a emergência de um grupo de pequenos
372 folículos antrais, dos quais um ou dois alcançam o diâmetro de 5 mm ou mais em
373 ovelhas (MENCHACA; RUBIANES, 2004). A onda folicular é dividida nas fases de
374 recrutamento ou emergência, seleção ou divergência e dominância (DRIANCOURT,

1991). No recrutamento, os folículos começam a se desenvolver sob influência de hormônios gonadotróficos. Em ovelhas há o recrutamento de 1 a 3 folículos do *pool* de pequenos folículos em comparação ao que ocorre em vacas, que é de 6 a 9 folículos (DUGGAVATHI et al., 2003). Segundo os autores, com a utilização da ultrassonografia, foi possível identificar que possivelmente não há recrutamento e regressão de um grande número de folículos em uma nova onda folicular em ovelhas. A cada 3 a 5 dias, apenas um a três folículos com diâmetro de 2 a 3 mm iniciam seu crescimento na mesma onda folicular (DUGGAVATHI et al., 2003). Na fase de seleção ou divergência o número de folículos recrutados é reduzido pelo processo de atresia, a fim de alcançar o número de ovulações característico de cada espécie e raça (DRIANCOURT, 1991). Por fim, os folículos que sobrevivem depois da seleção são chamados de co-dominantes. Assim, pelo fato de que mais de um folículo adquire a habilidade para alcançar tamanho ovulatório (≥ 5 mm) em uma única onda e que os folículos de duas ondas consecutivas ovulam ao mesmo tempo, BARTLEWSKI; BABY; GIFFIN (2011) sugeriram que a dominância em ovelhas é fraca ou ausente. O número de folículos ovulatórios pode variar entre os animais (DRIANCOURT; GIBSON; CAHILL, 1985), com diferença nas taxas de ovulação entre raças ovinas devido ao diâmetro dos folículos que adquirem a habilidade para responder ao estímulo hormonal (BARTLEWSKI; BABY; GIFFIN, 2011).

Com base em uma revisão sobre a dinâmica folicular em pequenos ruminantes, Menchaca e Rubianes (2004) relataram que em ovelhas no mínimo um folículo atinge ≥ 5 mm de diâmetro por onda, o maior folículo de cada onda cresce por 5 a 7 dias com taxa de crescimento de 1 mm por dia e o diâmetro máximo do maior folículo pode diferir entre ondas. Segundo Ravindra et al. (1994), a taxa de crescimento do maior folículo em cordeiras púberes da raça *Western White-Face* pode variar de 1 a 1,6 mm/dia e do segundo maior folículo de 0,84 a 1,17 mm/dia, com diâmetro máximo do maior folículo entre 5,2 e 6,8 mm e do segundo maior folículo de 4,2 e 4,8 mm. Já Lazarin et al. (2012) relataram que a taxa de crescimento do maior folículo em ovelhas Santa Inês variou de 0,50 a 0,83 mm/dia, e atingiu o diâmetro máximo de 4,10 a 6,30 mm. Segundo Ravinda et al. (1994), essa variação pode ocorrer devido ao dia de emergência da onda folicular. Com o avançar da fase lútea, com o aumento da concentração plasmática de progesterona, os intervalos de ondas são mais curtos e, na maioria de ciclos com ovulação dupla,

408 os folículos ovulatórios emergem como parte da mesma onda folicular, mas em
409 alguns casos como parte de ondas diferentes (MENCHACA; RUBIANES, 2004).
410 Além desse mecanismo, a progesterona pode atuar na dinâmica folicular,
411 diretamente no número de ondas foliculares do ciclo estral (BARTLEWSKI; BABY;
412 GIFFIN, 2011). Segundo os autores, altas concentrações de progesterona podem
413 favorecer a maior produção das isoformas ácidas do hormônio folículo estimulante
414 (FSH), que têm *clearance* menor, o que permite alcançar o limiar para o
415 recrutamento folicular precoce, aumentando o número de ondas foliculares. Já em
416 baixas concentrações ocorre aumento nas isoformas menos ácidas do FSH, que
417 propiciam maior *clearance* e o pico da concentração desse hormônio é menor,
418 diminuindo o número de ondas foliculares por ciclo estral (BARTLEWSKI; BABY;
419 GIFFIN, 2011). O aumento da atividade biológica do FSH pode iniciar processos que
420 levam ao recrutamento de um maior número de folículos em animais pré-púberes
421 (RAWLINGS et al., 2003).

422 A dinâmica folicular de cordeiras pré-púberes ainda não é bem definida como
423 a de ovelhas púberes ou adultas. Rawlings et al. (2003) relataram padrão bifásico de
424 crescimento folicular em cordeiras pré-púberes. Os autores observaram que o
425 número total de folículos aumentou até 2 meses de idade e depois houve declínio
426 até os 5 meses, enquanto o diâmetro do maior folículo aumentou até 3 meses de
427 idade, atingiu um platô e, com a aproximação da puberdade, voltou a aumentar. Em
428 cordeiras Suffolk pré-púberes, o diâmetro do maior folículo aumentou entre 26^a e 18^a
429 semanas antes da puberdade, diminuiu e somente voltou a aumentar duas semanas
430 antes da puberdade (BARTLEWSKI; BEARD; RAWLINGS, 2006). Nesse mesmo
431 estudo, o número de folículos aumentou entre a 24^a e a 14^a semanas antes da
432 puberdade, diminuiu entre 14^a e a 12^a semanas e entre a 10^a e a 6^a semanas, mas
433 aumentou novamente antes da puberdade. Em cordeiras Santa Inês pré-púberes, o
434 número de folículos de 3-5 mm de diâmetro aumentou com o avançar da idade,
435 atingiu o máximo aos 180 dias e então diminuiu (JUNQUEIRA et al., 2019). Os
436 autores relataram que com a aproximação da puberdade houve redução do número
437 de folículos entre 3 e 5 mm, aumento do número de folículos > 5 mm e do diâmetro
438 do maior folículo. Adicionalmente, o diâmetro do maior folículo foi menor em
439 cordeiras que não ovularam do que nas cordeiras que ovularam. Em cordeiras pré-
440 púberes, Rawlings et al. (2003) e Bartlewski, Beard e Rawlings (2006) não

441 observaram o padrão de crescimento folicular em ondas, como ocorre em animais
442 púberes. Segundo Rawlings et al. (2003) o padrão de crescimento folicular não é
443 caracterizado, ou seja, a ocorrência rítmica de ondas foliculares não é estabelecida
444 em cordeiras pré-púberes como é estabelecida em novilhas pré-púberes, mesmo
445 com a semelhança do controle gonadotrófico entre as espécies. Há ainda o
446 questionamento se nas cordeiras pré-púberes há maior número de ondas foliculares
447 por ciclo estral, o que pode dificultar a visualização do padrão bem estabelecido de
448 desenvolvimento folicular em ondas (Evans et al., 2000).

449

450 **6.1 RESTRIÇÃO ALIMENTAR**

451

452 Existem fatores internos e externos que influenciam o desenvolvimento
453 folicular ovariano, seja na maturação, na esteroidogênese, na ovulação ou na
454 formação do corpo lúteo (BARTLEWSKI; BABY; GIFFIN, 2011). Dentre esses
455 fatores, as condições de escassez de alimentos ou de estresse por calor podem
456 conduzir ao menor aporte de nutrientes para os animais, devido ao menor consumo
457 de alimentos. O consumo de alimentos, na forma *ad-libitum* ou restrita, pode
458 influenciar os parâmetros produtivos e reprodutivos de cordeiras (SUSIN et al., 1995;
459 VILLENEUVE; CINQ-MARS; LACASSE, 2010), de ovelhas (YING et al., 2011;
460 GRAZUL-BILSKA et al., 2012) e de vacas leiteiras (FERRARETTO et al., 2014). A
461 restrição alimentar pode ocasionar redução das concentrações plasmáticas de
462 glicose e de insulina (YING et al., 2011; GRAZUL-BILSKA et al., 2012;
463 FERRARETTO et al., 2014), do peso e do escore de condição corporal, com
464 aumento da concentração plasmática de ácidos graxos não-esterificados
465 (FERRARETTO et al., 2014), indicando balanço energético negativo e mobilização
466 de gordura para suprir a deficiência de energia. Nessa condição de hipoglicemia,
467 hipoinsulinemia e alta concentração de ácidos graxos não-esterificados, o
468 desenvolvimento folicular fica comprometido e pode ocorrer redução na produção de
469 hormônios reprodutivos e atraso da puberdade (SCARAMUZZI et al., 2006).

470 Em ovelhas da raça “Hu” submetidas à restrição alimentar (50% dos
471 requerimentos de manutenção) houve redução no número de folículos de 2,5 a 3,5 mm
472 de diâmetro, em comparação ao grupo que recebeu dieta de manutenção (YING et al.,

473 2011). Já Grazul-Bilska et al. (2012) não observaram redução do número de
474 folículos pequenos (≤ 3 mm) e grandes (> 3 mm) em ovelhas das raças Targhee e
475 Rambouillet submetidas à restrição alimentar de 60% dos requerimentos de
476 manutenção, em relação às ovelhas que receberam 100% dos requerimentos de
477 manutenção. Nesse estudo, a qualidade oocitária foi prejudicada pela restrição
478 alimentar, com menor proporção de oócitos clivados após a fertilização *in vitro* e
479 redução da formação de mórulas e blastocistos. Em novilhas pré-púberes
480 alimentadas com dieta de baixa energia, formulada para ganho de peso de 300 g/dia
481 com a energia vindo principalmente de amido, o diâmetro do maior folículo foi menor
482 do que o observado nas novilhas alimentadas com dieta de alta energia, formulada
483 para ganho de peso de 900 g/dia (BERGFELD et al. 1994). Segundo os autores, os
484 folículos de novilhas alimentadas com dieta de alta energia atingiram o maior
485 diâmetro aproximadamente dois meses antes do que os folículos de novilhas
486 alimentadas com dieta de baixa energia, o que propiciou que aqueles animais
487 atingissem a puberdade mais cedo.

488 Com relação aos hormônios reprodutivos, a restrição alimentar de 50% dos
489 requerimentos de manutenção reduziu a concentração plasmática de FSH, aumentou a
490 de estradiol e não alterou a de progesterona em ovelhas da raça Merino (ADAMS et
491 al., 1997). A restrição alimentar aumentou a concentração plasmática de estradiol,
492 que pode influenciar o sistema de *feedback* no eixo hipotálamo-hipófise-ovário e a
493 liberação de FSH (ADAMS et al., 1997). Já em vacas leiteiras, a concentração
494 plasmática de FSH não foi influenciada pela restrição alimentar de 25 ou 50% em
495 relação ao grupo controle, enquanto a concentração sérica de progesterona
496 aumentou nos grupos submetidos à restrição alimentar (FERRARETTO et al., 2014).

497 Quando o desempenho reprodutivo foi avaliado em parâmetros como a taxa
498 de prenhez, número de cordeiros nascidos e peso dos cordeiros nascidos,
499 Villeneuve, Cinq-Mars e Lacasse (2010) não observaram diferença entre cordeiras
500 pré-púberes da raça Dorset alimentadas *ad-libitum* ou com restrição de 30% do
501 consumo *ad-libitum*, por um período de 75 dias. Em cordeiras das raças Polypay e
502 Targhe com consumo de matéria seca restrito em 21% em comparação ao grupo
503 *ad-libitum*, a idade a puberdade não foi influenciada pela restrição alimentar (SUSIN
504 et al., 1995). Fatores como a duração, a proporção imposta da restrição alimentar
505 (VILLENEUVE; CINQ-MARS; LACASSE, 2010), a similaridade do consumo de

506 energia e do peso corporal entre os grupos (SUSIN et al., 1995), podem ter
507 contribuído para que a restrição não influenciasse de forma negativa o desempenho
508 reprodutivo dos animais.

509 Contudo, como os fatores relacionados à dieta e ao consumo de alimentos
510 (*ad-libitum* ou restrito) se relacionam com a dinâmica folicular de animais pré-
511 púberes ainda não é bem elucidado. Uma estratégia que pode ser adotada para
512 contornar possíveis efeitos prejudiciais da restrição alimentar no desenvolvimento
513 folicular, na produção hormonal, no desempenho reprodutivo e conseqüentemente
514 na idade que os animais atingem a puberdade é a suplementação lipídica. Porém,
515 em vacas holandesas alimentadas na forma *ad-libitum* ou com restrição de 24% do
516 consumo, suplementadas com sementes de oleaginosas ricas em ácido oleico,
517 linoleico ou linolênico, o diâmetro do maior folículo não foi influenciado pelo consumo
518 e nem pela suplementação lipídica (COLAZO et al., 2009).

519

520 **7 OS LIPÍDEOS NA REPRODUÇÃO DE RUMINANTES**

521

522 Os estudos avaliando a influência dos ácidos graxos na reprodução animal se
523 iniciaram em 1930, quando pesquisadores observaram que ratas apresentaram
524 ovulação irregular ou anovulação sob restrição total de ácidos graxos na dieta
525 (BURR; BURR, 1930). Nesse estudo, ao inserir fontes de ácido linoleico e linolênico
526 na dieta, os autores observaram que a ovulação retornou em poucos dias,
527 introduzindo o conceito de ácidos graxos essenciais na nutrição. Esses ácidos
528 graxos essenciais em mamíferos devem ser suplementados na dieta, pois o animal
529 não tem enzimas específicas para sintetizá-los (SANTOS et al., 2008; WATHES;
530 ABAYASEKARA; AITKEN, 2007). Pela falta dessas enzimas, não é possível a
531 inserção de duplas ligações distais ao carbono 9 a partir do grupo metil terminal
532 (MATTOS; STAPLES; THATCHER, 2000; STAPLES; BURKE; THATCHER, 1998).

533 Os ácidos graxos essenciais têm mais que uma dupla ligação presentes na
534 molécula e são classificados com base na estrutura química em 3 grupos, ômega-3
535 (n-3), ômega 6 (n-6) e ômega-9 (n-9), nos quais a primeira dupla ligação é localizada
536 no carbono 3, 6 ou 9 a partir do grupamento metil, respectivamente (WATHES;

537 ABAYASEKARA; AITKEN, 2007). Esses grupos de ácidos graxos são os que mais
538 atuam de forma positiva na função reprodutiva e sua disponibilidade pode alterar
539 processos reprodutivos específicos (THATCHER et al., 2004). Palmquist e Jenkins
540 (2017) destacaram a importância do ácido linoleico (C18:2 n-6) e linolênico (C18:3 n-
541 3) na reprodução. Os autores relataram resultados positivos no desenvolvimento
542 folicular e oocitário, na qualidade oocitária, no desenvolvimento embrionário e na
543 taxa de prenhez em vários estudos nos quais a suplementação desses ácidos
544 graxos foi realizada.

545 A atuação dos ácidos graxos no sistema reprodutivo pode ser por meio do
546 fornecimento de energia (MATTOS; STAPLES; THATCHER, 2000). Em situação de
547 balanço energético positivo há aumento das concentrações de glicose e estimulação
548 do sistema IGF, que atuam diretamente na foliculogênese, na produção hormonal e
549 na ovulação (SCARAMUZZI et al., 2006). Além disso, os ácidos graxos são
550 utilizados como fonte energética durante a maturação oocitária e no
551 desenvolvimento embrionário inicial (WATHES; ABAYASEKARA; AITKEN, 2007),
552 podendo afetar na criopreservação e desenvolvimento subsequente (MATTOS;
553 STAPLES; THATCHER, 2000). Os ácidos graxos também podem atuar no sistema
554 reprodutivo por ações independentes do fornecimento de energia (MATTOS;
555 STAPLES; THATCHER, 2000; STAPLES; BURKE; THATCHER, 1998). Esse
556 mecanismo de atuação envolve a esteroidogênese (STAPLES; BURKE;
557 THATCHER, 1998), a produção de prostaglandinas (STAPLES; BURKE;
558 THATCHER, 1998; THATCHER et al., 2004) e a dinâmica folicular (STAPLES;
559 BURKE; THATCHER, 1998).

560 Com a suplementação lipídica pode ocorrer economia de glicose no sistema,
561 que estimula a liberação de LH e, conseqüentemente, o desenvolvimento das
562 células luteínicas (STAPLES; BURKE; THATCHER, 1998). Segundo os autores, há
563 também aumento da concentração de colesterol plasmático, que é o precursor para
564 a síntese de progesterona. Para a produção desse hormônio, o colesterol pode ser
565 suprido a partir de lipoproteínas vindas da circulação sanguínea, sintetizado “de
566 novo” pelas células lúteas ou se originar do estoque intracelular de ésteres de
567 colesterol. O estoque intracelular de ésteres de colesterol faz com que os efeitos dos
568 ácidos graxos na reprodução possam ocorrer em longo prazo (STAPLES; BURKE;
569 THATCHER, 1998).

570 A suplementação lipídica pode aumentar a concentração de progesterona no
571 sangue, porém o perfil de ácidos graxos pode afetar essa produção (STAPLES;
572 BURKE; THATCHER, 1998). Wonnacott et al. (2010) observaram aumento da
573 concentração de progesterona no fluido folicular de cordeiras que receberam
574 suplementação lipídica com ácido linolênico em comparação ao ácido linoleico. Isso
575 possivelmente ocorreu por efeitos diretos em enzimas (como a STAR) e no
576 citocromo P450 (MATTOS; STAPLES; THATCHER, 2000), pois esses ácidos graxos
577 estão envolvidos nos processos de transcrição gênica dessas enzimas, que regulam
578 a síntese de esteroides (WATHES; ABAYASEKARA; AITKEN, 2007). O aumento da
579 concentração de progesterona pode também ser pela redução do clearance hepático
580 (MATTOS; STAPLES; THATCHER, 2000). A suplementação lipídica com ácido
581 linolênico reduz a atividade das enzimas da família *CYP*, que são enzimas que
582 aumentam o *clearance hepático* de progesterona (GALBREATH et al., 2008). Ou
583 seja, com o fornecimento de ácido linolênico a metabolização de progesterona no
584 fígado é menor (*clearance hepático* reduzido) com maior concentração no sangue
585 em consequência.

586 Na produção de prostaglandinas o ácido linoleico atua por meio de um ácido
587 graxo de cadeia longa formado no organismo do animal, o ácido araquidônico
588 (GULLIVER et al., 2012). O ácido linoleico é convertido a ácido araquidônico por
589 meio de reações de dessaturação e alongação. A partir da formação do ácido
590 araquidônico há a formação das prostaglandinas da série 2 (PGF₂ α – STAPLES;
591 BURKE; THATCHER, 1998; THATCHER et al., 2004). A síntese de prostaglandinas
592 depende da quantidade de ácidos graxos insaturados presentes na dieta
593 (THATCHER et al., 2004) e que alcançam os tecidos alvos (STAPLES; BURKE;
594 THATCHER, 1998). Além disso, o tipo de ácido graxo que é fornecido pode
595 estimular ou inibir a formação de prostaglandinas.

596 Os ácidos graxos poli-insaturados podem servir como substratos ou como
597 inibidores para a síntese das prostaglandinas. Segundo Staples, Burke e Thatcher
598 (1998), o ácido linolênico causa efeito inibitório e o linoleico efeito estimulatório na
599 síntese das prostaglandinas. A suplementação de ácido linolênico reduziu a
600 concentração plasmática do metabólito da prostaglandina (PGFM), indicando que
601 houve menor produção desse hormônio em novilhas de corte (CHILDS et al., 2008).
602 No estudo de Dirandeh et al. (2013), também houve redução do PGFM nas vacas

603 alimentadas com fontes lipídicas com alta concentração de ácido linolênico (linhaça
604 extrusada) em comparação a fontes com alta concentração de ácido linoleico (soja
605 grão tostada). A redução na produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pode ser por diferentes mecanismos
606 como inibição da enzima que realiza a síntese do ácido araquidônico (PGHS),
607 redução da concentração de ácido araquidônico e ativação dos receptores ativados
608 por proliferador de peroxissoma (PPARs) que reduzem a transcrição gênica da
609 PGHS (MATTOS; STAPLES; THATCHER, 2000). No pós-parto, o aumento na
610 produção de prostaglandinas devido à suplementação com fontes lipídicas com alta
611 concentração de ácido linoleico é importante para a liberação das membranas fetais
612 e saúde uterina. Já na gestação, a redução na produção de prostaglandinas devido
613 à suplementação com fontes lipídicas com alta concentração de ácido linolênico
614 pode melhorar a fertilidade por reduzir as perdas embrionárias no início da prenhez
615 (MATTOS; STAPLES; THATCHER, 2000).

616 Além dos mecanismos discutidos acima, o ácido linoleico pode atuar na
617 dinâmica folicular de forma local, pois a quantidade de ácido linoleico no fluido
618 folicular é maior do que no plasma (RENAVILLE et al., 2010). Segundo os autores,
619 essa característica se deve a maior permeabilidade dos folículos aos ácidos graxos
620 insaturados. Esse mecanismo é explicado por aumento da expressão de proteínas
621 que facilitam a absorção de ácidos graxos insaturados pelas células (LIN; KHNYKIN,
622 2014). Ou seja, a dinâmica folicular nos animais que são suplementados com ácidos
623 graxos insaturados pode ser melhorada por mecanismos locais, ou seja, nos
624 próprios folículos. Isso possivelmente ocorre pois a maior quantidade dos ácidos
625 graxos insaturados no fluido folicular propicia maior produção de estradiol em
626 relação a progesterona, com aumento da relação estradiol e progesterona, que é
627 proporcional à atividade folicular. O aumento dessa relação no fluido do folículo pré-
628 ovulatório (ZACHUT et al., 2008) e ovulatório (LAMMOGLIA et al., 1997) foi relatado
629 em vacas alimentadas com fontes ricas em ácido linoleico. Por outro lado, a
630 quantidade de ácido graxos saturados, como o palmítico e esteárico no fluido
631 folicular é menor do que no plasma sanguíneo (RENAVILLE et al., 2010). A menor
632 permeabilidade folicular aos ácidos graxos saturados pode explicar a falta de efeitos
633 da suplementação destes em parâmetros da dinâmica folicular. Em ovelhas
634 alimentadas com sabões de cálcio de ácidos graxos com a maior proporção de ácido
635 palmítico, a duração do ciclo, o número de folículos pequenos e médios e o diâmetro
636 do maior folículo não foram alterados, enquanto o número total de folículos tendeu a

637 diminuir em comparação aos animais que não receberam suplementação lipídica
638 (GHOREISHI et al., 2007).

639 Em vacas alimentadas com soja grão houve aumento no número total de
640 folículos em comparação aos animais não suplementados (GANDRA et al., 2017;
641 ROBINSON et al., 2002). A suplementação com soja grão resultou em aumento do
642 tamanho do folículo dominante em comparação ao grupo não suplementado
643 (DIRANDEH et al., 2013; ROBINSON et al., 2002); embora outros autores (GANDRA
644 et al., 2017) não tenham observado essa diferença. O aumento no tamanho do
645 folículo pode ser explicado em parte pelo aumento das concentrações plasmáticas
646 de LH, que estimula os últimos estágios de crescimento folicular (MATTOS;
647 STAPLES; THATCHER, 2000). Já Childs et al. (2008) ao alimentarem novilhas de
648 corte com soja grão observaram que a duração do ciclo estral, o diâmetro e a taxa
649 de crescimento do folículo pré-ovulatório não foram afetados. Ou seja, com a
650 utilização da mesma fonte lipídica, rica em ácido linoleico, ainda podemos observar
651 variações nas respostas, justificando a realização de mais estudos.

652

653 **8 CONSIDERAÇÕES GERAIS**

654

655 Na restrição alimentar, há menor aporte de nutrientes para o sistema
656 reprodutivo prejudicando o desenvolvimento folicular dos animais. Visando reduzir
657 esse impacto, a utilização da suplementação lipídica pode ser uma estratégia viável.
658 Isso porque, a suplementação lipídica é utilizada como fonte energética nas dietas
659 de animais ruminantes. Além desse intuito, a utilização de lipídeos, como os poli-
660 insaturados tem sido preconizada para fins específicos como no sistema reprodutivo.
661 Diversos estudos comprovam a eficiência da utilização de ácidos graxos insaturados
662 na melhora de parâmetros reprodutivos como no desenvolvimento folicular e
663 oocitário, na qualidade oocitária, no desenvolvimento embrionário e na taxa de
664 prenhez.

665 Devido ao metabolismo ruminal, a quantidade de ácidos graxos insaturados
666 que é encontrada no intestino delgado para absorção é inferior a quantidade
667 fornecida na dieta. Por esse motivo, a utilização de sementes de oleaginosas como
668 fonte lipídica é indicada para minimizar essa situação, aumentando a quantidade
669 desses ácidos graxos que estão disponíveis para absorção. Portanto, é interessante

670 avaliaramos a associação da suplementação lipídica, a quantidade de ácidos graxos
671 no sangue, que pode ser utilizada no sistema reprodutivo, e o desenvolvimento
672 folicular. Com esse tipo de abordagem no estudo, podemos verificar se a
673 suplementação lipídica foi benéfica para o desenvolvimento folicular e se reduziu os
674 impactos da restrição alimentar no desenvolvimento folicular. Aliado a isso,
675 discutirmos se a suplementação lipídica foi capaz de aumentar a quantidade de
676 ácidos graxos no sangue e se esse aumento interferiu no desenvolvimento folicular.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, N. R. et al. Level of nutrition modulates the dynamics of oestradiol feedback on plasma FSH in ovariectomized ewes. **Animal Reproduction Science**, v. 47, n. 1-2, p. 59-70, 1997.
- ALLEN, M. S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 7, p. 1598-1624, 2000.
- BARLETTA, R. V. et al. Ruminal biohydrogenation and abomasal flow of fatty acids in lactating cows: oilseed provides ruminal protection for fatty acids. **Animal Feed Science and Technology**, v. 219, p. 111-121, 2016.
- BARTLEWSKI, P. M.; BABY, T. E.; GIFFIN, J. L. Reproductive cycles in sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 3-4, p. 259-268, 2011.
- BERGFELD, E. G. M. et al. Ovarian follicular development in prepubertal heifers is influenced by level of dietary energy intake. **Biology of Reproduction**, v. 51, n. 5, p. 1051-1057, 1994.
- BOERMAN, J. P. et al. Intestinal digestibility of long-chain fatty acids in lactating dairy cows: A meta-analysis and meta-regression. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 12, p. 8889-8903, 2015.
- BURR, G. O.; BURR, M. M. On the nature and role of the fatty acids essential in nutrition. **Journal of Biological Chemistry**, v. 86, n. 2, p. 587-621, 1930.
- BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F. D. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 849-854, 2009.
- COLAZO, M. G. et al. Reproductive performance of dairy cows is influenced by prepartum feed restriction and dietary fatty acid source. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 6, p. 2562-2571, 2009.
- CHILDS, S. et al. Effect of level of dietary n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on systemic and tissue fatty acid concentrations and on selected reproductive variables in cattle. **Theriogenology**, v. 70, n. 4, p. 595-611, 2008.
- CHOUINARD, P. Y.; GIRARD, V.; BRISSON, G. J. Performance and profiles of milk fatty acids of cows fed full fat, heat-treated soybeans using various processing methods. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 2, p. 334-342, 1997.
- DIRANDEH, E. et al. Plasma concentrations of PGFM and uterine and ovarian responses in early lactation dairy cows fed omega-3 and omega-6 fatty acids. **Theriogenology**, v. 80, n. 2, p. 131-137, 2013.
- DOREAU, M.; FERLAY, A. Digestion and utilisation of fatty acids by ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, v. 45, n. 3-4, p. 379-396, 1994.

DOREAU, M. et al. Ruminal metabolism of fatty acids: Modulation of polyunsaturated, conjugated, and trans fatty acids in meat and milk. In: **Handbook of Lipids in Human Function**. AOCS Press, p. 521-542, 2016.

DUGGAVATHI, R. et al. Use of high-resolution transrectal ultrasonography to assess changes in numbers of small ovarian antral follicles and their relationships to the emergence of follicular waves in cyclic ewes. **Theriogenology**, v. 60, n. 3, p. 495-510, 2003.

DRIANCOURT, M. A.; GIBSON, W. R.; CAHILL, L. P. Follicular dynamics throughout the oestrous cycle in sheep. A review. **Reproduction Nutrition Development**, v. 25, n. 1A, p. 1-15, 1985.

DRIANCOURT, M. A. Follicular dynamics in sheep and cattle. **Theriogenology**, v. 35, n. 1, p. 55-79, 1991.

EDER, K. Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 671, n. 1-2, p. 113-131, 1995.

EVANS, A. C. O. et al. Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. **Theriogenology**, v. 53, n. 3, p. 699-715, 2000.

FERRARETTO, L. F. et al. Effect of feed restriction on reproductive and metabolic hormones in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 2, p. 754-763, 2014.

FIEVEZ, V. et al. Assessing rumen biohydrogenation and its manipulation in vivo, in vitro and in situ. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 109, n. 8, p. 740-756, 2007.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1957.

FREITAS JR, J. E. et al. Ruminal biohydrogenation and abomasal flow of fatty acids in lactating cows fed diets supplemented with soybean oil, whole soybeans, or calcium salts of fatty acids. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 9, p. 7881-7891, 2018.

GANDRA, J. R. et al. Whole flaxseed, raw soybeans, and calcium salts of fatty acids supplementation for transition cows: follicle development and embryo quality. **Italian Journal of Animal Science**, v. 16, n. 4, p. 538-545, 2017.

GALBREATH, C. W. et al. Effect of feeding flax or linseed meal on progesterone clearance rate in ovariectomized ewes. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 35, n. 2, p. 164-169, 2008.

GULLIVER, C. E. et al. The role of omega-3 polyunsaturated fatty acids in reproduction of sheep and cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 131, n. 1-2, p. 9-22, 2012.

GHOREISHI, S. M. et al. Effect of a calcium soap of fatty acids on reproductive characteristics and lactation performance of fat-tailed sheep. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 14, p. 2389-2395, 2007.

GLASSER, F. et al. Digestion of fatty acids in ruminants: a meta-analysis of flows and variation factors: 2. C18 fatty acids. **Animal**, v. 2, n. 5, p. 691-704, 2008.

GRAZUL-BILSKA, A. T. et al. Overfeeding and underfeeding have detrimental effects on oocyte quality measured by in vitro fertilization and early embryonic development in sheep. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 43, n. 4, p. 289-298, 2012.

JENKINS, T. C. Lipid metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 12, p. 3851-3863, 1993.

JENKINS, T. C.; BRIDGES JR, W. C. Protection of fatty acids against ruminal biohydrogenation in cattle. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 109, n. 8, p. 778-789, 2007.

JENKINS, T. C. et al. Board-invited review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 2, p. 397-412, 2007.

JENKINS, T. C.; KLEIN, C. M.; MECHOR, G. D. Managing milk fat depression: Interactions of ionophores, fat supplements, and other risk factors. In: **Proceeding 20 TH Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium. Gainesville, Florida. 2009.**

JUNQUEIRA, F. B. et al. Ovarian follicular development, hormonal and metabolic profile in prepubertal ewe lambs with moderate dietary restriction and lipid supplementation. **Animal Reproduction Science**, v. 204, p. 152-164, 2019.

KUCUK, O. et al. Effect of forage: concentrate ratio on ruminal digestion and duodenal flow of fatty acids in ewes. **Journal of Animal Science**, v. 79, n. 8, p. 2233-2240, 2001.

KNAPP, D. M.; GRUMMER, R. R.; DENTINE, M. R. The response of lactating dairy cows to increasing levels of whole roasted soybeans. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 8, p. 2563-2572, 1991.

LAMMOGLIA, M. A., et al. Effects of dietary fat on follicular development and circulating concentrations of lipids, insulin, progesterone, estradiol-17 β , 13, 14-dihydro-15-keto-prostaglandin F 2α , and growth hormone in estrous cyclic Brahman cows. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 6, p. 1591-1600, 1997.

LAZARIN, G. B., et al. Plasma urea nitrogen and progesterone concentrations and follicular dynamics in ewes fed proteins of different degradability. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, p. 1638-1647, 2012.

LI, et al. Analytical methods in lipidomics and their applications. **Analytical Chemistry**, v. 86 n. 1, p. 161-175. 2014.

LIU, Z. L. et al. Effect of dietary sources of roasted oilseeds on blood parameters and milk fatty acid composition. **Czech Journal of Animal Science**, v. 53, n. 5, p. 219, 2008.

LIN, M.; KHNYKIN, D. Fatty acid transporters in skin development, function and disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1841, n. 3, p. 362-368, 2014.

LOURENÇO M.; RAMOS-MORALES E.; WALLACE R. J. The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. **Animal**, v. 4, n. 7, p. 1008-1023, 2010.

LOCK, A. L. et al. Concepts in fat and fatty acid digestion in ruminants. In: **Proc. Intermountain Nutrition Conference**, p. 85-100, 2006.

LUCY, M. C. et al. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 11, p. 3615-3626, 1992.

MARTINS M. L. et al. Microextração Líquido Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, v. 4 n. 1, p. 35- 51, 2012.

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

MENCHACA, A.; RUBIANES, E. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, n. 4, p. 403-413, 2004.

NRC. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. National Research Council. Washington, DC: National Academy Press, 2001.

NRC. **Nutrient Requirements of Small Ruminants**. National Research Council. Washington, DC: National Academy Press, 2007.

PALMQUIST, D. L. et al. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 50, p. 179-217, 2005.

PALMQUIST, D. L.; JENKINS, T. C. A 100-Year Review: Fat feeding of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10061-10077, 2017.

RAVINDRA, J. P. et al. (1994). Ultrasonographic study of ovarian follicular dynamics in ewes during the oestrous cycle. **Reproduction**, p. 101, v. 2, p. 501-509, 1994.

RAWLINGS, N. C. et al. Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 259-270, 2003.

REDDY, P. V.; MORRILL, J. L.; NAGARAJA, T. G. Release of free fatty acids from raw of processed soybeans and subsequent effects on fiber digestibilities. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 11, p. 3410-3416, 1994.

RENAVILLE, B. et al. Plasma and follicular fluid fatty acid profiles in dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 1, p. 118-121, 2010.

REZAEI, M. et al. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography. A.** v. 1116, n. 1, p. 1–9. 2006.

ROBINSON, R. S. et al. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on ovarian and uterine function in lactating dairy cows. **Reproduction Cambridge**, v. 124, n. 1, p. 119-131, 2002.

SANTOS, J. E. P. et al. Long chain fatty acids of diet as factors influencing reproduction in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 23-30, 2008.

SARAFRAZ-YAZDI, A.; AMIRI, A. Liquid-phase microextraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 1, p. 1-14, 2010.

SUSIN, I. et al. Effects of limit feeding a high-grain diet on puberty and reproductive performance of ewes. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 11, p. 3206-3215, 1995.

SCARAMUZZI, R. J. et al. A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. **Reproduction Nutrition Development**, v. 46, n. 4, p. 339-354, 2006.

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**, v. 81, n. 3, p. 856-871, 1998.

TICE, E. M.; EASTRIDGE, M. L.; FIRKINS, J. L. Raw soybeans and roasted soybeans of different particle sizes. 2. Fatty acid utilization by lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 1, p. 166-180, 1994.

THATCHER, W. W. et al. Effects of polyunsaturated fatty acids on reproductive processes in dairy cattle. In: **Proc. Southwest Nutrition & Management Conference, Bioproducts, Inc. Pre-Conference Symposium. Phoenix, AZ.** 2004.

TROEGELER-MEYNADIER, A. et al. Effects of the heating process of soybean oil and seeds on fatty acid biohydrogenation in vitro. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 9, p. 5657-5667, 2014.

VAN NEVEL, C. J.; DEMEYER, D. I. Influence of pH on lipolysis and biohydrogenation of soybean oil by rumen contents in vitro. **Reproduction Nutrition Development**, v. 36, n. 1, p. 53-63, 1996.

VILLENEUVE, L.; CINQ-MARS, D.; LACASSE, P. Effects of restricted feeding of prepubertal ewe lambs on reproduction and lactation performances over two breeding seasons. **Animal: an International Journal of Animal Bioscience**, v. 4, n. 12, p. 1997, 2010.

WATHES, D. C.; ABAYASEKARA, D. R. E.; AITKEN, R. J. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. **Biology of Reproduction**, v. 77, n. 2, p. 190-201, 2007.

WONNACOTT, K. E. et al. Dietary omega-3 and-6 polyunsaturated fatty acids affect the composition and development of sheep granulosa cells, oocytes and embryos. **Reproduction**, v. 139, n. 1, p. 57, 2010.

YING, S. et al. Effect of different levels of short-term feed intake on folliculogenesis and follicular fluid and plasma concentrations of lactate dehydrogenase, glucose, and hormones in Hu sheep during the luteal phase. **Reproduction**, v. 142, n. 5, p. 699, 2011.

ZACHUT, M. et al. Dietary unsaturated fatty acids influence preovulatory follicle characteristics in dairy cows. **Reproduction**, v. 135, n. 5, p. 683-692, 2008.

CAPÍTULO 2 – ARTIGO

Metabolic profile and follicular dynamics of Santa Inês ewe lambs with *ad-libitum* or restricted intake of diet with inclusion of roasted whole soybeans

Artigo redigido conforme a norma para publicação periódica científica NBR 6022 (ABNT, 2018). Esse formato segue o manual da UFLA de apresentação de teses e dissertações e será um artigo padrão que poderá atender, em qualquer momento, qualquer norma de revista científica.

677 ABSTRACT – The objectives of this study were to evaluate moderate feed restriction
678 and lipid supplementation as roasted whole soybeans on serum concentrations of
679 linoleic acid, on metabolic profile and on follicular development of prepubertal and
680 pubertal Santa Ines ewe lambs. Thirty-five Santa Ines ewe lambs with 21.5 ± 1.7 kg
681 of body weight and 95.0 ± 7.9 days of age were randomly assigned in an unbalanced
682 block design, with eight blocks with four animals and one block with three animals.
683 Treatments were arranged in a factorial $2 \times 2 \times 2$ based on level of intake (*ad-libitum*-
684 AL or restricted-FR), on lipid supplementation (without or with lipid supplementation
685 with roasted whole soybeans) and on the physiological status (absence or
686 occurrence of ovulation before ovarian assessments). Ewe lambs subjected to
687 restricted intake had 85% of the diet offered to those in *ad-libitum* treatments.
688 Ovulation was defined retrospectively by serum progesterone sample ≥ 1 ng/mL. Dry
689 matter intake was greater ($P < 0.05$) in unsupplemented-AL animals that ovulated
690 compared to those not-ovulated; conversely, dry matter intake was lower in
691 supplemented-AL animals that ovulated compared to those not-ovulated (three-way
692 interaction, $P < 0.05$). Considering that supplemented-AL animals, those that not-
693 ovulated had a greater ether extract intake ($P < 0.05$); while those ovulated had
694 ether extract intake (intake level \times lipid supplementation \times physiological status
695 interaction, $P < 0.05$). Glucose and triglyceride concentrations were higher ($P > 0.05$)
696 in supplemented animals; while no changes were observed in the insulin
697 concentration ($P > 0.05$). Serum HDL and cholesterol concentrations were
698 higher ($P < 0.05$) in unsupplemented-FR animals compared to AL-fed animals; in
699 contrast, serum HDL and cholesterol concentrations did not differ between lipid-
700 supplemented animals (two-way interaction, $P > 0.05$). Serum HDL was higher in
701 ovulated compared to non-ovulated animals. Serum cholesterol concentration did not
702 differ ($P > 0.05$) between physiological status. Linoleic and stearic serum were not
703 affected ($P > 0.05$) by intake level or lipid supplementation. The number of waves
704 was greater ($P < 0.05$) in AL than FR-ewe lambs. There was no main effects of
705 treatments, two- or three-way interactions ($P < 0.05$) for the number of follicles,
706 diameter of the largest and the second largest follicle and growth rate of the largest
707 follicle. In conclusion, lipid supplementation with roasted whole soybeans improve the
708 metabolic status, with no concomitant effect on linoleic acid blood concentration and
709 on follicular dynamics. Except by reduction in number of waves, the follicular
710 dynamics was not compromised by moderate feed restriction. Despite the higher
711 HDL blood concentration in ovulated ewe lambs, these animals did not present
712 enhanced follicular development.

713

714

715

716

717

718

719

720

721

722 **Keywords:** feed restriction, dietary fatty acids, roasted whole soybeans, follicular
723 development, omega-6.

724 1 INTRODUCTION

725

726 Nutrition is one of the main factors affecting follicle development,
727 steroidogenesis, ovulation and, consequently, the reproductive performance of
728 animals (BARTLEWSKI; BABY; GIFFIN, 2011). Under feed restriction, a reduction in
729 plasma glucose and insulin can occur (FERRARETTO et al., 2014), impairing
730 follicular development (YING et al., 2011). Lipid supplementation may be a strategy
731 to circumvent the possible harmful effects of feed restriction on follicular
732 development. The omega-3 and -6 polyunsaturated fatty acid families, as linoleic and
733 linolenic acid are of major importance for reproduction (PALMQUIST; JENKINS,
734 2017). The positive role of these fatty acids in reproduction is exerted as they supply
735 energy or by enhancement of functions in steroidogenesis, prostaglandin production
736 and follicular dynamics (STAPLES et al., 1998).

737 The linoleic acid flow leaving the rumen and absorption is lower than intake,
738 due to the extensive ruminal biohydrogenation of unsaturated fatty acids (LOCK et
739 al., 2006). This is particularly important because, the amount of linoleic acid available
740 for reproduction may be limited. The inclusion of oilseeds is a nutritional strategy to
741 reduce linoleic acid ruminal biohydrogenation. In addition, heat treatments of oilseeds
742 can further reduce the rate of ruminal biohydrogenation (REDDY et al., 1994).
743 Soybeans is rich in polyunsaturated fatty acids, with more than half of its fatty acid
744 content as linoleic acid (DOREAU et al., 2016). This lipid source can be used
745 strategically to increase the amount of linoleic acid in the blood (LIU et al., 2008;
746 ZACHUT et al., 2008), which can be directed to act on the reproductive system.
747 However, these studies are with dairy cows, which have different requirements and
748 metabolism than small ruminants. In addition, for better association between lipid
749 supplementation and follicular development, is important to predict the amount of
750 linoleic acid intake and its blood concentration.

751 In previous study by our team it was observed that lipid supplementation and
752 feed restriction from nearly three until seven months of age altered the metabolic
753 profile in ewe lambs with no concomitant changes age or body weight at puberty.
754 Furthermore, the diameter of the largest follicle was greater in lambs having than in
755 those not having ovulations and increased with age in both groups (JUNQUEIRA et
756 al., 2019). Thus, we decided to analyze the effect of previous lipid supplementation

757 and feed restriction on the metabolic profile and follicular dynamics in both ewe
758 lambs groups, having or no having ovulations. The hypotheses tested were 1)
759 roasted soybean increases blood concentration of linoleic acid in ewe lambs, 2) lipid
760 supplementation enhances follicular development, 3) moderate feed restriction
761 compromises follicular development, and 4) lipid supplementation with roasted whole
762 soybeans reduces the harmful effects of moderate feed restriction on follicular
763 development and 5) ewe lambs having ovulation during the experimental period had
764 better metabolic profile and enhanced follicular development than those no having
765 ovulation. The objectives were to evaluate the effects of moderate feed restriction
766 and lipid supplementation as roasted whole soybeans on serum concentrations of
767 linoleic acid, on metabolic profile and on follicular dynamics of pre-pubertal and
768 pubertal Santa Ines ewe lambs.

769

770 **2 MATERIAL AND METHODS**

771

772 **2.1 Animals, experimental diets and feeding**

773

774 This study was conducted at Department of Animal Sciences of the Federal
775 University of Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brazil. All procedures for animal care and
776 use were approved by the Bioethics Committee on Animal Use (UFLA) under
777 Protocol No. 085/2013.

778 Thirty five Santa Ines ewe lambs with initial body weight of 21.5 ± 1.7 kg and
779 95 ± 7.9 days of age (mean \pm standard deviation) were randomly assigned in
780 unbalanced block design according to body weight in nine blocks, eight with four
781 animals and one block with three animals as described by Junqueira et al. (2019).
782 Treatments were arranged in a $2 \times 2 \times 2$ factorial, factor A was intake level: *ad-*
783 *libitum* (AL) and moderate feed restriction (FR); factor B: lipid supplementation: no
784 lipid supplementation (-Fat) and lipid supplementation (+Fat); and factor C:
785 physiological status (occurrence of ovulation – ovulating (OV) and non-ovulating
786 (NOV) previous to the ovarian evaluations).

787 The feeding protocol was described by Junqueira et al. (2019). Diets were
 788 formulated according to NRC (2007) for ewe lambs weighing 20 kg to meet an
 789 average daily gain of 250 g. Experimental diets consisted of 50% concentrate and
 790 50% forage (DM basis). Corn silage was used as the roughage source and
 791 concentrates were ground corn, soybean meal and roasted and cracked soybean
 792 (Table 1). Roasted soybeans (ground into a mill without a sieve) were used as lipid
 793 source.

794

795 Table 1 – Ingredients and chemical composition of the experimental diets

Ingredient (% of DM)	- Fat	+ Fat
Corn silage	52.12	51.74
Ground corn	16.37	10.77
Soybean meal	29.63	6.42
Roasted and cracked soybean	0.00	29.21
Limestone	0.73	0.72
Salt	0.42	0.42
Mineral mix ¹	0.73	0.72
Chemical composition²		
DM (%)	43.08	42.83
CP (%)	20.57	19.35
NDF (%)	34.96	37.91
Ash (%)	6.99	6.70
EE (%)	3.54	9.82
NFC ³ (%)	33.94	26.22

796 ¹Minerals (Vacci-phos sheep without copper®, Vaccinar, Belo Horizonte, Brazil): 155.0 g Ca;
 797 85 g P; 5 g Mg; 15 mg S; 140 g Na; 3,500.00 mg Zn; 5,000.00 mg Mg; 42.0 mg I; 15.00 mg
 798 Se; 36.00 mg Co; 1,000.00 mg F; 1,000.00 mg Mn.

799 ²DM: Dry matter; CP: crude protein; NDF: Neutral detergent fiber; EE: Ether extract; NFC:
 800 Non-fibrous carbohydrates.

801 ³NFC = 100 - (CP + NDF + ash + EE).

802

803 Animals were kept in individual pens with free access to water. Throughout the
804 experiment a single diet was maintained for each treatment group. Feed was
805 delivered twice a day (0700 and 1500 h); feeding rate was adjusted daily to yield orts
806 of 10% of intake. The average intake in the previous seven days in the respective *ad-*
807 *libitum* groups was used to determine the amount of diet delivered to the restriction
808 groups (approximately 85% of the *ad-libitum* intake). Diets were fed until 37.4 ± 2.95
809 kg (mean \pm standard deviation) of body weight. Dry matter and nutrients intake
810 measurements were made considering the average intakes from the beginning of the
811 experiment to the beginning of follicular dynamic evaluations.

812 Daily samples of the orts from each animal were pooled at every week to
813 create composite samples. The chemical composition of the ingredients and of the
814 orts composite samples from each animal were analyzed according to the AOAC
815 (1990). Samples were oven-dried at 55°C for 72 h and then ground in a Wiley mill
816 (Arthur H. Thomas, Philadelphia, PA, USA) and sieved through a 1-mm screen. The
817 samples were analyzed for dry matter (DM; oven-dried at 105°C for 24 h), ash
818 (furnace incineration at 600°C for 5 h), nitrogen (micro Kjeldahl), ether extract (EE),
819 and neutral detergent fiber (NDF; TECNAL TE-149 analyzer, with addition of α -
820 amylase and sodium sulfite). Nonfibrous carbohydrates (NFC) were calculated
821 according to the NRC (2001) using the formula $NFC = 100 - (CP + EE + NDF + ash)$.

822

823 **2.2 Weighing and feed conversion**

824

825 Ewe lambs were weighed prior to feeding once a week throughout the
826 experimental period. Daily weight gain mean until ovarian assessments was
827 calculated as the weight at the beginning of the evaluations minus the initial weight
828 divided by the number of days in the experiment. Feed conversion (FC) was
829 calculated using DM intake (DMI, g) divided by body weight gain (g) during the
830 experimental period.

831

832

833 **2.3 Follicular dynamics**

834

835 Ovarian activity of each ewe lamb was monitored by real time transrectal
836 ultrasonography (ALOKA SSD 500, with 7.5 MHz linear transducer model UST - 660,
837 Tokyo, Japan). Ultrasound examinations were performed from 30.7 ± 1.17 kg and
838 36.0 ± 0.91 kg. In each occasion the ovaries were scanned for 17 ± 5 consecutive
839 days. All ultrasonic assessments were conducted by a single operator. To locate the
840 ovaries, the transducer was rotated 45 to 90° clockwise and counter clockwise after
841 visualization of the bladder and the caudal portion of the uterus. The number of antral
842 follicles >2 mm in diameter were recorded and then the follicular images were frozen
843 on the screen and measured using the integrated electronic calipers. Follicle
844 diameters were calculated as the average of the two greatest diameters in the cross
845 section.

846 Follicular dynamics was performed according to Menchaca and Rubianes
847 (2004) by determining follicular growth and regression profiles. Ovarian location of
848 each identified follicle was outlined in relation to other follicles (GINTHER et al.,
849 1995). Each follicle was identified by a letter, which was kept as long as the follicle
850 was detectable. A follicular wave was defined as one or more follicles that emerge
851 from a pool of small (2–3 mm in size) antral follicles and grow to ≥ 4 mm in diameter.
852 Furthermore, a follicular wave included all follicles that emerged within 3 days of the
853 emergence. The growth rate (mm/day) of the largest follicle was calculated by
854 subtracting the maximum diameter from the initial diameter divided by period of
855 evaluation expressed in days. In 10 periods of seven ewe lambs it was not possible
856 to assess the ovaries properly to characterize follicular dynamics and data were
857 discarded. In total, follicular dynamics characterization was evaluated in 28 periods at
858 30.7 ± 1.17 kg and in 20 periods at 36.0 ± 0.91 kg.

859

860 **2.3 Hormone and metabolites**

861

862 Blood samples were collected on the first day of the experimental period,
863 immediately before feeding and at 29.9 ± 0.56 and 35 ± 0.39 kg of body weight
864 between 3 and 4 hours after feeding, coinciding with the start of follicular dynamics

865 assessments. Samples (4 mL) were collected by puncture of the jugular vein in tubes
866 containing EDTA and potassium fluoride (Anticoagulant Glucose, Labor Import, São
867 Paulo, Brazil) and in tubes without anticoagulant (Vacutainer, BD, New Jersey,
868 United States). Then, the blood samples were centrifuged (1500 x g for 15 min) for
869 plasma or serum separation. After centrifugation, the samples were transferred to 1.5
870 mL microtubes and frozen (-20 °C) until analysis. Glucose, triglycerides, total
871 cholesterol, HDL cholesterol and urea concentrations were determined by
872 commercial quantitative colorimetric kits (Labtest, MG, Brasil) in a spectrophotometer
873 (Mutiskan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, Ohio, United
874 States). Serum urea concentration was multiplied by 0.4667 to calculate the plasma
875 urea-N (PUN). Insulin concentration was determined by RIA (Porcine Insulin RIA Kit,
876 Millipore, Missoure, United States). The high and low intra-assay variation
877 coefficients were 15.37% and 1.51%, respectively. Plasma progesterone
878 concentration was determined and ovulation was estimated as described by
879 Junqueira et al. (2019). The increase in serum progesterone to values ≥ 1 ng/mL was
880 used to define whether an animal had attained puberty.

881

882 **2.4 Fatty acid extraction**

883

884 Roasted soybeans fatty acids extraction was carried out following the
885 procedure of Folch et al. (1957), described by Junqueira et al. (2019). For
886 concentrations of linoleic and stearic acid blood samples (4 mL) were collected
887 between 3 and 4 hours after feeding at >26-28, >28-32, >32-34, >34-38 kg of body
888 weight by puncture of the jugular vein in tubes without anticoagulant (Vacutainer, BD,
889 New Jersey, United States) and processed as described in item 2.3. Serum fatty
890 acids were extracted by dispersive liquid-liquid microextraction procedure (DLLME).
891 The procedure was described by Bazana et al. (unpublished data, 2020). Linoleic
892 and stearic acid were determined using gas chromatography with a flame ionization
893 detector (GC/FID modelo 7890A, Agilent) using analytical column (HP-5, 5%-
894 phenylmethyl polysiloxane, 30 m x 0.32 mm ID x 0.25 mm). The column oven
895 temperature was 80 °C for 1 min, increased to 250 °C at rate of 10 °C/min, then
896 increased 7 °C/min until to 350 °C, totalizing 29 min. Samples (1 μ L) were injected by
897 Split/Splitless injector in mode Split (1:20 v/v). Temperature of injector and detector

898 was 250 °C and 375 °C, respectively. Helium as carrier gas at constant flux of 1.1
899 mL/min. The concentrations of linoleic and stearic acid were so low in serum samples
900 of animals FR without lipid supplementation, that were not detected.

901

902 **2.5 Statistical analyses**

903

904 Data were analyzed using the SAS (version 9.2; Statistical Analysis System,
905 Institute Inc., NC, United States). Dry matter and nutrients intake, average daily
906 weight gain, feed conversion, serum metabolites and insulin were analyzed by
907 generalized linear models considering the Gamma distribution and log linkage
908 function, with random animal effect, using the GLIMMIX procedure. For dry matter
909 and nutrients intake, average daily weight gain and feed conversion, the days in
910 experiment, body weight and age at the evaluation were considered as covariates.
911 For serum metabolites and insulin, the blood concentration of metabolites and insulin
912 on the first day of experiment were considered as covariates. The models considered
913 fixed effects of levels of intake, lipid supplementation and physiological status and
914 their interactions.

915 The number of waves was analyzed using GLIMMIX procedure considering
916 the Poisson distribution and log linkage function. The number of follicles, largest
917 follicle diameter, second largest follicle diameter and growth rate of the largest follicle
918 were analyzed using GLM procedure. The model considered the fixed effects of
919 intake level, lipid supplementation and physiological status and their interactions. For
920 number of follicles, largest follicle diameter, second largest follicle diameter and
921 growth rate of the largest follicle analysis the body weight before ovarian assessment
922 was considered as covariate. For number of waves, the body weight and number of
923 days that ovaries were assessment were considered as covariates.

924 Linoleic and estearic concentrations were analyzed by GLM considering the
925 Gamma distribution and log linkage function, with random animal effect, using the
926 GLIMMIX procedure. The model considered weight ranges (>26-28, >28-32, >32-34,
927 >34-38 kg) as covariate and the fixed effect of treatment.

928 Data are reported as least square means \pm standart error of mean (SEM).
929 Statistical significance was considered when $P \leq 0.05$.

930 **3 RESULTS**

931

932 **3.1 Feed intake and performance**

933

934 There was three-way interaction ($P < 0.05$) for dry matter and nutrients intake
935 and average daily weight gain (ADWG; table 2). DM intake was greater ($P < 0.05$) in
936 unsupplemented-AL animals that ovulated compared to those that not-ovulated.
937 Conversely, DM intake was lower ($P < 0.05$) in supplemented-AL animals that
938 ovulated than those that not-ovulated. The same pattern occurred for CP and NDF
939 intakes. EE intake was greater ($P < 0.05$) in supplemented-AL animals that not-
940 ovulated compared to those that ovulated and was greater ($P < 0.05$) in
941 unsupplemented-AL animals that ovulated. NCF intake was greater ($P < 0.05$) in
942 unsupplemented-AL animals that ovulated compared to those not-ovulated; however,
943 NCF intake did not differ between supplemented-AL animals. ADWG was lower ($P <$
944 0.05) in supplemented-AL animals that ovulated compared to non-ovulated; however,
945 there was no difference between ADWG for unsupplemented-AL animals.

946 There was two-way interaction ($P < 0.05$) for feed conversion. Feed
947 conversion was greater ($P < 0.05$) in unsupplemented ewe lambs that ovulated than
948 in those supplemented (5.8 ± 0.18 vs. 5.0 ± 0.17 , respectively). Conversely, feed
949 conversion in non-ovulated animals was unaffected ($P > 0.05$) by lipid
950 supplementation (5.4 ± 0.15 vs. 5.5 ± 0.16 mm, respectively). Feed conversion was
951 lower ($P < 0.05$) in restricted than in AL-fed animals (5.2 ± 0.12 vs. 5.6 ± 0.13 ,
952 respectively).

Table 2. Effects of intake level, lipid supplementation and physiological status on dry matter and nutrient intake and on average daily weight gain of Santa Ines ewe lambs (n = 35).

Item	Non-ovulated		Ovulated		P-value
	- Fat	+ Fat	- Fat	+ Fat	
<i>DMI (g/day)</i>					
Ad libitum	759.5±8.39aAY	747.7±9.79aAX	825.2±11.79aAX	715.8±8.98aBY	<0.01
Feed restriction	719.9±8.78bAX	691.7±8.69bBX	717.6±8.76bAX	687.2±9.02bBX	<0.01
<i>CP (g/day)</i>					
Ad libitum	157.3±1.91aAY	148.7±2.14aBX	174.3±2.74aAX	139.5±1.92aBY	<0.01
Feed restriction	144.7±1.94bAX	131.7±1.82bBX	145.7±1.95bAX	130.8±1.89bBX	<0.01
<i>NDF (g/day)</i>					
Ad libitum	267.3±3.23aBY	280.1±4.03aAX	279.9±4.38aAX	267.7±3.68aBY	0.02
Feed restriction	264.3±3.53aAX	272.1±3.75aAX	262.4±3.51bAX	271.6±3.90aAX	0.02
<i>EE (g/day)</i>					
Ad libitum	26.1±0.32aBY	74.3±1.08aAX	28.8±0.46aBX	69.8±0.97aAY	<0.01
Feed restriction	24.5±0.33bBX	63.6±0.89bAX	24.6±0.33bBX	63.9±0.93bAX	<0.01
<i>NFC (g/day)</i>					
Ad libitum	293.5±4.53aAY	195.4±3.57aBX	319.1±6.37aAX	191.5±3.36aBX	0.03
Feed restriction	260.5±4.44bAX	176.0±3.09bBX	260.0±4.44bAX	178.1±3.27bBX	0.03
<i>ADWG (g/day)</i>					
Ad libitum	147.4±8.10aAX	173.9±10.58aAX	168.8±11.33aAX	141.14±8.12aBY	<0.01
Feed restriction	119.1±6.90bAX	104.9±5.98bAY	121.6±7.08bBX	144.6±9.44aAX	<0.01

IL: Intake level; LS: lipid supplementation; OV: occurrence of ovulation; DM: dry matter, CP: crude protein, NDF: neutral detergent fiber, EE: ether extract, NFC: Non-fibrous Carbohydrates; ADWG: average daily weight gain; FC: feed conversion. Values are $\bar{x} \pm \text{SEM}$. a, b: Means within a column with different superscripts differ for intake level ($P < 0.05$). A, B: Means within a row with different superscripts differ for diet within of the same physiological status ($P < 0.05$). X, Y: Means within a column with different superscripts differ for physiological status within the same diet ($P < 0.05$).

953 3.2 Blood metabolites, insulin and fatty acids

954

955 There were no two- or three-way interactions ($P > 0.05$) for glucose, insulin,
956 triglycerides and plasma urea-N (Table 3). Plasma glucose concentration was higher
957 ($P < 0.05$) in lipid-supplemented animals, but unaffected ($P > 0.05$) by intake level
958 and physiological status (Table 3). The main effects of treatment were not significant
959 ($P > 0.05$) for serum insulin. Serum triglycerides concentration was higher ($P < 0.05$)
960 in lipid supplemented and in restricted animals. Plasma urea-N was higher ($P < 0.05$)
961 in unsupplemented and in AL-fed animals.

962 There was no three-way interaction ($P > 0.05$) for serum HDL and cholesterol,
963 but the interaction between intake level and lipid supplementation was significant (P
964 < 0.05 , Table 4). Serum HDL and cholesterol concentrations were higher ($P < 0.05$)
965 in unsupplemented-restricted animals compared to AL-fed animals. In contrast,
966 serum HDL and cholesterol concentrations did not differ ($P > 0.05$) between lipid-
967 supplemented animals. Furthermore, serum HDL was higher in ovulated compared to
968 non-ovulated animals (25.0 ± 0.67 vs. 22.7 ± 0.53 mg/dL, respectively). Serum
969 cholesterol concentration did not differ ($P > 0.05$) between ovulation statuses.
970 Linoleic and stearic serum were not affected ($P > 0.05$) by intake level of intake or
971 lipid supplementation (Table 6).

Table 3. Effects of intake level, lipid supplementation and physiological status on metabolite profile of Santa Ines ewe lambs (n = 35).

Item	Intake level		P-value	Lipid supplementation		P-value	Physiological status		P-value
	AL ¹	FR ²		- Fat	+ Fat		OV ³	NOV ⁴	
Glucose	67.8±1.28	70.3±1.17	0.15	65.8±1.17b	72.4±1.27a	<0.01	68.3±1.41	69.7±1.30	0.50
Insulin	14.6±1.13	14.4±1.01	0.89	15.6±1.14	13.5±0.99	0.17	14.2±1.16	14.9±1.17	0.68
Triglycerides	16.1±1.19b	20.5±1.36a	0.02	16.3±1.14b	20.3±1.42a	0.03	18.5±1.53	18.0±1.30	0.81
Plasma urea-N	23.5±0.77a	21.0±0.62b	0.01	23.34±0.73a	21.19±0.66b	0.04	22.35±0.81	22.12±0.70	0.94

¹Ad-libitum; ²Feed restriction; ³Ovulated; ⁴Non-ovulated. Values are \bar{x} ± standard error of the mean (SEM). a, b: Means within a row with different superscripts differ between intake level, or lipid supplementation or physiological status ($P < 0.05$).

Table 4. Effects of intake level and lipid supplementation on serum HDL and cholesterol concentrations of Santa Ines ewe lambs (n = 35).

Item	Lipid supplementation		P-value			
	- Fat	+ Fat	IL	LS	OV	IL x LS
<i>HDL (mg/dL)</i>						
Ad libitum	19.3±0.69bB	28.5±0.92aA	0.41	<0.01	0.02	0.03
Feed restriction	21.4±0.64aB	27.2±0.86aA	0.41	<0.01	0.02	0.03
<i>Cholesterol (mg/dL)</i>						
Ad libitum	44.0±1.83bB	64.1±2.36aA	0.36	<0.01	0.40	0.02
Feed restriction	49.9±1.69aB	60.7±2.21aA	0.36	<0.01	0.40	0.02

IL: intake level; LS: lipid supplementation; OV: occurrence of ovulation. Values are \bar{x} ± standard error of the mean (SEM). a,b: Means within a column with different superscripts differ for intake level ($P < 0.05$). A,B: Means within a row with different superscripts differ for lipid supplementation ($P < 0.05$).

972 **3.3 Follicular dynamics**

973

974 The number of follicular waves was greater ($P < 0.05$) in ewe lambs AL-fed
975 than in those restricted-fed diet (Table 5). The main effects of treatment and the two-
976 or three-way interactions were not significant ($P > 0.05$) for number of follicles in the
977 wave, diameter of the largest and the second largest follicle and growth rate of the
978 largest follicle.

Table 5. Effects of intake level, lipid supplementation and physiological status on follicular dynamics of Santa Ines ewe lambs (n = 29).

Item	Intake level		P-value	Lipid supplementation		P-value	Physiological status		P-value
	AL ¹	FR ²		- Fat	+ Fat		OV ³	NOV ⁴	
Number of waves	3.26±0.16a	2.84±0.11b	0.05	3.00±0.12	3.08±0.14	0.65	2.99±0.12	3.09±0.15	0.62
Number of follicles in the wave	5.20±0.42	5.63±0.28	0.40	5.80±0.31	5.04±0.35	0.09	5.73±0.30	5.10±0.41	0.23
Largest follicle diameter (mm)	5.39±0.23	5.73±0.16	0.23	5.63±0.18	5.49±0.19	0.56	5.58±0.16	5.53±0.23	0.85
2 ^o largest follicle diameter (mm)	4.43±0.19	4.73±0.13	0.20	4.50±0.14	4.65±0.16	0.44	4.79±0.13	4.36±0.19	0.07
Growth rate of the largest follicle (mm)	0.65±0.07	0.54±0.05	0.25	0.55±0.06	0.63±0.07	0.36	0.65±0.05	0.53±0.08	0.22

¹Ad-libitum; ²Feed restriction; ³Ovulated; ⁴Non-ovulated. Values are means ± standard error of the mean (SEM). a, b: Means within a row with different superscripts differ ($P < 0.05$).

Table 6. The effect of intake level and lipid supplementation on linoleic and stearic serum concentrations (mg/dL) of Santa Ines ewe lambs (n = 27).

Item	AL-WLI ¹	AL-LI ²	R-WLI ³	R-LI ⁴	P-value
					Trat
Linoleic (C18:2)	0.21 ± 0.05	0.19 ± 0.05	ND	0.15 ± 0.04	0.49
Stearic (C18:0)	0.46 ± 0.08	0.54 ± 0.10	NA	0.46 ± 0.08	0.72

¹*Ad-libitum* intake of a diet without lipid inclusion; ²*Ad-libitum* intake of a diet with lipid inclusion; ³Restricted intake of a diet without lipid inclusion; ⁴Restricted intake of a diet with lipid inclusion. Values are means ± standard error of the mean (SEM). ND: not detectable. NA: not analyzed.

979 4 DISCUSSION

980

981 Lipid supplementation can reduce (STAPLES; BURKE; THATCHER, 1998;
982 BARLETTA et al., 2016) or not DMI (STAPLES; BURKE; THATCHER, 1998;
983 JUNQUEIRA et al., 2019). Rate of fatty acid release in the rumen is slower by
984 oilseeds, then the adverse effects of lipid supplementation on DMI may be avoided.
985 Interestingly, in this study, ewe lambs that received lipid supplementation and
986 ovulated had decreased DMI. Therefore, even with lower DMI, lipid supplementation
987 may stimulated ovulation. The lower DMI and nutrients intake in these animals
988 resulted in lower ADWG. Despite this, feed conversion was lower in these animals. In
989 addition, greater NCF intake was also related to ovulation. NCF stimulate more
990 efficiently propionate production in ruminants. Propionate is an important precursor to
991 gluconeogenesis in the liver, thus increasing the availability of energy, resulting in
992 better reproductive performance (GONG et al., 2002; BUTLER et al., 2004).

993 Lipid supplementation increases the energy support for animals providing a
994 positive energy balance, that according to Scaramuzzi et al. (2006) increases the
995 insulin concentrations in the blood and stimulates follicular development.
996 Nevertheless, in our study lipid supplementation did not increased insulin
997 concentration. According to Staples et al. (1998), the effect of lipid supplementation
998 on serum insulin concentrations are inconsistent and may be a consequence of
999 energy intake. Because PB intake was greater in animals that fed AL without lipid
1000 supplementation, an increase in plasma urea-N was expected. Lipid supplementation
1001 increased serum triglycerides, HDL and cholesterol concentrations, consistent with
1002 previous reports (GHOREISHI et al., 2007; CHILDS et al., 2008). Feed restriction
1003 possibly led to lipid mobilization, as suggested by higher serum triglycerides, HDL and
1004 cholesterol concentrations in unsupplemented animals. However, AL-fed animals or
1005 restricted-lipid-supplemented had similar serum HDL and cholesterol concentrations,
1006 suggesting that lipid supplementation provides energy for FR ewe lambs. HDL may
1007 improve steroidogenesis because the supply of HDL cholesterol to the follicular fluid
1008 is 20-fold greater than that of LDL (WONNACOTT et al., 2010). Providing HDL to
1009 sheep granulosa cell culture media increased granulosa cell number, oestradiol and
1010 progesterone production (WONNACOTT et al., 2010). The higher serum HDL

1011 concentrations in animals that ovulated may be related to these physiological status
1012 compared to lower serum HDL concentrations in animals that did not ovulate.

1013 The follicular development occurs in a wave-like fashion in prepubertal ewes
1014 (BARTLEWSKI et al., 2011). In this study, we observed the pattern of follicular
1015 development in a wave-like fashion and similar number of waves during the period of
1016 ovarian assessment between prepubertal and pubertal ewe lambs. In accordance
1017 with our findings, Adams et al. (1994) reported that follicular development of
1018 prepubertal and pubertal heifers were similar, suggesting that mechanisms
1019 controlling follicular development are similar between them. Feed restriction may
1020 decrease plasma oestradiol concentrations and, consequently, change oestradiol
1021 feedback, decreasing FSH concentrations (Adams et al., 1997). Possibly, the lower
1022 plasma FSH concentrations may reduce the number of waves in animals fed
1023 restricted diet, as observed in our study. Despite the lower DMI in supplemented-FR
1024 not-ovulated ewe lambs, ADWG did not reduce. The lipid supplementation, with
1025 linoleic acid stimulates gluconeogenesis in the liver (THOMAS; BAO; WILLIAMS,
1026 1997), increasing plasma glucose concentrations. Therefore, lipid supplementation
1027 compensate the lower DMI in these animals. Furthermore, considering only ewe
1028 lambs that ovulated, lipid supplementation was able to maintain the same ADWG in
1029 FR-fed compared to the AL-fed animals. Therefore, lipid supplementation may be
1030 able to stimulate ovulation in these animals. This possibly occurred due to the major
1031 energy supply, providing a positive energy balance condition. In a situation of positive
1032 energy balance, there is an increase in glucose concentrations and stimulation of the
1033 IGF system, which act directly on folliculogenesis, hormonal production and ovulation
1034 (SCARAMUZZI et al., 2006).

1035 Although the number of waves decreased with FR, the other parameters of
1036 follicular dynamics were not changed by the moderate feed restriction, lipid
1037 supplementation and physiological status. Other studies also observed that 24%
1038 (COLAZO et al., 2009) or 40% (GRAZUL-BILSKA et al., 2012) of feed restriction was
1039 not enough to change the diameter of the largest follicle and the number of small (≤ 3
1040 mm) and large (> 3 mm) follicles, respectively. Contrastingly, the number of follicles
1041 from 2.5 to 3.5 mm in diameter decrease in Hu sheep subjected to 50% of FR (YING
1042 et al., 2011). Factors such as duration, the proportion imposed by feed restriction
1043 (VILLENEUVE; CINQ-MARS; LACASSE, 2010), the similarity of body weight

1044 between groups (SUSIN et al., 1995), may influence the effects of feed restriction on
1045 follicular dynamics. Lipid supplementation may influence follicular development
1046 through the supply of energy and independently of the energy supply (MATTOS;
1047 STAPLES; THATCHER, 2000). Lipid supplementation with roasted whole soybeans
1048 may increase the total number of follicles (ROBINSON et al., 2002) and the largest
1049 follicle diameter (DIRANDEH et al., 2013; ROBINSON et al., 2002). However, in
1050 other studies the total number of follicles, the largest follicle diameter and the growth
1051 rate of the largest follicle were not affect by lipid supplementation with roasted whole
1052 soybeans (GANDRA et al., 2017; CHILDS et al., 2008). So, in studies using the
1053 same lipid source, rich in linoleic acid, we can still observe inconsistent responses in
1054 the follicular development. Therefore, these results did not agree with our hypothesis
1055 that lipid supplementation is positively related to follicular development.

1056 Lipid supplementation with whole soybeans increases plasma linoleic acid
1057 concentrations (LIU et al., 2008; ZACHUT et al., 2008). However, in these studies,
1058 whole soybeans were not subjected to the roasting process. Roasting process in
1059 oilseeds leads the complexation of aldehydes with proteins, protecting unsaturated
1060 fatty acids from ruminal biohydrogenation (TROEGELER-MEYNADIER et al. 2014).
1061 This may have contributed to reduce the availability of linoleic acid in the duodenal
1062 content in animals that received lipid supplementation, not increasing the amount
1063 absorbed in relation to the group without lipid supplementation. Therefore, this result
1064 does not support our hypothesis that ewe lambs fed with roasted soybean had
1065 greater concentration of linoleic acid in the blood. It is important to interpret with
1066 caution this result, because biohydrogenation process depends on the combination
1067 of factors, such as the frequency of feeding (NRC, 2001), DMI, passage rate, rate of
1068 release of the oil contained in the seeds (STAPLES; BURKE; THATCHER, 1998),
1069 forage-to-concentrate ratio (KUCUK et al., 2001). Biohydrogenation is also influenced
1070 by amount of fatty acid consumed (JENKINS; KLEIN; MECHOR, 2009; STAPLES;
1071 BURKE; THATCHER, 1998) and by ruminal pH (VAN NEVEL; DEMEYER, 1996).

1072

1073 5 CONCLUSIONS

1074

1075 In conclusion, lipid supplementation with roasted whole soybeans improve the
1076 metabolic status, with no concomitant effect on linoleic acid blood concentration and
1077 on follicular dynamics. Except by reduction in number of waves, the follicular
1078 dynamics was not compromised by moderate feed restriction. Despite the higher
1079 HDL blood concentration in ovulated ewe lambs, these animals did not present
1080 enhanced follicular development.

1081

REFERENCES

ADAMS, G. P.; EVANS, A. C. O.; RAWLINGS, N. C. Follicular waves and circulating gonadotrophins in 8-month-old prepubertal heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 100, p. 27–33, 1994.

AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists International, Arlington, USA, 1990.

ASCARI, I. J. et al. Nursing regimens: Effects on body condition, return to postpartum ovarian cyclicity in Santa Ines ewes, and performance of lambs. **Animal Reproduction Science**, v. 140, p. 153-163, 2013.

BARLETTA, R. V. et al. Ruminal biohydrogenation and abomasal flow of fatty acids in lactating cows: oilseed provides ruminal protection for fatty acids. **Animal Feed Science and Technology**, v. 219, p. 111-121, 2016.

BARTLEWSKI, P. M.; BABY, T. E.; GIFFIN, J. L. Reproductive cycles in sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 3-4, p. 259-268, 2011.

BUTLER, S. T.; PELTON, S. H.; BUTLER, W. R. Insulin increases 17 β -estradiol production by the dominant follicle of the first postpartum follicle wave in dairy cows. **Reproduction**, v. 127, p. 537- 545, 2004.

COLAZO, M. G. et al. Reproductive performance of dairy cows is influenced by prepartum feed restriction and dietary fatty acid source. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 6, p. 2562-2571, 2009.

CHILDS, S. et al. Effect of level of dietary n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on systemic and tissue fatty acid concentrations and on selected reproductive variables in cattle. **Theriogenology**, v. 70, n. 4, p. 595-611, 2008.

DOREAU, M. et al. Ruminal metabolism of fatty acids: Modulation of polyunsaturated, conjugated, and trans fatty acids in meat and milk. In: **Handbook of Lipids in Human Function**. AOCS Press, p. 521-542, 2016.

EVANS, A. C. O. et al. Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. **Theriogenology**, v. 53, n. 3, p. 699-715, 2000.

FERRARETTO, L. F. et al. Effect of feed restriction on reproductive and metabolic hormones in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 2, p. 754-763, 2014.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1957.

GINTHER, O. J.; KOT, K.; WILTBANK, M. C. Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. **Theriogenology**, v. 43, n. 3, p. 689-703, 1995.

GONG, J. G. et al. Effects of dietary-induced increases in circulating insulin concentrations during the early post-partum period on reproductive function in dairy cows. **Reproduction**, v. 123, p.419-427, 2002.

GHOREISHI, S. M. et al. Effect of a calcium soap of fatty acids on reproductive characteristics and lactation performance of fat-tailed sheep. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 14, p. 2389-2395, 2007.

GRAZUL-BILSKA, A. T. et al. Overfeeding and underfeeding have detrimental effects on oocyte quality measured by in vitro fertilization and early embryonic development in sheep. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 43, n. 4, p. 289-298, 2012.

JENKINS, T. C.; KLEIN, C. M.; MECHOR, G. D. Managing milk fat depression: Interactions of ionophores, fat supplements, and other risk factors. In: **Proceeding 20 TH Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium. Gainesville, Florida. 2009.**

JUNQUEIRA, F. B. et al. Ovarian follicular development, hormonal and metabolic profile in prepubertal ewe lambs with moderate dietary restriction and lipid supplementation. **Animal Reproduction Science**, v. 204, p. 152-164, 2019.

KUCUK, O. et al. Effect of forage: concentrate ratio on ruminal digestion and duodenal flow of fatty acids in ewes. **Journal of Animal Science**, v. 79, n. 8, p. 2233-2240, 2001.

LIU, Z. L. et al. Effect of dietary sources of roasted oilseeds on blood parameters and milk fatty acid composition. **Czech Journal of Animal Science**, v. 53, n. 5, p. 219, 2008.

LOCK, A. L. et al. Concepts in fat and fatty acid digestion in ruminants. In: **Proc. Intermountain Nutrition Conference**, p. 85-100, 2006.

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

MENCHACA, A.; RUBIANES, E. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, n. 4, p. 403-413, 2004.

NRC. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. National Research Council. Washington, DC: National Academy Press, 2001.

NRC. **Nutrient Requirements of Small Ruminants**. National Research Council. Washington, DC: National Academy Press, 2007.

PALMQUIST, D. L.; JENKINS, T. C. A 100-Year Review: Fat feeding of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10061-10077, 2017.

REDDY, P. V.; MORRILL, J. L.; NAGARAJA, T. G. Release of free fatty acids from raw of processed soybeans and subsequent effects on fiber digestibilities. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 11, p. 3410-3416, 1994.

RODRÍGUEZ-PALMERO et al. Comparison of two methods for the determination of fatty acid profiles in plasma and erythrocytes. **Journal of Chromatography.A**. p. 435-440, 1998.

RUBIANES, E.; CASTRO, T. de; CARBAJAL, B. Effect of high progesterone levels during the growing phase of the dominant follicle of wave 1 in ultrasonically monitored ewes. **Canadian Journal of animal science**, v. 76, n. 3, p. 473-475, 1996.

RYAN, K. D. et al. Patterns of circulating gonadotropins and ovarian steroids during the first periovulatory period in the developing sheep. **Biology of Reproduction**, v. 45, p. 471-177, 1991.

SUSIN, I. et al. Effects of limit feeding a high-grain diet on puberty and reproductive performance of ewes. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 11, p. 3206-3215, 1995.

SCARAMUZZI, R. J. et al. A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. **Reproduction Nutrition Development**, v. 46, n. 4, p. 339-354, 2006.

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**, v. 81, n. 3, p. 856-871, 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**, v. 75, n. 9, p. 2512-2519, 1997.

TROEGELER-MEYNADIER, A. et al. Effects of the heating process of soybean oil and seeds on fatty acid biohydrogenation in vitro. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 9, p. 5657-5667, 2014.

VAN NEVEL, C. J.; DEMEYER, D. I. Influence of pH on lipolysis and biohydrogenation of soybean oil by rumen contents in vitro. **Reproduction Nutrition Development**, v. 36, n. 1, p. 53-63, 1996.

VILLENEUVE, L.; CINQ-MARS, D.; LACASSE, P. Effects of restricted feeding of prepubertal ewe lambs on reproduction and lactation performances over two breeding seasons. **Animal: an International Journal of Animal Bioscience**, v. 4, n. 12, p. 1997, 2010.

WONNACOTT, K. E. et al. Dietary omega-3 and-6 polyunsaturated fatty acids affect the composition and development of sheep granulosa cells, oocytes and embryos. **Reproduction**, v. 139, n. 1, p. 57, 2010.

YING, S. et al. Effect of different levels of short-term feed intake on folliculogenesis and follicular fluid and plasma concentrations of lactate dehydrogenase, glucose, and hormones in Hu sheep during the luteal phase. **Reproduction**, v. 142, n. 5, p. 699, 2011.

ZACHUT, M. et al. Dietary unsaturated fatty acids influence preovulatory follicle characteristics in dairy cows. **Reproduction**, v. 135, n. 5, p. 683-692, 2008.