

RONAN LOPES ALBINO

**DESENVOLVIMENTO DE NOVILHAS LEITEIRAS SUBMETIDAS
A DIFERENTES RELAÇÕES PROTEÍNA METABOLIZÁVEL:
ENERGIA METABOLIZÁVEL NA DIETA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2013

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

A336c
2013 Albino, Ronan Lopes, 1988-
Consumo, desempenho e desenvolvimento da glândula
mamária de novilhas da raça holandês submetidas a diferentes
relações proteína metabolizável : energia metabolizável na dieta /
Ronan Lopes Albino. – Viçosa, MG, 2013.
vii, 34 f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Marcos Inácio Marcondes.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 31-34.

1. Novilho - Alimentação e rações. 2. Ultrassom.
3. Glândulas mamárias. 4. Proteínas na nutrição animal.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Zootecnia.
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 636.208522

RONAN LOPES ALBINO

**DESENVOLVIMENTO DE NOVILHAS LEITEIRAS
SUBMETIDAS A DIFERENTES RELAÇÕES PROTEÍNA
METABOLIZÁVEL: ENERGIA METABOLIZÁVEL NA DIETA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 22 de julho de 2013.

Sebastião de Campos Valadares Filho
(Coorientador)

Bruno Campos de Carvalho
(Coorientador)

Fernanda Samarini Machado

Edenio Detmann

Marcos Inácio Marcondes
(Orientador)

Dedico,
ao meu avô João Curió (*in memoriam*), por tudo que ele representou pra mim. Hoje,
onde quer que ele esteja, tenho certeza que também está comemorando essa
conquista. Um eterno abraço do seu “nego”.

Que a nossa separação não seja motivo de tristeza, mas de saudosa recordação
confortada pela fé

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora da Aparecida em primeiro lugar.

Aos meus pais, por terem me apoiado e acreditado incondicionalmente em mim. Sem eles nada disso seria realidade.

Ao meu irmão, pela amizade incomparável.

A Leonor, por ter me dado todo apoio nessa caminhada, por aguentar firme minhas viagens e ausências e por ser um exemplo de mãe pra nossa filha.

A Estela, por ter entrado na minha vida.

A todos os meus familiares, em especial vó Hilda, vó Carminha e vô Nelo por todo carinho e por serem as raízes de uma família sólida e unida.

Aos amigos, pelos bons momentos e pela sincera amizade.

À Universidade Federal de Viçosa por viabilizar a transformação de um sonho em realidade.

Aos professores do Departamento de Zootecnia, por todos os ensinamentos e conselhos que ajudam a nos preparar para a vida.

Ao Professor Marcos Inácio Marcondes, pela orientação, amizade, por tudo que me ensinou e acima de tudo pela inteira confiança depositada no meu trabalho.

A toda equipe de estagiários (Alexandre, Aline, Anderson, Arliciene, Augusto, Carol, Chiquinho, Isis, José Heleno, Kalil, Toca, Marcelo (Murcego), Guerra, Sâmara, Stefani, Tháyna, Tadeu, Tainara, Weberth) pelo empenho e comprometimento com o experimento, além da amizade que foi construída ao longo do tempo que estivemos juntos.

A toda equipe de pesquisadores da Embrapa Gado de Leite, em especial ao pesquisador Bruno Campos de Carvalho, pela co-orientação e por participar ativamente neste trabalho.

Ao Professor Edenio Detmann, pela valiosa ajuda com a análise dos dados.

Ao Professor Sebastião Valadares, pela co-orientação e grande ajuda na interpretação dos dados.

Ao Professor Alberto Magno Ferreira, pela amizade e por sempre me orientar e aconselhar nas decisões acadêmicas.

A toda equipe de funcionários da UEPE-GL, por me receberem de braços abertos e por toda ajuda no experimento.

Muito obrigado!

ÍNDICE

RESUMO	V
ABSTRACT	VI
INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	5
<i>Delineamento experimental</i>	5
<i>Pesagem e medidas corporais</i>	7
<i>Avaliação da glândula mamária</i>	8
<i>Coleta de sangue</i>	10
<i>Ensaio de digestibilidade</i>	11
<i>Análise de alimentos</i>	12
<i>Cálculo da energia e proteína metabolizável</i>	13
<i>Energia metabolizável da dieta</i>	13
<i>Proteína metabolizável da dieta</i>	13
<i>Análise estatística</i>	14
RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
IMPLICAÇÕES	31
REFERÊNCIAS	32

RESUMO

ALBINO, Ronan Lopes, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2013. **Desenvolvimento de novilhas leiteiras submetidas a diferentes relações proteína metabolizável: energia metabolizável na dieta.** Orientador: Marcos Inácio Marcondes. Coorientadores: Bruno Campos de Carvalho e Sebastião de Campos Valadares Filho.

Este trabalho foi conduzido para avaliar o desenvolvimento da glândula mamária e o crescimento corporal de novilhas da raça Holandês submetidas a diferentes relações proteína metabolizável: energia metabolizável dietética (RPMEM). Vinte e cinco novilhas holandesas com peso médio inicial ($213,4 \pm 13,5$ kg) foram divididas em 5 tratamentos. Os tratamentos foram formados pela RPMEM, sendo estes 33, 38, 43, 48 e 53 gramas de proteína metabolizável (PM) por Mcal de energia metabolizável (EM). O experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados, considerando o peso inicial como fator de controle local. As RPMEM observadas nas dietas experimentais foram 36,2; 40,2; 46,2; 47,1 e 50,8 g de PM/Mcal de EM. Os consumos de PB, EE, CNF apresentaram comportamento linear ($P < 0,05$) de acordo com o aumento das RPMEM. Não houve diferença ($P > 0,05$) para os CMS e CFDN tanto em Kg/dia quanto em g/ Kg de peso corporal (PC). Quanto às análises de digestibilidade, apenas a PB foi afetada ($P < 0,05$) pelos tratamentos. Com o aumento da RPMEM houve uma redução ($P < 0,05$) da relação nitrogênio microbiano: nitrogênio ingerido (Nmic:N-Ing) e um aumento ($P < 0,05$) do nitrogênio total excretado na urina (N-urina) e da concentração de nitrogênio ureico na urina (NU-urina). A RPMEM não influenciou ($P > 0,05$) os ganhos de peso (GP), largura de garupa (LG), comprimento corporal (CC) e perímetro torácico (PT). No entanto, houve efeito quadrático ($P < 0,05$) das variáveis altura de cernelha (AC) e altura de garupa (AG) em relação aos tratamentos. No tocante às avaliações hormonais e da glândula mamária, somente os níveis séricos de IGF-1 aumentaram linearmente de acordo com os tratamentos ($P < 0,05$). De maneira geral, o aumento da RPMEM levou a uma maior perda de nitrogênio na urina. O GP não foi influenciado pela RPMEM, mas os ganhos de AC e AG apresentaram um comportamento quadrático. A intensidade do brilho das imagens da glândula mamária, medida através da média de pixels, não foi influenciada pela RPMEM na dieta de novilhas submetidas a crescimento acelerado.

ABSTRACT

ALBINO, Ronan Lopes, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2013. **Development of dairy heifers fed to increasing levels of relationship metabolizable protein: metabolizable energy on diet.** Adviser: Marcos Inácio Marcondes. Co-advisers: Bruno Campos de Carvalho and Sebastião de Campos Valadares Filho.

This work was conducted to evaluate the mammary gland development and the body growth of Holstein heifers fed to a fast growth under different metabolizable protein and metabolizable energy ratios (MPMER). Twenty five Holstein heifers (weighing 213 ± 67 Kg) were assigned to one of five treatments. The treatments were composed of metabolizable protein and metabolizable energy ratios (MPMER), with 33, 38, 43, 48, 53 grams of metabolizable protein per Mcal of metabolizable energy (ME) to each treatment. All diets were isoenergetic (2.6 Mcal of ME/ Kg DM). The experimental design was randomized blocks, being the weigh at beginning used as factor to local control. The MPMER obtained on the experiment were 36.2, 40.2, 46.2, 47.1 and 50.8 g PM per Mcal of ME. The intakes of CP, EE and NSC were affected ($P < 0.05$) by treatments. However, there were not ($P > 0.05$) differences to DMI and NDFI in Kg/day and g/ Kg of body weight (BW). In relation to the digestibility analyses, only CP was affected ($P < 0.05$) by treatment. There was a reduction ($P < 0.05$) of the nitrogen microbial and nitrogen intake ratio (Nmic: N-int) and an increase ($P < 0.05$) of daily excretions of total nitrogen (urinary-N) and of urinary urea nitrogen (UU-N). The MPMER did not affect ($P > 0.05$) weight gain, hip width, body length, and heart girth. However, the variables wither height and hip height shown a quadratic effect ($P < 0.05$). Regarding the hormonal and mammary gland evaluations, just the content of IGF-1 on the serum was affected by treatments. Overall, the increase of MPMER led to greater loss of urinary nitrogen. The weight gain was not affected by MPMER, but the gains of wither height and hip height, showed a quadratic response. The brightness of mammary gland images, shown here through of mean of pixels, was not influenced by MPMER in diet of heifers submitted to fast growth.

INTRODUÇÃO

Um dos fatores de suma importância para eficiência da atividade leiteira é o tempo decorrido entre a desmama de uma bezerra e o parto, denominada fase de recria. Isto porque quanto menor o período de recria maior a produção de leite diária, maior a renda da propriedade, menor o estoque de capital por litro de leite e, por fim, maior a taxa de retorno do capital investido (Moreira, 2012).

Para reduzir a idade ao primeiro parto considerando as peculiaridades de cada raça faz-se necessário aumentar o ganho médio diário durante a recria. No entanto, diversos autores têm associado o maior desempenho na fase da recria com a redução do desenvolvimento da glândula mamária e conseqüentemente menor produção de leite à primeira lactação (Sejrsen & Purup, 1997; Radcliff et al., 2000). Por outro lado, alguns trabalhos apontam para ausência de influência do ganho de peso sobre o desenvolvimento mamário quando se fornecem dietas com adequado balanço entre energia e proteína (Capuco et al., 1995; Dobos et al., 2000; Whitlock et al., 2002).

Os resultados contraditórios encontrados na literatura podem ser justificados pela complexa interação nutrição x fisiologia e a fase da vida em que são conduzidos os experimentos para avaliação do desenvolvimento da glândula mamária das novilhas. Animais consumindo acima da manutenção têm seus níveis séricos de hormônio do crescimento (GH) reduzidos (Radcliff et al., 2004). O GH está associado com o desenvolvimento da glândula mamária. Diante dessas premissas, concluir-se-ia, erroneamente, que animais sob alto consumo tenderiam a reduzir o desenvolvimento da glândula mamária, devido à redução dos níveis do GH no soro sanguíneo. No entanto, o GH não atua diretamente estimulando o desenvolvimento da glândula mamária, pois o mesmo tem sua ação mediada pelo fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (IGF-1), que por sua vez, apresenta comportamento inverso ao GH, ou seja, quanto menor os níveis de GH maior os de IGF-1 (Sejrsen, et al., 2000). Dessa forma, parece existir um paradoxo entre o elevado consumo e o desenvolvimento da glândula mamária. Além dos aspectos nutricionais, a idade em que o animal atinge a puberdade também influencia o desenvolvimento da glândula (Meyer et al., 2006).

Sendo assim, para melhor entendimento destas interações é necessário explorar melhor os efeitos do consumo, bem como as ações hormonais nas diferentes fases do desenvolvimento mamário.

O desenvolvimento da glândula mamária pode ser dividido em duas fases, isométrica e alométrica. Do nascimento até os 3 meses de idade a glândula mamária de uma bezerra cresce à mesma taxa do seu corpo, ou seja, crescimento isométrico. Dos três meses até o início da puberdade a glândula se desenvolve de 3 a 4 vezes mais rápido do que o corpo da novilha, fase do crescimento alométrico. Do início da puberdade até o terço final da gestação a glândula volta a crescer de forma mais lenta e do terço final da gestação até o parto a glândula mamária cresce, novamente, de forma alométrica (Sinha & Tucker, 1969).

Embora o crescimento mamário na fase pré-púbere seja quantitativamente menos importante que no terço final da gestação, evidências demonstram que a modulação que ocorre na glândula mamária na fase pré-púbere terá forte influência na capacidade produtiva da vaca (Purup et al., 2000). Essa modulação acontece com o crescimento e ramificação dos brotos mamários em direção ao tecido adiposo (estroma). Quanto maior o crescimento dos brotos mamários em detrimento de tecido adiposo maior será o número de células que suportarão o desenvolvimento lóbulo-alveolar para a futura síntese de leite da glândula mamária.

Entende-se que a região estromal, que compõe parte da região denominada de “*fat pad*”, é fundamental para o desenvolvimento da glândula mamária, pois nesta encontra-se a matriz de tecidos adiposos e conectivos capazes de mediar a ação e síntese de uma série de hormônios relacionados ao desenvolvimento mamário. Entretanto, quando o tecido adiposo desenvolve de forma desordenada, inicia-se um processo reverso, onde este último passa a ocupar espaços que seriam preenchidos por tecidos secretores de leite (Hovey et al., 1999).

O acúmulo de “*fat pad*” pode estar diretamente relacionado ao alto ganho de peso que é, por sua vez, sustentado pelo nível de energia consumida pelo animal. No entanto, alguns autores têm demonstrado que a principal influência sobre o acúmulo de gordura na glândula não seria exatamente o consumo de energia, mas sim a proporção entre a energia e proteína consumida pelo animal (Capuco et al., 1995; Dobos et al., 2000).

Vandehaar (1997) examinou a relação entre o desenvolvimento mamário, produção de leite e a relação entre a proteína e energia da dieta de 11 trabalhos, nos quais o ganho médio diário (GMD) excedeu 900 g. As dietas para rápido crescimento variaram de 43 a 83 gramas de proteína bruta (PB)/Mcal de energia metabolizável

(EM). A relação PB:EM foi responsável por 51% das variações nas respostas do parênquima mamário e 78% nas variações da produção de leite, dados que reforçam a importância do consumo balanceado de proteína e energia. Um dos limitantes desse trabalho está no uso da PB como parâmetro de comparação, uma vez que esta não é totalmente absorvida na forma e quantidade como é ofertada.

Assim como a nutrição, outros fatores também irão influenciar o desenvolvimento da glândula mamária. Segundo Berry et al. (2003), o desenvolvimento da glândula mamária é influenciado por uma complexa interação entre hormônios sistêmicos e fatores de crescimento produzidos localmente. Os hormônios mais associados ao desenvolvimento da glândula mamária são: GH, estrógeno, prolactina e IGF-1 (Sejrsen et al., 1982; Berry et al., 2001).

O GH e a prolactina parecem não agir diretamente sobre a glândula, mas estes estimulam a síntese de fatores mitogênicos ou agem por efeito parácrino, respectivamente, estimulando o desenvolvimento mamário. A síntese de IGF-1 é realizada, primariamente, no fígado, por intermédio do GH e, a partir dessa forma de síntese, o IGF-1 recebe a qualificação de hormônio endócrino, pois percorre todo o corpo do animal através da corrente sanguínea antes de chegar a célula específica para desempenhar sua função mitogênica. No entanto, existem evidências que comprovam que também ocorre produção local de IGF-1 que poderá mediar e/ou potencializar os efeitos dos hormônios sistêmicos (Berry, et al., 2003). Em estudo com ratos “*knockout*”, foi demonstrada a maior importância do IGF-1 produzido localmente para muitos aspectos do crescimento e desenvolvimento celular do que o IGF-1 sistêmico (Liu et al., 2000).

O estrógeno parece interagir com o IGF-1 para promover o desenvolvimento mamário, mas o mecanismo pelo qual ocorre essa interação ainda é desconhecido. Segundo Ruan et al. (1995), o estrógeno aumentou os efeitos mamogênicos em ratos pré-púberes assim como a habilidade do GH em estimular a expressão do RNAm do IGF-1. No entanto, sabe-se que é improvável que o estrógeno aja diretamente na glândula estimulando a transcrição do IGF-1, pois o receptor do IGF-1 é encontrado, exclusivamente, nas células estromais, enquanto o receptor para o estrógeno está situado nas células epiteliais (Berry et al., 2003).

Diante da breve apresentação a respeito dos complexos efeitos nutricionais e fisiológicos sobre o desenvolvimento da glândula, justifica-se o grande número de

pesquisas que têm sido realizadas com intuito de prever, antecipadamente, o quanto a nutrição pode afetar na produção de leite futura de uma vaca.

Uma das formas de prever esses efeitos está no monitoramento da formação das células que irão sintetizar o leite. Sendo assim, a grande maioria dos trabalhos têm utilizado a biópsia da glândula ou o abate das novilhas para avaliar as alterações fisiológicas e estruturais ocorridas na glândula mamária durante a fase pré-púbere. Contudo, essas técnicas são invasivas e caras, o que se torna limitante para os moldes das pesquisas atuais. Métodos alternativos que reduzam o tempo e o custo das análises têm sido buscados, como por exemplo, o uso de ultrassonografia para avaliar a deposição de gordura em carcaça de animais de corte e avaliar características da glândula mamária (Brethour, 2000; Nishimura et al., 2011).

O uso da técnica de ultrassom tem sido amplamente utilizada em animais de corte, basicamente para selecionar touros com mérito superior para qualidade de carcaça e para agrupamento de lotes de animais em confinamento. A espessura de gordura subcutânea, a área de olho de lombo e a porcentagem de gordura intramuscular são as medidas mais avaliadas com o uso de imagens de ultrassom (Williams, 2002). Dentre as medidas citadas, a gordura subcutânea apresenta maior acurácia na predição, fato relacionado à simplicidade dessa medida em relação às outras. Já a porcentagem de gordura intramuscular, uma medida um pouco mais complexa, requer avaliação através de programas de computador que medem a diferença na reflexão das ondas de pixels emitidas pela gordura e pelos demais tecidos (Brethour et al., 1990; Brethour et al., 1991).

O acúmulo de gordura no interior da glândula mamária parece poder ser avaliado segundo o conceito empregado na mensuração da porcentagem de gordura intramuscular, uma vez que as duas avaliações buscam quantificar o quanto de gordura está entremeada aos tecidos. No entanto, não há trabalhos que quantificaram o acúmulo de gordura na glândula mamária através de imagens de ultrassom e nem programas específicos para tal análise.

À luz do que foi apresentado até o momento, hipotetiza-se que novilhas holandesas alimentadas com dieta balanceada em relação a proteína e energia metabolizável, se submetidas a altas taxas de ganho de peso no período pré-púbere, não apresentariam redução no desenvolvimento da glândula mamária.

Assim, este trabalho foi conduzido com intuito de avaliar o desenvolvimento da glândula mamária e o crescimento corporal de novilhas holandesas submetidas a

dietas com diferentes relações proteína metabolizável: energia metabolizável (RPMEM).

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado nas instalações da Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Gado de Leite (UEPE-GL) da Universidade Federal de Viçosa entre dezembro de 2011 e abril de 2012, divididos em 4 subperíodos de 28 dias cada. Todos os procedimentos foram previamente aprovados pela comissão de Ética e Bem Estar Animal da Universidade Federal de Viçosa segundo o protocolo número 11/2012.

Delineamento experimental

Um total de 25 novilhas da raça Holandês com peso corporal ($213,4 \pm 13,5$ kg) e idade inicial ($7,8 \pm 0,5$ meses) média e erro padrão da média, foram distribuídas em delineamento em blocos ao acaso, com 5 repetições, sendo o peso inicial tomado como fator de controle local.

As novilhas foram alocadas em baias individuais com área de descanso, providas de cocho e bebedouro. Todos os animais usados no experimento foram provenientes do rebanho da UEPE-GL e, portanto seguiram todos os padrões sanitários adotados pela unidade.

Antes de iniciar o experimento, foi permitido um período de 15 dias de adaptação às novas instalações e condições experimentais para evitar que o estresse da mudança de ambiente afetasse o consumo e o desempenho dos animais. Posteriormente, os tratamentos foram distribuídos às novilhas, sendo cada tratamento constituído pela relação entre a proteína metabolizável (PM) e a energia metabolizável (EM) da dieta, sendo estes 33, 38, 43, 48 e 53 gramas (g) de PM por Mcal de EM (Tabela 1).

Tabela 1- Composição e os teores de nutrientes das dietas experimentais

	Tratamentos				
	33	38	43	48	53
Teor dos alimentos na dieta	g PM por Mcal de EM				
Silagem de Milho (g/ Kg MS)	608,0	608,0	600,7	599,6	600,0
Farelo de Soja (g/ Kg MS)	141,7	181,9	243,7	260,2	298,9
Milho (g/ Kg MS)	164,9	146,2	108,6	93,4	63,5

Farelo de Trigo (g/ Kg MS)	77,2	60,5	41,6	41,5	32,9
Minerais (g/ Kg MS)	8,2	3,4	5,4	5,3	4,7
<hr/>					
Nutrientes					
<hr/>					
MS (g/ Kg MN)	496,3	496,1	501,2	501,9	501,7
MM (g/Kg MS)	43,9	45,5	47,9	48,8	50,7
PB (g/ kg MS)	142,8	158,7	183,0	189,9	205,6
EE (g/ kg MS)	20,9	20,6	19,8	19,4	18,9
FDNcp (g/ kg MS)	312,2	309,6	304,1	304,1	303,2
CNF (g/ kg MS)	471,9	462,1	439,8	432,3	417,0

As dietas foram formuladas com uma relação volumoso:concentrado (V:C) (60:40), onde manteve-se a quantidade de energia fixa (2,6 Mcal de EM/ kg de MS) e variou-se a quantidade de proteína por tratamento. Todas as dietas foram formuladas para permitir um ganho de 1 kg/dia com base nas exigências de EM de uma novilha de 200 kg de peso corporal (PC) (NRC, 2001). As dietas foram fornecidas *ad libitum* diariamente às 8 h 00 e 16 h 00.

Para mensurar o consumo, foi estabelecida uma escala 0,5 unidades de consumo de matéria seca (MS) com amplitude entre 3,5 e 15 kg de MS. Todos os dias pela manhã as sobras do cocho e do chão em frente a cada baia foram recolhidas e pesadas, permitindo-se máximo de 5% de sobras sob o valor da MS fornecida no dia anterior e mínimo de 30% do valor da sobra máxima. Se houvesse valor maior que 5%, reduzia-se em 0,5 unidades a quantidade de MS a ser fornecida no próximo dia. A fim de manter maior controle sobre a relação V:C da dieta e, por conseguinte, sobre o nível de consumo de energia, uma vez por semana a silagem de milho foi amostrada e seca em micro-ondas para corrigir o teor de MS (Lacerda et al., 2009). Para os alimentos concentrados, assumiu-se o valor de 880 g MS/ Kg MN ao longo de todo experimento.

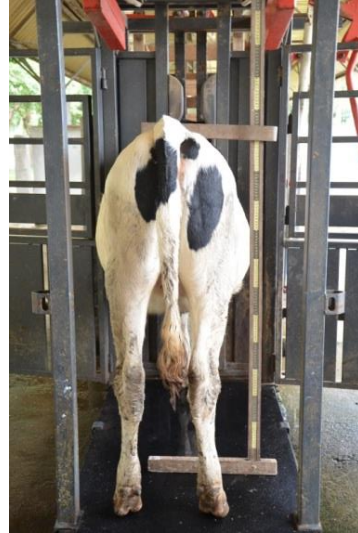
Na última semana de cada período experimental foram realizados a pesagem, a mensuração de medidas corporais, a coleta de sangue e a avaliação do desenvolvimento da glândula mamária com o uso do ultrassom em todas as novilhas. Simultaneamente, foram amostrados o volumoso e as sobras de cada animal para análises químicas. Ademais, ao final do 1º e do 3º período foram realizados ensaios de digestibilidade com todos os animais.

Pesagem e medidas corporais

Os animais foram mantidos em jejum hídrico por 12 horas antes da pesagem em balança convencional. Simultaneamente, mensurava-se a altura de cernelha (AC), altura de garupa (AG), largura de garupa (LG), comprimento corporal (CC) e perímetro torácico (PT) com os animais mantidos de pé dentro de um tronco de contenção (Figura 1).



(AC)



(AG)



(LG)



(CC)



(PT)

Figura 1 – Avaliação de medidas lineares

Avaliação da glândula mamária

O desenvolvimento da glândula mamária foi avaliado com o uso de um equipamento de ultrassom (B-mode) equipado com transdutor micro-convexo trabalhando na frequência de 6 MHz (DP2200, Mindray, China).

A profundidade de penetração das ondas sonoras no tecido, assim com a resolução da imagem é dependente e inversamente relacionada à frequência do transdutor. Assim, um transdutor trabalhando a uma frequência de 3,5 MHz resulta em maior penetração nos tecidos e menor detalhe da imagem, enquanto um trabalhando a 7.5 MHz resulta em menor penetração nos tecidos e maior detalhe da imagem (Williams, 2002). Como as novilhas em análise apresentavam glândula mamária pouco desenvolvida, logo pouco profunda, optou-se por trabalhar em uma frequência maior, com intuito de priorizar o detalhe das imagens.

As imagens foram tomadas dos quartos anteriores e posteriores, em posição padronizada da probe com inclinação de 45° em relação à inserção do teto, sempre no sentido caudo-cranial, conforme técnica descrita por Nishimura et al. (2011). Todos os procedimentos foram realizados com os animais mantidos de pé e sem o uso de sedativos (Figura 2).

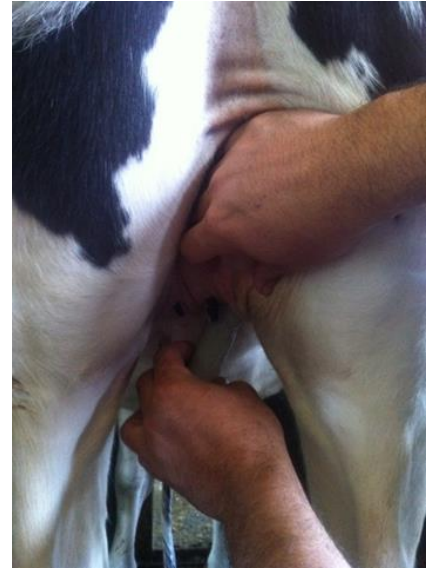


Figura 2 – Uso do ultrassom para avaliar o desenvolvimento da glândula mamária

As imagens foram salvas em formato BMP, sendo posteriormente transferidas para o programa ImageJ® (NIH, Estados Unidos). Dentro de cada imagem foram coletados três quadrados aleatórios de mesma área, próximos à região de crescimento do ducto mamário (Figura 3). O círculo preto está marcando a região de formação e crescimento dos ductos, conforme sugerido por Nishimura et al. (2011). Posteriormente, utilizou-se o valor médio de pixels dentro de cada quadrado para avaliar a variação dos pixels por tratamento. Em imagens de 8 bit, os pixels são representados numericamente em uma escala de 256 formas de cinza (0=preto; 255=branco) de acordo com sua intensidade de brilho (Ferreira & Rasband, 2011).

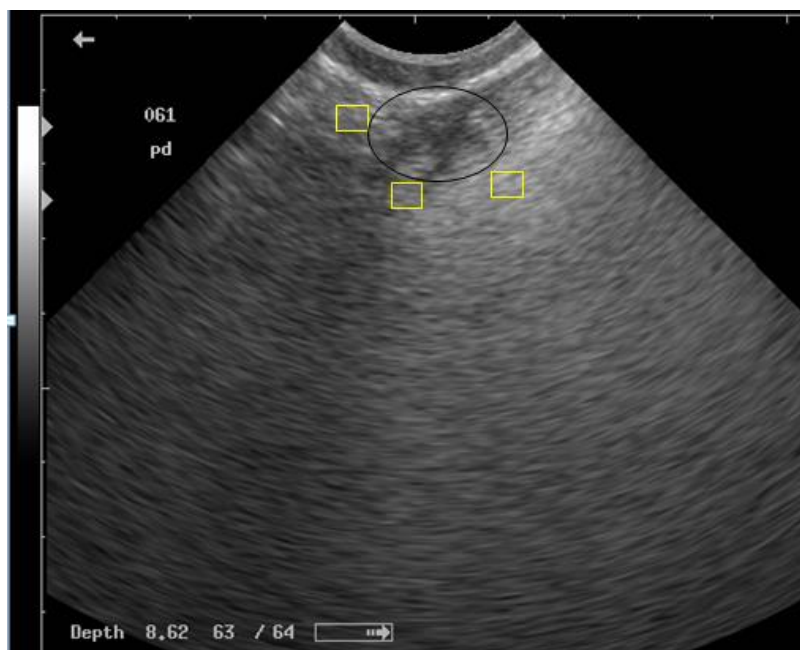


Figura 3 – Ilustração de uma imagem da glândula mamária sendo analisada com o programa ImageJ. Os quadrados estão posicionados próximos à região de crescimento dos ductos.

A amplitude dos pixels pode ser definida como ecogenicidade, ou seja, é o quanto uma estrutura retém a onda sonora do ultrassom. Estruturas que tem alto poder de refletir as ondas sonoras (tecido adiposo) são definidas como hiperecóicas e, portanto, apresentam maiores valores de pixels. As imagens com baixa capacidade de reflexão são denominadas como hipoecóicas e tem os menores valores de pixels.

Coleta de sangue

Amostras de sangue foram coletadas na última semana de cada período experimental por punção na veia jugular, aproximadamente 4 horas após a alimentação matinal. O sangue foi coletado em tubos de 10 mL e todas as análises foram realizadas nas amostras de soro. Após a coleta, as amostras foram centrifugadas a 1.304 G por 15 minutos sendo retiradas três alíquotas de soro de 1 mL cada e congeladas separadamente a -20 °C. Posteriormente, procederam-se as análises de nitrogênio uréico no soro (NUS), glicose e IGF-1. A análise de glicose foi realizada segundo o método da glicose oxidase. A análise de NUS foi realizada segundo o método glutamato desidrogenase. O IGF-1 foi mensurado pelo método imunoensaio ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

Ensaio de digestibilidade

Os ensaios de digestibilidade foram realizados ao final do primeiro e terceiro períodos experimentais. As digestibilidades obtidas no primeiro e terceiro período foram extrapoladas para o segundo e quarto período, respectivamente. Com isso, foi possível estimar o consumo de matéria orgânica digestível (MOD) e de energia metabolizável (EM) de cada período experimental.

Para estimar a energia perdida nas fezes foi utilizado o procedimento de coleta total das fezes de todos os animais durante 3 dias consecutivos. Os animais permaneceram soltos dentro de suas baias e as fezes foram coletadas do piso, procurando sempre eliminar as contaminações. Ao final de cada dia de coleta foi realizada a pesagem e amostragem do volume total de fezes. Posteriormente, as amostras foram secas em estufa ventilada a 55 °C e foi elaborada amostra composta proporcional à quantidade de matéria seca excretada.

Para se quantificar os teores de nitrogênio total na urina (N-urina), nitrogênio ureico na urina (NU-urina), alantoína, ácido úrico e creatinina foi utilizado a técnica de coleta spot de urina durante três dias consecutivos. A primeira coleta foi realizada antes do trato da manhã (7 h 30), a segunda entre os dois tratamentos (12 h 00) e a última após os dois tratamentos (18 h 00).

Ao final da coleta, cada amostra de urina foi dividida em duas subamostras, sendo uma de urina diluída e outra de urina pura. Para compor a urina diluída utilizou-se uma alíquota de 10 mL de urina em 40 mL de H₂SO₄ a 0,036 N com intuito de evitar a destruição bacteriana dos derivados de purina e precipitação do ácido úrico. Na amostra de urina diluída foram realizadas as análises de alantoína segundo técnica descrita por Chen & Gomes (1992).

A concentração de ácido úrico foi determinada segundo método descrito por Fujihara et al. (1987). A uréia foi determinada segundo o método enzimático calorimétrico descrito por Kerscher & Ziegenhorn (1985) e a creatinina pelo método de ponto final, com utilização de picrato e acidificante (Labtest Diagnóstica S.A). O NU-urina foi calculado através da multiplicação da uréia pelo fator 0,4667. A excreção diária de creatinina (EC) foi estimada a partir da equação proposta por (Chizzotti, et al., 2008) para novilhas holandesas:

$$EC (mg / KgPC) = 32,2 - 0,0109 \times PC (Kg)$$

onde: PC = peso corporal;

O volume urinário diário (VU) foi calculado através da divisão das EC pela concentração de creatinina nas amostras “spot” de urina.

A determinação do N-total seguiu o método Kjeldhal, descrito por (Silva & Queiroz, 2002).

A excreção de derivados de purina (DP) foi constituída pelo somatório da excreção diária de alantoína e a excreção diária de ácido úrico na urina, expressa em mmol/dia.

As purinas microbianas absorvidas (Pabs, mmol/dia) foram calculadas a partir da excreção de derivados de purinas, por intermédio da equação:

$$Pabs = (DP - 0,439 \times PC^{0,75}) \div 0,99$$

Onde 0,99 é a recuperação de purinas absorvidas como derivados urinários de purinas e $0,439 \times PC^{0,75}$, a contribuição endógena para a excreção de purinas (Prates et al., 2012).

O fluxo intestinal de nitrogênio microbiano (Nmic, g N/dia) foi calculado em função das purinas microbianas absorvidas (Pabs, mmol/dia), utilizando a equação (Chen & Gomes, 1992):

$$Nmic = (70 \times Pabs) \div (0,93 \times 0,11 \times 1000)$$

Onde 70 representa o conteúdo de N nas purinas (mg N/mmol); 0,83, a digestibilidade das purinas microbianas e 0,11 a relação N-purina:N-total nas bactérias (Prates et al., 2012).

O balanço de compostos nitrogenados (BN) foi obtido pela diferença entre o total de nitrogênio ingerido (N-ingerido) e o total de nitrogênio excretado nas fezes (N-fecal) e na urina (N-urina).

Análise de alimentos

A silagem de milho e as sobras de cada animal foram amostradas diariamente durante os últimos 7 dias de cada período experimental. Ao final, fazia-se uma amostra composta de aproximadamente 300 g, onde foram realizadas todas as análises. Os alimentos farelo de soja, milho e farelo de trigo foram amostrados todas as vezes que uma nova remessa de ração era misturada na fábrica. No total, foram 4 misturas de ração para o experimento, aproximadamente uma mistura por período.

As amostras compostas de sobras, fezes e volumoso foram secas em estufa ventilada (55°C). As amostras foram então moídas em moinho tipo facas utilizando peneira com malha de 1 mm e submetidas à análise de matéria seca (MS) (INCT-CA

G-003/1), cinzas (CZ) (INCT-CA M-001/1), proteína bruta (PB) (INCT-CA N-001/1), fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) (INCT-CA F-001/1), proteína insolúvel em detergente neutro (PIDN) (INCT-CA N-004/1), cinzas insolúvel em detergente neutro (CIDN) (INCT-CA M-002/1) e extrato etéreo (EE) (INCT-CA G-005/1).

Os teores de carboidratos não-fibrosos (CNF) foram obtidas pela equação (Detmann & Valadares Filho, 2010) :

$$CNF_{cp} = 100 - (FDN_{cp} + PB + EE + MM);$$

Cálculo da energia e proteína metabolizável

A energia metabolizável (EM) e a proteína metabolizável (PM) da dieta foram calculadas com base nas equações propostas pelo NRC (2001).

Energia metabolizável da dieta

$$ED \left(\frac{Mcal}{dia} \right) = (FDN_{cpad} \times 4,2) + (CNF_{fad} \times 4,2) + (PB_{ad} \times 5,6) + (EE_{ad} \times 9,4);$$

$$EM = ED \times 0,82;$$

Onde:

ED – energia digestível, em Megacalorias (Mcal/dia);

EM – energia metabolizável, em Mcal/dia.

FDN_{cpad} - fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína aparentemente digerida;

CNF_{fad} – carboidratos não fibrosos aparentemente digeridos;

PB_{ad} – proteína bruta aparentemente digerido;

EE_{ad} – extrato etéreo aparentemente digerido.

Proteína metabolizável da dieta

$$P_{met} (g/dia) = P_{Vmicd} + P_{NDRd}$$

$$P_{Vmicd}(g/dia) = P_{Bmicd} \times 0,64$$

$$P_{Bmic} (g/dia) = N_{mic}^1 \times 6,25$$

$$P_{DR} (g/dia) = P_{Bmic} \div 0,85$$

$$P_{B}(g/dia) = P_{DR} + P_{NDR}$$

$$P_{NDRd}(g/dia) = P_{NDR} \div 0,8$$

Onde:

P_{met} – Proteína metabolizável;

P_{Vmicd} – Proteína verdadeira microbiana digestível;

0,64 – considera que 80% da PBmic é formada por proteína verdadeira e essa proteína tem 80% de digestibilidade;

PBmic – Proteína bruta microbiana;

¹ = obtida através da equação de excreção de derivados de purina (Chen & Gomes, 1992);

PDR – proteína degradável no rúmen;

0,85 – eficiência de utilização da PDR para síntese de PBmic (NRC, 2001);

PNDRd – Proteína não degradável no rúmen digestível;

0,8 – digestibilidade da proteína no intestino (NRC, 2001).

Análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados, considerando o peso inicial como fator de controle local. As avaliações foram feitas através de um modelo misto, sendo os tratamentos considerados como efeito fixo e os blocos considerados efeito aleatório. A soma de quadrado de tratamentos foi decomposta ortogonalmente em efeitos lineares, quadráticos, cúbicos e de quarta ordem. Não foram observados efeitos cúbicos e nem de quarta ordem, portanto os mesmos não foram expostos no trabalho.

Os valores de pixels não seguiram distribuição normal de probabilidade, então foi procedida uma transformação logarítmica dos dados.

As mensurações da glândula mamária nos diferentes períodos e os ensaios de mensuração de consumo e digestão foram incluídas no modelo como medidas repetidas. As estruturas das matrizes de (co) variâncias foram avaliadas por intermédio do critério de Akaike corrigido (AICC). Foram utilizadas estruturas de simetria composta heterogênea (CSH), autoregressiva 1 (AR 1) ou não-estruturada para diferentes variáveis. Para todas as análises foi adotado $\alpha = 0,05$ como nível de significância, utilizando o PROC MIXED do SAS (*Statistical Analysis System*; versão 9.2).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A influência dos tratamentos sobre as variáveis analisadas será baseada na RPMEM. No entanto, será apresentada também a relação proteína: energia na forma de PB e EM, por ser esta uma unidade de amplo uso na literatura.

Parte das relações PB:EM estabelecidas neste experimento estão inseridas dentro da amplitude de relações propostas para novilhas na fase pré-púbere (50 a 65 g de PB: Mcal de EM) pelo NRC (2001). No entanto, algumas relações (68,8 e 73,8) foram estabelecidas acima das recomendações do NRC (2001). Alguns autores têm sugerido que os níveis de proteína recomendados pelo sistema americano estão aquém das exigências de novilhas holandesas com peso acima de 200 kg (Valadares Filho & Oliveira, 2010).

As RPMEM (36,2, 40,7 e 46,6) observadas ao final do experimento não coincidiram exatamente com os valores preditos (33, 38, 43), estando estas acima do planejado (Tabela 2). Este fato esteve relacionado à análise de PB do farelo de soja (48,73 vs 50,39 % da MS), que apresentou valores superiores àqueles usados durante o planejamento do estudo. Como a relação foi obtida através da divisão do consumo de PM pelo consumo de EM e, considerando que os valores tabelados para proteína foram inferiores aos obtidos nas análises dos alimentos, justifica-se a RPMEM ficar acima dos valores preditos.

Tabela 2- Relações preditas e observadas entre a porcentagem de proteína metabolizável e energia metabolizável da dieta

Itens	RPMEM				
	33	38	43	48	53
PB (g/Kg MS)	136,2	152,4	167,5	183,1	198,4
PM (g/Kg MS)	85,7	98,6	110,8	123,4	135,8
EM, (Mcal/kg MS)	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6
PB:EM (g/Mcal)	52,4	58,6	64,4	70,4	76,3
Relações Preditas (PM/EM)	33	38	43	48	53
PB (g/ kg MS)	146,4	162,5	186,1	192,5	209,2
PM (g/Kg MS)	98,1	112,5	129,4	134,4	146,7
EM, (Mcal/kg MS)	2,7	2,8	2,8	2,8	2,8
PB:EM (g/Mcal)	54,5	58,8	67,0	68,8	73,8
Relações Observadas (PM/EM)	36,6	40,7	46,6	48,0	51,8

RPMEM = relação proteína metabolizável: energia metabolizável dietética; PB = proteína bruta; PM = proteína metabolizável; EM = energia metabolizável.

No entanto, observa-se que este comportamento não foi semelhante em todos os tratamentos, dado que o tratamento 53 apresentou RPMEM aquém do planejado (Tabela 2). Todos os tratamentos foram formulados para apresentarem a mesma

concentração de EM, mas a concentração de EM da dieta aumentou de acordo com o tratamento. Contudo, ressalta-se que estes valores são apenas numéricos, uma vez que não houve diferença no consumo de EM ($P = 0,414$) e nem no consumo de MS ($P = 0,607$) (Tabela 3). Sendo assim, toda a discussão a seguir será baseada na RPMEM predita.

Não houve diferença nos consumos de MS, FDN, EM e MOD ($P > 0,05$) (Tabela 3). O consumo é regulado tanto por fatores físicos como quimiostáticos, sendo que os fatores quimiostáticos possuem maior influência quando as dietas têm baixa capacidade de enchimento e os físicos em dietas que apresentam maior capacidade de enchimento ruminal (Fisher, 2002). As dietas foram formuladas para conterem a mesma quantidade de energia, 2,6 Mcal de EM por Kg de MS, visando permitir um GMD próximo a 1 kg/dia e estas apresentaram em média 73% de digestibilidade da MS. Uma vez que as dietas foram formuladas com alta concentração energética e as mesmas apresentaram alta digestibilidade, sugere-se que o consumo tenha sido regulado, em sua maior parte, por fatores quimiostáticos. Em concordância com esta afirmativa, Conrad et al. (1964) já vinham sugerindo que o consumo de dietas com alta digestibilidade é controlado, basicamente, pela demanda de energia do animal.

No entanto, trabalhos mais novos têm sugerido que o consumo animal não é regulado por um ou outro fator, mas sim pela sobreposição dos efeitos de diversos fatores, tais como o enchimento do trato intestinal, a habilidade dos tecidos em metabolizar os nutrientes, a acidez ruminal e a osmolaridade, além dos fatores ambientais e comportamentais (Forbes, 1996). Essa junção de fatores afetando mutuamente o consumo foi apresentada por Forbes (2003) como a teoria do desconforto causado pela ingestão desbalanceada de nutrientes. À medida que a dieta oferecida se distancia da exigência dos animais aumenta-se o desconforto causado pela mesma e, dessa forma haverá efeito no consumo voluntário proporcional ao desequilíbrio dietético.

Considerando que a amplitude da RPMEM utilizada neste experimento foi relativamente pequena, sugere-se que tenha havido um desconforto mínimo entre as dietas e por isso não foi observado diferença no consumo.

Quando se avaliou os consumos de MS e FDN relativo ao PC (g/Kg de PC) também não foram identificados efeitos significativos ($P > 0,05$) (Tabela 3). Os valores de consumo de MS estão próximos aos resultados encontrados por Teixeira

et al. (2007) e Rangel et al. (2010), onde o consumo variou de 23,9 a 30,3 g/Kg PC. No entanto, o consumo de FDN obtido neste experimento ficou abaixo dos valores de 12,7 e 12,4 encontrados pelos respectivos autores. O reduzido consumo relativo de FDN pode estar relacionado à baixa porcentagem de volumoso nas dietas quando comparado a outros trabalhos.

A FDN é usualmente correlacionada à capacidade de consumo dos ruminantes, tomando como base o valor de 12 g por kg de PC como nível máximo de consumo de FDN (Mertens, 1987). Entretanto, este valor não deve ser tomado com uma verdade absoluta, pois ele é um número médio e, portanto, existem valores superiores e inferiores a este nível (Detmann, 2010). Além disso, a capacidade de consumo de fibra é fortemente influenciada pela qualidade e digestibilidade da fibra, além da relação V:C e do peso do animal (Allen, 2000) .

Houve efeito ($P < 0,05$) das RPMEM sobre os consumos de PB e CNF (Tabela 3). Essas variáveis apresentaram comportamento linear inverso, ou seja, enquanto o consumo de PB aumentou com os tratamentos o de CNF diminuiu. Esse comportamento foi ocasionado pela alteração na proporção dos ingredientes da dieta, com a substituição do milho por farelo de soja.

O efeito de período (P) presente em quase todas as variáveis da Tabela 3 está relacionado ao crescimento dos animais, que por sua vez ampliou a capacidade de consumo dos mesmos.

Tabela 3 – Peso corporal médio, consumo diário e digestibilidade das dietas experimentais

	RPMEM					EPM	Valor-P			
	33	38	43	48	53		L	Q	P	T*P
PC (Kg)	282,9	285,3	269,9	288,3	285	20,654	-	-	-	-
Consumo (Kg/dia)										
MS	7,48	7,11	7,15	7,18	7,28	0,907	0,607	0,213	<0,001	0,989
PB	1,10	1,16	1,33	1,38	1,52	0,159	<0,001	0,763	<0,001	0,844
EE	0,16	0,15	0,14	0,14	0,14	0,017	<0,001	0,132	<0,001	0,988
FDNcp	2,66	2,50	2,51	2,54	2,56	0,32	0,47	0,128	<0,001	0,977
CNF	3,57	3,31	3,17	3,11	3,05	0,409	<0,001	0,189	<0,001	0,998
MOD	5,43	5,29	5,30	5,34	5,46	0,683	0,828	0,361	<0,001	0,997
EM ¹	20,08	19,64	19,88	20,10	20,63	2,552	0,414	0,391	<0,001	0,997
Consumo (g/ Kg PC)										
MS	2,65	2,49	2,65	2,49	2,56	0,322	0,43	0,657	<0,001	0,983
FDNcp	0,94	0,88	0,93	0,88	0,90	0,113	0,316	0,477	<0,001	0,973
Dap										
MS	0,73	0,75	0,75	0,75	0,76	0,01	0,052	0,368	0,364	0,808
PB	0,69	0,72	0,75	0,77	0,79	0,012	<0,001	0,466	0,896	0,742
EE	0,77	0,78	0,78	0,83	0,79	0,023	0,232	0,603	0,07	0,93
FDNcp	0,54	0,58	0,59	0,58	0,60	0,017	0,046	0,349	<0,001	0,344
CNF	0,87	0,87	0,86	0,86	0,86	0,007	0,202	0,301	<0,001	0,829

¹consumo expresso Mcal/dia; Dap = digestibilidade aparente; RPMEM = relação proteína metabolizável: energia metabolizável dietética; EPM = erro padrão da média; L = efeito linear; Q = efeito quadrático; P = efeito de período; T*P = interação período e tratamento; MS = matéria seca; PB = proteína bruta; EE = extrato etéreo; FDNcp = fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína; MOD = matéria orgânica digestível; EM = energia metabolizável.

No tocante à digestibilidade, as variáveis PB e FDN_{cp} apresentaram efeito linear ($P < 0,05$) (Tabela 3). O efeito sobre a digestibilidade da PB está relacionado à diluição da fração proteica metabólica fecal. O aumento no consumo de proteína leva a uma redução da excreção de nitrogênio metabólico e aumento na quantidade de nitrogênio indigestível nas fezes. Considerando que o nitrogênio fecal é oriundo de três fontes, dietética, microbiana e metabólica, a relação nitrogênio dietético indigestível fecal: excreção total de N aumenta, elevando a digestibilidade aparente da PB (Van Soest, 1994).

Níveis crescentes de PB também afetaram a digestibilidade da PB em trabalhos com novilhas leiteiras conduzidos por Queiroz et al. (2010) e Rangel et al. (2010). Além disso, esses autores encontraram efeitos lineares sobre a digestibilidade da FDN. O aumento da digestibilidade da fibra proporcional ao acréscimo do nitrogênio disponível no rúmen está associado à maximização do crescimento bacteriano através da maior disponibilidade de substratos. Além disso, pode ter ocorrido tamponamento do pH ruminal através da redução da concentração de amido na dieta proporcionando condições mais favoráveis ao crescimento de bactérias celulolíticas no rúmen (Nousiainen et al., 2009).

Paulino et al. (2006) propuseram teoria que relaciona a disponibilidade de nitrogênio no rúmen com o aumento do aproveitamento das frações fibrosas do alimento. A medida que eleva-se a taxa de degradação da fibra em detergente neutro potencialmente degradável (FDN_{pd}) aumenta a proporção de fibra em detergente neutro indigestível (FND_i) no rúmen, que é uma fibra de maior densidade. Com isso as partículas de FND_i tendem a deslocar para regiões mais ventrais do rúmen, aumentando a chance delas serem transportadas para fora do rúmen. Assim, haveria uma maior taxa de passagem da fibra de baixa digestibilidade e, por conseguinte, um menor tempo de repleção ruminal, aumentando por fim a capacidade de consumo do animal e o aproveitamento das frações fibrosas.

Os resultados de excreção diária de alantoína, ácido úrico (AcU), derivados de purina (DP), balanço de nitrogênio (BN), proteína bruta microbiana (PB_{mic}), eficiência microbiana (EM_{mic}) e excreção de nitrogênio na fezes (N-fecal) não foram afetados pelo tratamento ($P > 0,05$). Entretanto, houve aumento linear das variáveis excreção de nitrogênio ureico na urina (NU-urina), excreção de nitrogênio total na urina (N-urina), nitrogênio ingerido (N-ing), relação entre o nitrogênio microbiano e

o N-ing (Nmic/N-ing) e nitrogênio ureico no soro (NUS) ($P < 0,05$) de acordo com o aumento da RPMEM (Tabela 4).

Tabela 4 – Média da excreção de alantoína, ácido úrico, derivados de purina, nitrogênio ureico na urina (NU-urina), nitrogênio total na urina (N-urina), balanço de nitrogênio, proteína bruta microbiana (PBmic), eficiência microbiana (Emic) e do nitrogênio ureico no soro (NUS) obtida entre os tratamentos

Variáveis	RPMEM					EPM	Valor-P			
	33	38	43	48	53		L	Q	P	T*P
Alantoína (mmol/dia)	146,45	134,21	145,94	148,09	155,56	16,294	0,283	0,397	0,17	0,072
AcU (mmol/dia)	15,63	13,01	13,34	14,32	15,71	2,142	0,782	0,175	0,046	0,534
DP (mmol/dia)	162,08	147,22	159,27	162,41	171,27	17,860	0,296	0,311	0,109	0,148
PBmic (g/dia)	570,99	499,97	558,88	566,55	604,91	65,879	0,319	0,294	0,315	0,133
Emic (g/kg)	115,53	103,39	117,86	118,88	116,75	9,717	0,563	0,857	0,024	0,384
Nmic/N-ing	0,58	0,48	0,47	0,46	0,43	0,037	0,007	0,324	0,034	0,239
N-ing (g/dia)	163,46	176,2	197,35	205,35	227,8	25,076	<0,001	0,832	<0,001	0,471
N-fecal (g/dia)	57,92	53,13	56,44	54,93	56,05	6,956	0,855	0,582	0,136	0,876
N-urina (g/dia)	95,60	107,72	119,81	131,02	143,49	17,746	0,001	0,996	0,007	0,788
BN (g/dia)	9,94	15,35	21,84	25,69	28,26	10,077	0,152	0,828	0,089	0,27
NU-urina (g/dia)	79,53	79,65	101,33	101,20	135,17	14,735	<0,001	0,174	0,005	0,485
NUS (mg/dL)	11,68	12,11	14,03	13,36	16,12	0,780	<0,001	0,338	<0,001	0,294

RPMEM = relação proteína metabolizável: energia metabolizável dietética; EPM = erro padrão da média; L = efeito linear; Q = efeito quadrático; P = efeito de período; T*P = interação período e tratamento; AcU= excreção de ácido úrico; DP = derivados de purina; PBmic = proteína bruta microbiana; Emic = eficiência microbiana (g PB/ Kg MOD consumida); Nmic/N-ing = relação entre o nitrogênio microbiano e o nitrogênio ingerido; N-ing = nitrogênio ingerido; N-fecal = nitrogênio excretado nas fezes; N-urina = nitrogênio excretado na urina; BN = balanço de nitrogênio; NU-urina = nitrogênio ureico na urina; NUS = nitrogênio ureico no soro.

O fluxo intestinal de nitrogênio microbiano, aqui apresentado como PBmic, é influenciado pela relação entre a energia e o nitrogênio disponível no rúmen. Por exemplo, alterações na relação V:C da dieta podem influenciar o crescimento microbiano, aumentando ou diminuindo sua produção em razão da maior ou menor disponibilidade de energia (Clark, et al., 1992). Em uma compilação de dados realizada por Rennó, et al. (2000), observou-se um valor máximo de PBmic de 572,50 g/dia, resultado inferior ao maior valor obtido neste experimento, 604,91g/dia (Tabela 4), que por sua vez, foi menor que as 792,5g/dia encontradas por Leal, et al. (2007). A variabilidade dos dados de PBmic encontrados na literatura é muito ampla, tornando restrita a possibilidade da comparação dos resultados entre trabalhos, devido à dificuldade de mensurar a síntese microbiana de maneira adequada (Dewhurst, et al., 2000).

Embora exista certa dificuldade quanto a correta quantificação da síntese de PBmic, alguns pontos podem ser levantados com relação aos resultados desse experimento. O consumo de PB não teve influência sobre a PBmic, pois o aumento linear ($P < 0,05$) no consumo de PB não afetou ($P > 0,05$) a produção de PBmic. Outro fator que demonstra a ausência de efeito do consumo de PB sobre a PBmic é a relação Nmic/N-ing, pois a relação apresentou comportamento inverso ao consumo de PB, indicando que à medida que a ingestão de N aumentou menor parte foi destinada a produção de PBmic. Sendo assim, sugere-se que a PBmic tenha sido regulada por outro fator que não o consumo de PB, como por exemplo a disponibilidade de energia no rúmen, interpretada aqui através do consumo de MOD.

Dessa forma, a sincronia entre energia e proteína no rúmen foi maximizada no tratamento com menor RPMEM e, após esse nível, a energia estaria limitando a síntese de PBmic. Alguns autores também sugerem que a síntese de PBmic é maximizada quando há adequada sincronização entre proteína e energia no rúmen (Aldrich, et al., 1993, Dewhurst, et al., 2000).

A redução ($P < 0,05$) da relação Nmic/N-ing pode ser explicada pelo aumento no consumo de PB ($P < 0,05$), que aumentou o fluxo de PNDR para o intestino delgado. À medida que o animal aumenta o consumo de PB elevam-se as chances da proteína consumida passar para o trato posterior sem ser degradada no rúmen. Segundo Clark et al. (1992), quando as dietas contêm de 11 a 25% de PB, a maior proporção do aumento da passagem do nitrogênio não amoniacal para o intestino delgado resultante do maior consumo de N, foi devido ao maior escape de PB da degradação

ruminal. Logo, houve uma redução da utilização da proteína pela microbiota ruminal proporcional ao consumo de PB.

Não houve diferença ($P > 0,05$) quanto o BN e a Emic (Tabela 3). Portanto, será feito uma abordagem a respeito desses resultados em torno da média geral ($20,21 \pm 10,07$ g/dia) e ($114,5 \pm 9,71$ g de PBmic/ Kg de MOD), respectivamente.

A Emic mede o quanto de PBmic foi produzido por unidade de energia disponível (Bach et al., 2005), nesse caso denominada como MOD. Não se esperava diferenças nesta variável, uma vez que essa é obtida pela divisão da PBmic pelo consumo de MOD, que foram variáveis que também não apresentaram diferença. Os valores encontrados nesse experimento estão dentro da amplitude de valores propostos por Bach et al. (2005), porém ficaram aquém da máxima eficiência ($181,25$ g PBmic/kg MOD) de síntese microbiana sugerida por esse autores.

A ausência de efeitos para o BN é reforçada pelos dados de consumo (Tabela 3) e desempenho (Tabela 5), que também não apresentaram diferença ($P > 0,05$). Se fosse observado um aumento significativo no BN esperar-se-ia um aumento paralelo no ganho de peso, pois o animal estaria retendo maior quantidade de N no corpo. Além disso, Zanton & Heinrichs (2008) indicaram que sob uma grande amplitude de consumo de N, a retenção do N pode ser representada por uma função exponencial-platô de primeira ordem, onde o nível máximo de retenção de N seria limitado pelo nível de energia da dieta ou pelo potencial genético do animal para deposição de proteína. Dessa forma, sugere-se que a ausência de significância para o BN esteja vinculada ao teor isoenergético das dietas, que limitou a um mesmo nível o BN em todos os tratamentos. Também, o comportamento exponencial-platô pode não ter sido identificado neste experimento devido à alta concentração energética das dietas, que pode ter incluído todos os tratamentos na faixa onde o BN atinge o platô.

Entretanto, o N-ing apresentou crescimento linear ($P < 0,05$), o que poderia contradizer a explicação feita acima, uma vez que não houve efeito para excreção de N-fecal ($P > 0,05$). Assim, só haveria um modo da equação do BN se manter inalterada, parte do nitrogênio adicional teria que ter sido excretado, uma vez que este não foi retido no corpo do animal. Essa assertiva é confirmada pelo aumento linear ($P < 0,05$) das perdas de NU-urina e N-urina.

Ademais, observou-se maior ($P < 0,05$) concentração de NUS de acordo com o aumento da RPMEM. Outros autores também observaram comportamento semelhante do nitrogênio ureico plasmático (NUP) em relação ao aumento do

consumo de N (Gabler & Heinrichs, 2003). A concentração de uréia circulante na corrente sanguínea pode ser medida tanto no soro quanto no plasma (NUS ou NUP, respectivamente), ou pode ser genericamente denominada de nitrogênio ureico no sangue. A concentração do nitrogênio ureico no soro representa o balanço entre a entrada e a remoção do N-ureico, considerando volume plasmático constante. Assim, conclui-se que o aumento da RPMEM causou uma maior entrada de N no soro do que sua saída. Provavelmente este efeito está relacionado à maior disponibilidade de amônia no rúmen com o aumento do consumo de N ($P < 0,05$) (Tabela 4). No entanto, ressalta-se que mesmo no tratamento com maior nível proteico a concentração de NUS ficou abaixo do limite de 19 a 20 mg/dL que seria prejudicial à fertilidade das fêmeas (Ferguson et al., 1988; Butler et al., 1996).

De forma geral, a RPMEM não influenciou ($P > 0,05$) a quantidade de N retido no corpo do animal, mas incrementou ($P < 0,05$) a quantidade de N perdido através da urina. Pontualmente, este fato seria indesejável para os sistemas pecuários atuais, onde se busca aumentar o desempenho a um baixo custo e com o menor impacto ambiental possível. Porém, esta conclusão é limitada única e exclusivamente a este contexto, pois os objetivos estabelecidos com este estudo envolvem outros aspectos que serão abordados adiante.

As variáveis LG, CC, PT e GP não foram influenciadas pela RPMEM ($P > 0,05$) (Tabela 5). A ausência de significância no GP pode ser justificada pelo teor isoenergético das dietas, o qual limitou ao mesmo nível o desempenho das novilhas. No entanto, as novilhas apresentaram um GP ($1,23 \pm 0,10$ Kg/dia) superior ao planejado inicialmente (1 kg/dia). Justifica-se sobre tal fato que o consumo de proteína e energia foi numericamente superior ao planejado, o que proporcionou a diferença entre o desempenho predito e observado (Tabela 2).

A ausência de efeitos para as medidas de PT ($P > 0,05$) está em concordância com as equações que estimam o peso corporal a partir de medidas lineares proposta por (Heinrichs, et al., 1992), onde o maior coeficiente de correlação foi obtido com os valores de PT. Assim, pode-se inferir que o ganho de PT independe da dieta e por isso esta medida indireta prediz com maior precisão o peso corporal de novilhas.

Tabela 5 – As variáveis ganho de peso (GP), altura de cernelha (AC), altura de garupa (AG), largura de garupa (LG), comprimento corporal (CC) e perímetro torácico (PT) são apresentadas como ganhos diários

Itens	RPMEM					EPM	Valor-P	
	33	38	43	48	53		L	Q
GP (kg/dia)	1,20	1,22	1,27	1,18	1,30	0,101	0,528	0,824
AC (cm/dia)	0,09	0,11	0,12	0,11	0,09	0,016	0,757	0,042
AG (cm/dia)	0,09	0,11	0,12	0,11	0,09	0,014	0,837	0,033
LG (cm/dia)	0,13	0,13	0,15	0,13	0,13	0,005	0,81	0,068
CC (cm/dia)	0,14	0,11	0,17	0,12	0,17	0,022	0,227	0,614
PT (cm/dia)	0,21	0,23	0,25	0,22	0,22	0,021	0,645	0,333

RPMEM = relação proteína metabolizável: energia metabolizável dietética; EPM = erro padrão da média; L = efeito linear; Q = efeito quadrático; P = efeito de período; T*P = interação período e tratamento; GM = ganho de peso médio diário; AC = ganho de altura de cernelha médio diário; AG = ganho de altura de garupa médio diário; LG = ganho de largura de garupa médio diário; CC = ganho de comprimento corporal médio diário; PT = ganho de perímetro torácico médio diário.

Na Tabela 5, observa-se que houve resposta quadrática ($P < 0.05$) da RPMEM sobre os ganhos e AC e AG. Considerando que ganho de peso foi semelhante entre os tratamentos e que as novilhas submetidas à RPMEM 43 apresentaram o maior índice de crescimento de AC e AG, infere-se que as novilhas do tratamento 43 apresentaram uma estrutura corpórea mais delgada do que as novilhas do outro tratamento. No entanto, ressalta-se que além da diferença entre os tratamentos ter sido mínima não foram conduzidas avaliações indiretas do acúmulo de gordura corporal, tais como escore de condição corporal (ECC) e ultrassonografia, para auxiliar a confirmação desta inferência.

A concentração sanguínea de glicose não apresentou variação ($P > 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 6). O valor médio ($80,15 \pm 1,874$ mg/dL) obtido neste experimento está próximo dos valores (~ 75 mg/dL) e ($75,47$ mg/dL) encontrados por Lalman et al. (1993) e Sumner et al. (2007), respectivamente.

Por outro lado, houve efeito linear ($P < 0,05$) dos tratamentos sobre a concentração de IGF-1 no soro (Tabela 6). Estes resultados são similares aos obtidos por Radcliff et al. (2004) que observaram aumento na concentração de IGF-1 no soro de novilhas alimentadas com dietas com alta proteína e energia ou tratadas com bST.

O IGF-1 é um hormônio mitogênico, ou seja, age estimulando a proliferação celular (Akers, 1990; Plath-Gabler et al., 2001). O IGF-1 é produzido, principalmente, no fígado através do estímulo liberado pelo hormônio do

crescimento (GH). Contudo, o fator de crescimento semelhante à insulina 1 pode ser também produzido nos tecidos onde ele atua, o que faz deste tanto um hormônio endócrino quanto parácrino. Segundo Berry et al. (2001), há produção significativa de IGF-1 dentro da glândula mamária de novilhas em crescimento.

Existem evidências de que o IGF-1 é o mediador das ações do hormônio do crescimento (GH) dentro da glândula mamária (Berry et al., 2001; Berry, et al., 2003). Essas evidências são baseadas na presença de receptores do IGF-1 nas células do epitélio mamário (Purup et al., 1995). Porém, Plath Gabler et al. (2001) também detectaram RNAm de receptores do GH dentro de células mamárias. Apesar disso, não foi comprovado a existência de ligadores específicos do GH em tecidos mamário de bovinos. Para que o GH possa agir diretamente sobre a glândula mamária haveria, primeiro, há necessidade de locais específicos de ligação para este hormônio (Purup, et al. 2000). Sendo assim, o IGF-1 parecer ter um papel crucial no desenvolvimento da glândula mamária.

Purup et al. (2000) encontraram forte ligação ($R^2 = 0,84$) entre a concentração de IGF-1 presente no soro e o IGF-1 presente na glândula mamária. Assim, as análises de IGF-1 obtidas através do soro sanguíneo permitem avaliar com certa segurança a concentração de IGF-1 nos tecidos mamários.

Diante do exposto, infere-se que as novilhas que apresentaram a maior concentração de IGF-1 no soro estariam mais predispostas às ações mitogênicas do IGF-1 na glândula mamária. Todavia, é importante ressaltar que ação do IGF-1 é controlada pelas suas proteínas de ligação, denominadas de IGFBPs (proteínas ligadoras ao IGF-1), que poderão aumentar ou diminuir o efeito mitogênico do IGF-1, dependendo da concentração e do local onde elas se encontram (Purup et al., 2000).

As IGFBPs variam de 1 a 6 (Plath Gabler et al. 2001), sendo que 95% do IGF-1 presente no soro sanguíneo encontra-se ligado à IGFBP-3 (Clemmons, 1993). Diversos autores têm relacionado tanto efeitos estimulatórios quanto inibitórios do IGFBP-3 sobre o IGF-1 (Purup et al., 2000; Sejrnsen et al., 2000; Berry et al., 2001). No entanto, existe um consenso entre os autores supracitados que na glândula mamária o IGFBP-3 inibe o efeito mitogênico IGF-1. Por último (Berry et al., 2001), demonstraram que houve uma maior produção de IGFBP-3 na matriz adiposa da glândula mamária do que no parênquima.

Essas afirmativas subsidiam a teoria de que o excesso de deposição de gordura na glândula mamária seria prejudicial para produção de leite da vaca. Uma vez que maior quantidade de gordura na glândula mamária está ligada ao aumento da produção de IGF-1 que irá inibir a ação do IGF-1. Diante do exposto, fica claro a necessidade de mensurar o acúmulo de gordura na glândula mamária de novilhas.

Novilhas submetidas a dietas com uma relação proteína: energia inadequadas às exigências de um plano nutricional para rápido crescimento teriam maiores chances de acumular gordura na glândula mamária (Whitlock et al., 2002). De acordo com Illius & Jessop (1996), quando animais são alimentados com uma relação proteína: energia abaixo da relação adequada esses tentam compensar o desbalanço de nutrientes através do aumento do consumo que resultará no aumento da síntese de gordura devido ao excesso de consumo de energia.

Tabela 6 - Média dos valores de Log de pixel (LogP) de acordo com a região avaliada dentro da glândula mamária e concentração sérica de glicose e IGF-1

Itens	RPMEM					EPM	Valor-P			
	33	38	43	48	53		L	Q	P	T*P
Glicose (mg/dL)	77,65	79,40	82,80	81,50	80,00	1,874	0,226	0,09	0,001	0,930
IGF-1 (ng/dL)	97,60	112,34	125,72	145,84	124,13	5,423	0,013	0,104	0,354	0,482
Log P ¹										
Ductal	11,67	11,68	11,61	11,66	11,60	0,014	0,108	0,746	<0,001	0,100

¹os valores de pixel foram convertidos para o logaritmo dos valores reais de pixels; Ductal-representa a região adjacente ao crescimento dos ductos; IGF-1 = fator de crescimento semelhante a insulina 1.

Não houve efeito ($P > 0,05$) das RPMEM sobre o Log dos valores de pixel das imagens de ultrassom da glândula mamária (Tabela 6). No entanto, observou-se efeito linear do período sobre as médias de pixels na região ductal ($P < 0,05$). Este efeito pode estar associado ao crescimento dos animais, o qual provocou uma mudança na conformação da glândula mamária ao longo do tempo, alterando a proporção de gordura e parênquima da mesma (Sinha & Tucker, 1969). Dessa forma, mudanças na média de pixels ao longo do tempo são condizentes com a mudança morfológica da glândula mamária.

Mesmo não sendo constatada diferença ($P > 0,05$) nos valores de pixel nas imagens da glândula, pode-se observar uma divergência nítida na ecogenicidade das Figuras 4 e 5 apresentadas a seguir.



Figura 4 – Imagem da glândula mamária, coletada no último período, de uma novilha submetida à RPMEM 33. As setas estão indicando locais com alta reflexão das ondas do ultrassom (hiperecóticos).



Figura 5 – Imagem da glândula mamária, coletada no último período, de uma novilha submetida à RPMEM 53.

Segundo Nishimura et al. (2011), características da glândula mamária de novilhas em diferentes estágios de crescimento podem ser visualizadas através de imagens de ultrassom. Além disso, as características de glândulas mamárias afetadas

ou não com mastite têm sido descritas por Abbey (2009), Cartee et al. (1986) e Nishimura et al. (2011). Finalmente, vários trabalhos têm sido conduzidos no intuito de correlacionar gordura na carcaça de bovinos de corte com imagens obtidas através do ultrassom (Brethour, 2000; Baker et al., 2005). Pois, através da diferença na capacidade que cada tecido apresenta de refletir das ondas sonoras é possível diferenciar tecido adiposo dos outros tecidos.

Na Figura 6, é apresentado o comportamento dos valores de pixels, tomados adjacente da região do crescimento dos ductos, de acordo com os meses de avaliação.

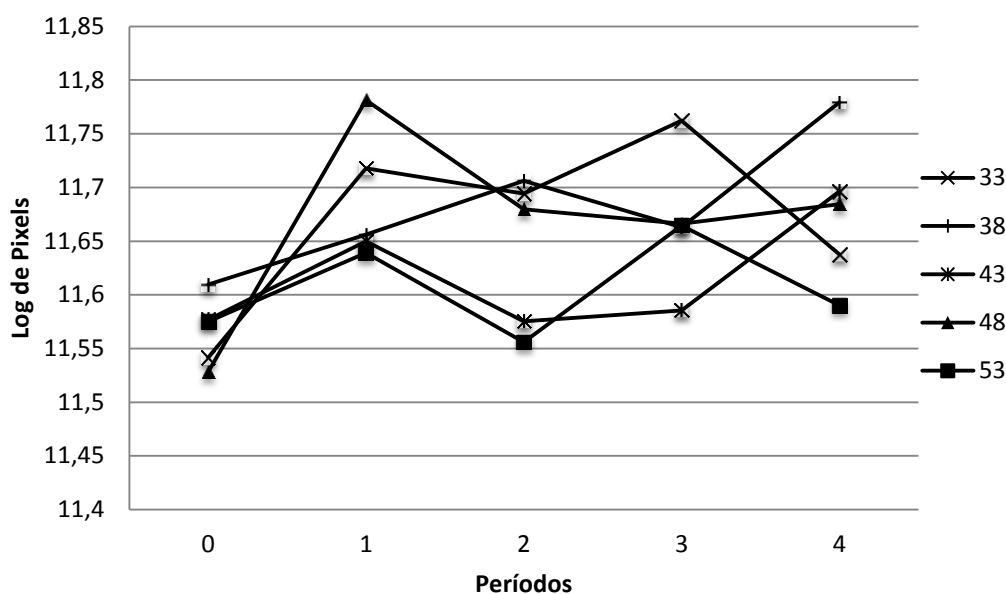


Figura 6 - Comportamento do Log dos valores de pixel da região ductal ao longo dos períodos de avaliação. Os símbolos estão representando 33 (×), 38 (+), 43 (*), 48 (▲) e 53 g de proteína metabolizável por Mcal de energia metabolizável (■).

Infere-se que imagens geradas com altos valores de pixel estão associadas a maior acúmulo de gordura na glândula mamária, devido ao maior poder de reflexão da gordura sobre as ondas do ultrassom. Portanto, pode-se observar na Figura 6 que os tratamentos não afetaram ($P > 0,05$) a deposição de gordura da glândula mamária. Esses resultados indicam que apesar ter havido diferença na RPMEM da dieta, esta por si só, não foi capaz de alterar a concentração de pixel da glândula mamária.

Estudo semelhante foi conduzido por Whitlock et al. (2002) onde se avaliou a influência das relações 37, 41 e 44 g de PM/Mcal de EM sobre o desenvolvimento da glândula mamária de novilhas submetidas a dietas para alto ganho de peso. Da mesma forma, não foi observado efeito dos tratamentos sobre o desenvolvimento da

glândula. No entanto, os autores ressaltaram que dietas com baixo teor proteico seriam prejudiciais para novilhas que alcançassem a puberdade precocemente.

Há duas possíveis explicações para esses resultados. A primeira hipótese baseia-se na sincronia entre proteína e energia observada neste trabalho (Tabela 4). A partir da RPMEM 33, a qual apresentou uma relação de 36,6 g de PM por Mcal de EM (Tabela 2) ao final do experimento, não houve diferença ($P > 0,05$) no aproveitamento da proteína ingerida. Dessa forma, o conteúdo isoenergético das dietas pode ter atuado como fator limitante para o maior aproveitamento da proteína ingerida, que por sua vez foi excretada em maior quantidade para o ambiente à medida que se elevou a concentração de proteína das dietas. De acordo com VandeHaar (1997) e Withlock et al. (2002) alterações na relação entre proteína e energia seriam responsáveis por grandes diferenças na deposição de tecidos na glândula. Contrariamente, os resultados de pixels obtidos nesse experimento (Tabela 6) demonstram que a RPMEM não foi capaz de afetar a deposição de gordura na glândula mamária ($P > 0,05$).

A segunda teoria foi apresentada por Meyer et al., (2006), onde estes autores sugeriram que a RPMEM não teria efeito sobre a deposição de tecidos da glândula mamária. Por outro lado, seria a idade à puberdade o principal fator determinante do desenvolvimento da glândula mamária. Dessa forma, a novilha que atingisse a puberdade muito cedo teria menor tempo para o desenvolvimento da sua glândula mamária e, portanto teria menor número de células secretoras de leite, independente da dieta que fosse utilizada.

É importante ressaltar que a variabilidade da idade dos animais usados neste experimento pode ter afetado significativamente o resultado das imagens da glândula mamária. Isto porque, boa parte das novilhas atingiram a puberdade no decorrer do experimento e a puberdade é indicada por vários autores como momento em que ocorre uma paralisação do crescimento alométrico da glândula mamária (Sejrsen, et al., 1982). Logo, os efeitos das RPMEM seriam menos pronunciados nesses animais.

Dessa forma, sugere-se que trabalhos utilizando novilhas mais novas e mais semelhantes em tamanho e idade sejam conduzidos para validar a técnica de avaliação de glândula mamária com o uso da ultrassonografia.

IMPLICAÇÕES

Os pixels das imagens de ultrassom da glândula mamária não foram influenciados pela RPMEM. Dessa forma, o incremento da concentração de proteína na dieta de novilhas na fase pré-púbere acima da RPMEM 33 que refere-se a uma relação 36,6, não traz nenhum benefício para o animal. Uma vez que não houve diferença no desempenho, mas houve uma maior perda de nitrogênio para o ambiente à medida que a RPMEM aumentou.

Contudo, ressalta-se que houve um aumento linear da concentração sérica de IGF-1 de acordo com o aumento da RPMEM. O IGF-I é um hormônio mitogênico relacionado ao desenvolvimento da glândula mamária e, portanto, maior nível de IGF-I no sangue pode estar associado a um maior efeito mitogênico na glândula. Entretanto, mais pesquisas precisam ser conduzidas para confirmar essa teoria.

REFERÊNCIAS

- Abbey, M.S. 2009. Mammary gland: ultrasound. p. 516- 519. In: Blackwell's Five-minute Veterinary Consult: Ruminant (Haskell, S. R ed.), Blackwell, Iowa.
- Akers RM. Lactation physiology: a ruminant animal perspective. *Protoplasma* 1990;159:96–111.
- ALDRICH, J. M.; MULLER, L. D.; VARGA, G. A., et al. Nonstructural carbohydrate and protein effects on rumen fermentation, nutrient flow, and performance of dairy cows. **J. Dairy Sci**, v.76, n.4, p.1091-1105, 1993.
- BAKER, M. J.; TEDESCHI, L. O.; FOX, D. G., et al. Using ultrasound measurements to determine body composition of yearling bulls. In: American Society of Animal Science, 83.2005, Cincinnati, OH. **Anais**. Cincinnati, OH:ASAS, 2005. p.114-115.
- BERRY, S. D.; MCFADDEN, T. B.; PEARSON, R. E., et al. A local increase in the mammary IGF-1: IGFBP-3 ratio mediates the mammary effects of estrogen and growth hormone. **Domestic Animal Endocrinology**, v.21, n.1, p.39-53, 2001.
- BERRY, S.; HOWARD, R.; JOBST, P., et al. Interactions between the ovary and the local IGF-I axis modulate mammary development in prepubertal heifers. **J. Endocrinol.**, v.177, n.2, p.295-304, 2003.
- Brethour, J. R. 1990. Relationship of ultrasound speckle to marbling score in cattle. **J. Anim. Sci.** 68:2603–2613.
- Brethour, J. R. 1991. Estimating quality grade in cattle with ultrasound. **Kansas Agric. Exp. Stn., Prog. Rep. No.627**, Manhattan.
- BRETHOUR, J. R. Using serial ultrasound measures to generate models of marbling and backfat thickness changes in feedlot cattle. **J. Anim. Sci**, v.78, n.8, p.2055-2061, 2000.
- Butler, W. R., J. J. Calaman, and S. W. Beam. 1996. Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle. **J. Anim. Sci.** 74:858–865.
- CAPUCO, A. V.; SMITH, J. J.; WALDO, D. R., et al. Influence of Prepubertal Dietary Regimen on Mammary Growth of Holstein Heifers. **J. Dairy Sci**, v.78, n.12, p.2709-2725, 1995.
- Cartee, R. E.; Ibrahim, A.K.; McLeary, D. 1986. B-mode ultrasonography of bovine udder and teat. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 188: 1284 - 1287.
- CARVALHO, A. Ú.; VALADARES FILHO, S. C.; COELHO DA SILVA, J. F., et al. Concentrate levels in diets of zebu cattle. 3. Microbial efficiency and ruminal protozoa population. **R. Bras. Zootec.**, v.26, n.5, p.1007-1015, 1997.
- Carvalho, A.U., Valadares filho, S.C., Coelho da silva, J. F. et al. 1997b. Níveis de concentrado em dietas de zebuínos. 3. Eficiência microbiana e população de protozoários ruminais. **R. Bras. Zootec.**, 26(5):1006-1016.
- CHEN, X. B.; GOMES, M. J. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives - an overview of the technical details. Bucksburnd Aberdeen:Rowett Research Institute, 1992. 21p.
- Chizzotti, M. L.; Valadares Filho, S. C.; Valadares, R. F. D.; Chizzotti, F. H. M.; Campos, J. M. S.; Marcondes, M. I.; Fonseca, M.A. Consumo, digestibilidade e excreção de uréia e derivados de purinas em novilhas de diferentes pesos. **R. Bras. Zootec.**, v.35, n.4, p.1813-1821, 2006.
- CHIZZOTTI, M. L.; VALADARES FILHO, S. D. C.; VALADARES, R. F. D., et al. Determination of creatinine excretion and evaluation of spot urine sampling in Holstein cattle. **Livestock Science**, v.113, n.2-3, p.218-225, 2008.

- CLARK, J. H.; KLUSMEYER, T. H.; CAMERON, M. R. Microbial protein synthesis and flow of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. **J. Dairy Sci**, v.75, p.2304-2323, 1992.
- CLARK, J. H.; KLUSMEYER, T. H.; CAMERON, M. R. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. In: Proceedings of Ralston Purina International Scientific Advisory Board, 1991, Paris, France. **Anais**. Paris, France:1991. p.59 p.
- Clemmons DR. IGF binding proteins, and their functions. **Molecular Reproduction and Development** 1993;35:368–75.
- Detmann, E. Fibra na nutrição de novilhas leiteiras. In: **Novilhas Leiteiras**, 2010.
- DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S. C. On the estimation of non-fibrous carbohydrates in feeds and diets. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v.62, p.980-984, 2010.
- DEWHURST, R. J.; DAVIES, D. R.; MERRY, R. J. Microbial protein supply from the rumen. **Animal Feed Science and Technology**, v.85, n.1/2, p.1-21, 2000.
- Dias, H. L. C.; Valadares Filho, S. C.; Silva, J. F. C.; Paulino, M. F.; Cecon, P. R.; Valadares, R. F. D.; Renno, L. N.; Costa, M. A. L. Eficiência de Síntese Microbiana, pH e Concentrações Ruminais de Amônia em Novilhos F1 Limousin x Nelore Alimentados com Dietas Contendo Cinco Níveis de Concentrado. **R. Bras. Zootec.**, 29 (2):555-563, 2000.
- Dobos, R. C.; Nandra, K. S.; Riley, K.; Fulkerson, W. J.; Lean, I. J.; Kellaway, R.C. The effect of dietary protein level during the pre-pubertal period of growth on mammary gland development and subsequent milk production in Friesian heifers. **Live. Prod. Sci.**, 63, 2000, p. 235 - 243.
- Ferguson, J. D., T. Blanchard, D. T. Galligan, D. C. Hoshall, and W. Chalupa. 1988. Infertility in dairy cattle fed a high percentage of protein degradable in the rumen. **JAVMA** 192: 659–662.
- GABLER, M. T.; HEINRICHS, A. J. Dietary Protein to Metabolizable Energy Ratios on Feed Efficiency and Structural Growth of Prepubertal Holstein Heifers I. **J. Dairy Sci**, v.86, n.1, p.268-274, 2003.
- HEINRICHS, A. J.; ROGERS, G. W.; COOPER, J. B. Predicting Body Weight and Withers Height in Holstein Heifers Using Body Measurements. **J. Dairy Sci**, v.75, n.12, p.3576-3581, 1992.
- Hovey, R. C.; McFadden, T. B.; Akers, R. M. Regulation of mammary gland growth and morphogenesis by the mammary fat pad: A species comparison. **Journal on Mammary Gland Biology and Neoplasia**, Vol. 4, No. 1, 1999.
- Illius, A. W.; Jessop, N.S. Metabolic Constraints on voluntary intake in ruminants. **J. Anim. Sci.** 1996. 74: 3052-3062.
- KERSCHER, L., AND J. ZIEGENHORN. 1985. Urea. Pages 444–453 in *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd ed., Volume 8. H. U. Bergmeyer, ed. VCH, Deerfield Beach, FL.
- KRIZSAN, S. J.; AHVENJÄRVI, S.; HUHTANEN, P. A meta-analysis of passage rate estimated by rumen evacuation with cattle and evaluation of passage rate prediction models. **J. Dairy Sci**, v.93, n.12, p.5890-5901, 2010.
- LALMAN, D. L.; PETERSEN, M. K.; ANSOTEGUI, R. P., et al. The effects of ruminally undegradable protein, propionic acid, and monensin on puberty and pregnancy in beef heifers. **J. Anim. Sci**, v.71, n.11, p.2843-2852, 1993.
- LEAL, T. L.; VALADARES, R. F. D.; VALADARES FILHO, S. C., et al. Variações diárias nas excreções de creatinina e derivados de purinas em novilhas. **R. Bras. Zootec.**, v.36, n.4, p.905-911, 2007.

- Liu, J.L.; Yakar, S.; LeRoith, D. 2000. Conditional knockout of mouse insulin-like growth factor-1 gene using the Cre/loxP system. **PNAS** 223 344–351.
- MERTENS, D. R. Predicting intake and digestibility using mathematical models of ruminal function. **J. Anim. Sci**, v.64, p.1548-1558, 1987.
- MEYER, M. J.; CAPUCO, A. V.; ROSS, D. A., et al. Developmental and Nutritional Regulation of the Prepubertal Heifer Mammary Gland: I. Parenchyma and Fat Pad Mass and Composition. **J. Dairy Sci**, v.89, n.11, p.4289-4297, 2006.
- Moreira, M. V. C.; Custo de criação de novilhas na região da zona da mata mineira.2012. 28p. **Dissertação de Mestrado**- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.
- NISHIMURA, M.; YOSHIDA, T.; EL-KHODERY, S., et al. Ultrasound Imaging of Mammary Glands in Dairy Heifers at Different Stages of Growth. **J. Vet. Med. Sci.**, v.73, n.1, p.19-24, 2011.
- Oliveira, A. S.; Detmann, E.; Campos, J. M. S.; Pina, D. S.; Souza, S. M.; Costa, M. G. Meta-análise do impacto da fibra em detergente neutro sobre o consumo, a digestibilidade e o desempenho de vacas leiteiras em lactação. **R. Rras. Zootec.**, V.40, n.7, p. 1587-1595,2011.
- Paulino, M. F.; Detmann, E.; Valadares Filho, S. C. Suplementação animal em pasto: energética ou proteica? In: Simpósio sobre manejo estratégico da pastagem, 3., 2006, **Anais...** Viçosa: DZO-UFV,2006. p. 359.
- PLATH-GABLER, A.; GABLER, C.; SINOWATZ, F., et al. The expression of the IGF family and GH receptor in the bovine mammary gland. **J. Endocrinol.**, v.168, n.1, p.39-48, 2001.
- PURUP S, SEJRSEN K, AKERS RM. Effect of bovine GH and ovariectomy on mammary tissue sensitivity to IGF-I in prepubertal heifers. **J. Endocrinol.** 1995;144:153.
- PURUP, S.; VESTERGAARD, M.; WEBER, M. S., et al. Local regulation of pubertal mammary growth in heifers. **J. Anim. Sci**, v.78, n.suppl 3, p.36-47, 2000.
- RADCLIFF, R. P.; VANDEHAAR, M. J.; CHAPIN, L. T., et al. Effects of Diet and Injection of Bovine Somatotropin on Prepubertal Growth and First-Lactation Milk Yields of Holstein Cows1. **J. Dairy Sci**, v.83, n.1, p.23-29, 2000.
- Radcliff, R.P.; VandeHaar, M. J.; Kobayashi, Y.; Sharma, B. K. Effect of dietary energy and somatotropin on components of the somatotropic axis in holstein heifers. **J. Dairy. Sci.** 87: 1229-1235.
- Rangel, A. H. N.; Campos, J. M. S.; Oliveira, A. S.; Valadares Filho, S. C.; Assis, A. J.; Souza, S. M. Desempenho e parâmetros nutricionais de fêmeas leiteiras em crescimento alimentadas com silagem de milho ou cana-de-açúcar com concentrado. **R. Rras. Zootec.**, V.39, n.11, p. 2518-2526,2010.
- Rennó, L. N.; Valadares, R. F. D.; Leão, M. I.; Valadares Filho, S. C.; Silva, J. F. C.; Cecon, P. R., Dias, H. L. C.; Costa, M. A. L.; Oliveira, R. V. Estimativa da produção de proteína microbiana pelos derivados de purinas na urina em novilhos. **R. Bras. Zootec.**, 29(4):1223-1234, 2000.
- Ruan W, Catanese V, Wieczorek R, Feldman M & Kleinberg DL 1995 Estradiol enhances the stimulatory effect of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on mammary development and growth hormone-induced IGF-I messenger ribonucleic acid. **Endocrinology** 136. 1296–1302.
- SEJRSEN, K.; HUBER, J. T.; TUCKER, H. A., et al. Influence of Nutrition on Mammary Development in Pre- and Postpubertal Heifers1. **J. Dairy Sci**, v.65, n.5, p.793-800, 1982.

- SEJRSEN, K.; PURUP, S. Influence of prepubertal feeding level on milk yield potential of dairy heifers: a review. **J. Anim. Sci**, v.75, n.3, p.828-835, 1997.
- SEJRSEN, K.; PURUP, S.; VESTERGAARD, M., et al. High body weight gain and reduced bovine mammary growth: physiological basis and implications for milk yield potential. **Domestic Animal Endocrinology**, v.19, n.2, p.93-104, 2000.
- SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3.ed. Viçosa, MG:Editora UFV, 2002. 235p.
- SINHA, Y. N.; TUCKER, H. A. Mammary Development and Pituitary Prolactin Level of Heifers from Birth through Puberty and during the Estrous Cycle1. **J. Dairy Sci**, v.52, n.4, p.507-512, 1969.
- SUMNER, J. M.; VALDEZ, F.; MCNAMARA, J. P. Effects of Chromium Propionate on Response to an Intravenous Glucose Tolerance Test in Growing Holstein Heifers1. **J. Dairy Sci**, v.90, n.7, p.3467-3474, 2007.
- Valadares Filho, S. C.; Oliveira, A. S. Compostos nitrogenados na alimentação de novilhas leiteiras. In: **Novilhas Leiteiras**, 2010.
- VAN SOEST, P. J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. 2nd.ed. Ithaca, NY:Comstock Publishing Associates, 1994. 476p.
- VandeHaar, M. L. J. 1997. Dietary protein and mammary development of heifers: Analysis from literature data. *J. Dairy Sci.* 80(Suppl.1):216. (Abstr.)
- VERBIC, J.; CHEN, X. B.; MACLEOD, N. A., et al. Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. **The Journal of Agricultural Science**, v.114, n.03, p.243-248, 1990.
- WHITLOCK, B. K.; VANDEHAAR, M. J.; SILVA, L. F. P., et al. Effect of Dietary Protein on Prepubertal Mammary Development in Rapidly Growing Dairy Heifers1. **J. Dairy Sci.**, v.85, n.6, p.1516-1525, 2002.
- WILLIAMS, A. R. Ultrasound applications in beef cattle carcass research and management. **J. Anim. Sci.**, v.80, n.2, p.E183-E185, 2002.
- Zanton, G. I., and A. J. Heinrichs. 2008. Analysis of nitrogen utilization and excretion in growing dairy cattle. **J. Dairy Sci.**91:1519-1533.