

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia

Nélio Cunha Gonçalves

**EXPRESSÃO *IN VIVO* DE GENES RELACIONADOS AO METABOLISMO
LIPÍDICO EM FÍGADO BOVINO INDUZIDA POR ÁCIDOS GRAXOS COMO
AGONISTAS DO PPAR-A: nutrigenômica aplicada à bovinocultura leiteira**

Belo Horizonte
2025

Nélio Cunha Gonçalves

**EXPRESSÃO *IN VIVO* DE GENES RELACIONADOS AO METABOLISMO
LIPÍDICO EM FÍGADO BOVINO INDUZIDA POR ÁCIDOS GRAXOS COMO
AGONISTAS DO PPAR-A: nutrigenômica aplicada à bovinocultura leiteira**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Mara Macedo

Belo Horizonte

2025

Gonçalves, Nélío Cunha.
Expressão in vivo de genes relacionados ao metabolismo lipídico em fígado
043 bovino induzida por ácidos graxos como agonistas do PPAR- α : nutrigenômica
aplicada à bovinocultura leiteira [manuscrito] / Nélío Cunha Gonçalves. – 2025. 167
f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Mara Macedo.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Nutrigenômica. 3. Bovinos. 4. Gorduras
Insaturadas na Dieta. 5. Fígado Gorduroso. 6. PPAR alfa. 7. Microbiota. I.
Macedo, Andréa Mara. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de
Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
31270-901 – Belo Horizonte – MG
e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE NELIO CUNHA GONCALVES. Aos dezenove dias do mês de março de 2025 às 14:00 horas, reuniu-se de forma “on line” utilizando a plataforma “Zoom”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “Expressão in vivo de genes relacionados ao metabolismo lipídico em fígado bovino induzida por ácidos graxos como agonistas do PPAR- α : nutrigenômica aplicada a bovinocultura leiteira”, requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof. Andréa Mara Macedo, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito (Instituto René Rachou), aprovado; Dra. Maria Angélica Miglino (Universidade de Marília), aprovado; Dr. Antônio Último de Carvalho (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Erich Birelli Tahara (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Andréa Mara Macedo - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado:

(X) APROVADO
() REPROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 19 de março de 2025.

Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito (Fiocruz-MG)

Documento assinado digitalmente
gov.br CRISTIANA FERREIRA ALVES DE BRITO
Data: 01/04/2025 17:00:24-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Maria Angélica Miglino (Unimar)

Documento assinado digitalmente
gov.br MARIA ANGELICA MIGLINO
Data: 08/04/2025 10:57:26-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Antônio Último de Carvalho (UFMG)

Documento assinado digitalmente
gov.br ANTONIO ULTIMO DE CARVALHO
Data: 04/04/2025 09:09:49-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Erich Birelli Tahara (UFMG)

Documento assinado digitalmente
gov.br ERICH BIRELLI TAHARA
Data: 02/04/2025 14:59:31-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Andréa Mara Macedo - Orientadora (UFMG)

Documento assinado digitalmente
gov.br ANDREA MARA MACEDO
Data: 29/03/2025 19:13:11-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

À Letícia, nossa alegria

AGRADECIMENTOS

Tanto tempo para chegar até aqui. Tantos acontecimentos. Tanto a agradecer. Começo por agradecer a você, leitor desta tese, por prestigiar esse que, sem dúvidas, foi o meu maior desafio acadêmico até agora. Eu, a voz a narrar uma enormidade de dados e discussões aqui apresentadas, sou apenas um humano como você, cheio de limitações e cheio de talentos. Repleto de sonhos, de medos e de coragem. Um Médico Veterinário torto. Um Mestre em Zootecnia torto. Um aspirante torto a Doutor em Bioquímica. Quando escrevo “torto” tenho em mente um sentido de “pouco convencional”, pois, para além do fazer profissional de cada uma dessas áreas, o aprender e o ensinar sobre elas sempre foi o que mais me encantou. Mas essa é outra história.

Desde a publicação do resultado do processo seletivo do Doutorado pelo Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia da UFMG, em junho de 2019, até este momento, posso dizer que minha vida passou por diversas e profundas transformações. Numerosos aprendizados, numerosos desafios, tanto na vida acadêmica, como na vida profissional e pessoal. Sobrevivemos a uma pandemia. Um caminho árduo, porém, possível, especialmente pelas incríveis companhias que tive ao longo do trajeto. A jornada se encerra e uma frase ecoa em minha mente: “valeu a pena”.

Como alguém que crê, não posso deixar de agradecer à divindade maior que nos cerca. Presença que sinto a todo momento e que certamente esteve por trás de cada decisão. Por trás de cada encontro e de cada desencontro. Por trás de cada palavra dita e não dita. Agradeço àquilo que faz com que o delineamento das nossas vidas em nada seja inteiramente casualizado.

Agradeço ao governo brasileiro, suas políticas para o ensino e suas agências de fomento à pesquisa, as quais me permitiram sempre estudar em escolas públicas, desde a mais tenra infância até agora. Espero que esse meu exemplo, um entre tantos outros, de alguém que conquistou seus conhecimentos e sua profissionalização por meio de políticas de estado, sirva de reflexão ao leitor que porventura tenha os olhos desatentos, que se veja tentado a acreditar na narrativa neoliberal.

Reafirmo, não há futuro, não há sustentabilidade a uma nação que privilegie o estado mínimo, que privilegie a entrega nas mãos do capital, nas mãos da iniciativa privada, até mesmo daqueles que são os deveres básicos do estado em um regime democrático, ou seja, a saúde, a segurança e a educação.

Impossível deixar de agradecer também à família, companhia constante e essencial para a concretização deste projeto.

Agradeço à minha filha, Letícia Sampaio Salomão Cunha Gonçalves, sem dúvida minha maior dádiva, que cresce e se transforma a olhos vistos. Antes um bebê de três anos de idade, agora uma criança de oito. Amável, amorosa, linda e radiante como sempre foi.

Agradeço à minha mãe, Maria das Graças Cunha Gonçalves. São exemplos muito fortes para mim suas histórias de vida e de luta para estudar e aprender. Sua biografia de transformação social, a partir do esforço e da educação, é admirável. Mulher, afrodescendente, nascida em 1947 na área rural de um pequeno distrito no interior de Minas Gerais, cresceu cercada de amor, mas desprovida, muitas vezes, do mínimo para uma vida digna. Lutou ferozmente e conseguiu, na década de 1970, em meio a ditadura militar, alcançar o nível superior e graduar-se em Serviço Social. Sempre pensei que, se ela, com todas as limitações, chegou nesse nível de escolaridade, eu, num cenário muito mais favorável, tinha a obrigação de chegar até aqui. Tinha que, ao menos, pleitear o título de Doutor.

Agradeço ao meu pai, Nélcio Moreira Gonçalves. Homem pelo qual, assim como pela minha mãe, tenho grande admiração. Com uma história de vida bem parecida com a dela, também muito se esforçou para sair de condições desprivilegiadas e alcançar vida digna. Ele e minha mãe se casaram em 1975 e, como raramente ocorre, seguem juntos e felizes. É lindo de se ver e, ainda mais, de fazer parte como filho. Eles são o meu maior refúgio e me acompanharam de perto em cada queda e em cada vitória.

Pai e mãe, a vocês gratidão eterna.

Senhor Nélcio e Dona Graça deixam um legado de quatro filhos. O primogênito, Luiz Fernando Cunha Gonçalves, os gêmeos Rafael e Rogério Cunha Gonçalves e eu, o caçula. Não posso deixar de agradecer aos meus irmãos. Tive a benção de ter pais amorosos e presentes que me deram irmãos no sentido mais profundo da palavra. Não são apenas pessoas que dividem genes comigo, somos uma rede de apoio mútuo a qual sou muito grato.

A minha família, tanto por parte de mãe como por parte de pai, é gigante e espalhada pelos quatro cantos desse país, e até no exterior. Tenho 123 primos de primeiro grau, sem contar cônjuges. Então, é impossível agradecê-los individualmente. Por isso agradeço a todos, especialmente à minha amada tia Dorvalina Maria de Paula, carinhosamente chamada de tia

Ina, quem veio a falecer, aos 94 anos de idade, em 2023. Sempre fomos muito próximos e, juntamente com meus pais, dedicou a mim muitas de suas orações e preces. Tia Ina nunca se casou e sempre morou conosco. Seu desejo de se tornar freira não pôde se concretizar, por conta das muitas limitações físicas oriundas de problemas ósseos e articulares. É outro exemplo de pessoa e de viver que muito me influenciou positivamente. Deixo aqui esse registro, para que sua figura, tão amorosa e gentil, nunca seja esquecida.

No grande arsenal de primos, uma, muito especial, se destaca: MSc. Tânia Daniele Vieira Neto. A você minha prima e madrinha, o meu mais sincero agradecimento, pelos momentos de partilha, pela companhia nas horas difíceis, pelo apoio e orações. Seus exemplos de vida, de superação e de prática docente, muito me inspiraram.

Para além dos amigos do peito que fiz durante esses anos de Doutorado, muitos dos quais estarão aqui referenciados por terem participado diretamente da pesquisa, agradeço aos meus amigos companheiros de vida pessoal. Um agradecimento especial à querida Mariana Cartaxo Bastos Barreto e ao querido Dennys Batista Serafim. Por ambos guardo grande carinho e admiração. Obrigado por tudo. Mariana, especialmente pelas horas e horas de conversas e *insights* fenomenais, catalisadores incríveis do meu desenvolvimento pessoal. Dennys, especialmente por trazer a arte e sua sensibilidade para o meu cotidiano, para próximo de mim, novamente. O som do seu violino entra em ressonância com o som do meu piano e da minha voz. Seus talentos completam a existência das minhas composições, com seus arranjos e suas belíssimas orquestrações. O álbum em gestação, “Notas Sobre Cordas”, muito em breve irá nascer para o mundo, para deleite especialmente nosso, os dois pais desse neonato.

Agora é momento de agradecer a uma daquelas pessoas que, impossivelmente pelo acaso, aparecem em nossas vidas e, como em um ato de magia, a transformam. Me refiro à minha orientadora neste doutorado, Dra. Andréa Mara Macedo, professora titular do Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG. Sem medo de parecer bajulador, afirmo, do fundo do meu coração: é realmente difícil encontrar os substantivos e adjetivos adequados para descrevê-la e agradecê-la.

Sou um homem de 40 anos de idade, sou pai, fui professor no ensino superior por 10 anos. Dito isso, era tentadora a ideia de um sentimento de amadurecimento. Entretanto, conhecer Profa. Andréa e trabalhar ao lado dela, faz cair por terra qualquer senso de finitude

em termos de aprendizado. Aprendo com ela o tempo inteiro, e o melhor, não apenas sobre Bioquímica, mas também sobre a vida e o viver.

Profa. Dra. Andréa Mara Macedo se formou em Ciências Biológicas em 1985, quando eu tinha apenas 1 ano de idade. Possui um currículo, um histórico profissional e pessoal absolutamente admiráveis. É exemplo de pesquisadora, exemplo de professora, exemplo de pessoa. Me conhece muito bem. Sabe das minhas fortalezas e fragilidades. Conseguiu, ao longo desses anos, uma combinação perfeita de delicadeza e firmeza, leveza e austeridade, algo que, em meu ver, é típico das mães por excelência. Sou, e sempre serei, seu maior fã. A ela toda paz, toda felicidade e saúde. A palavra gratidão, que passei a usar por influência dela, é a que melhor expressa o que sinto.

Sou igualmente grato ao Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo, professor titular do Departamento de Genética, Ecologia e Evolução da UFMG, e à residente pós-doutoral do Laboratório de Genética Celular e Molecular da UFMG, Dra. Juliana Guimarães Laguna. Agradeço também aos professores do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da UFMG, Dr. Tiago Facury Moreira e Dr. Rodrigo Melo Meneses, ao professor do Departamento de Estatística e Informática da UFRPE, Dr. Guilherme Rocha Moreira, e à professora do Departamento de Zootecnia da UFMG, Dra. Eloísa de Oliveira Simões Saliba, minha querida orientadora nos anos de iniciação científica e no Mestrado e que continua a me auxiliar.

Essas incríveis pessoas, esses profissionais de excelência, fizeram parte do núcleo mais próximo de planejamento, execução dos experimentos e aconselhamentos. Contribuíram sobremaneira, assim como a orientadora da pesquisa, tanto de forma técnica, como humanística, e na aquisição de recursos e insumos, que tornaram a presente pesquisa possível. Cada um contribuiu de uma forma única e especial, dentro de suas áreas de atuação, desde o início, da concepção de ideias, dos delineamentos experimentais, até a organização final dos três resumos, publicados na reunião anual de 2022 da *American Dairy Science Association*, e do artigo completo submetido ao periódico *Livestock Science*.

Não posso deixar de ressaltar o maravilhoso encontro improvável que foi conhecer uma dessas pessoas. Me refiro a minha grande amiga e exímia pesquisadora, Dra. Juliana Guimarães Laguna. Uma de suas excelentes publicações me foi sugerida pelos algoritmos de pesquisa, bem no início da escrita do projeto. Você, leitor, encontrará a referência Laguna et al. (2017) em vários trechos da tese, tamanha sua relevância. Quando li esse artigo pela primeira vez, me

encantei com a qualidade da pesquisa e dos achados. Posteriormente, fui procurar saber mais sobre autora e, para minha surpresa, os dados daquele artigo eram parte de sua tese de Doutorado defendida no mesmo programa de pós-graduação em que eu cursei meu Mestrado, o programa de Pós-graduação em Zootecnia da UFMG, na Escola de Veterinária. Éramos colegas de pós, mas não chegamos a nos conhecer naquela época. Logo, entrei em contato com o orientador do Doutorado dela, Prof. Dr. Helton Mattana Saturnino, quem também foi meu professor e que, para minha felicidade, me informou o número de telefone da Dra. Juliana. Mal sabia o quanto essa pessoa, que à época estava nos Estados Unidos e hoje vive na França, seria importante para o presente trabalho. Sempre muito gentil, solícita e experiente, contribuiu imensamente, desde as etapas mais simples, como peregrinar comigo pelos corredores do ICB atrás desse equipamento e daquele reagente, até à execução de complexas etapas, como a extração de ácidos nucléicos do tecido hepático. A você Juliana um enorme *Danke Schön*. Seus anos de retorno ao Brasil foram uma benção para mim, pois tive a oportunidade e a honra de ter você ao meu lado nessa desafiadora jornada. Muitas felicidades e muito sucesso em sua jornada que já é espetacular. Continue a voar pelo mundo e a elevar a qualidade das pesquisas por onde passa.

Agradeço aos membros da banca de qualificação, Dr. Erich Birelli Tahara, Dra. Jacqueline Isaura Alvarez Leite, ambos professores do Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG, e Dr. Antônio Último de Carvalho, professor do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da UFMG. Foram muito valiosas as discussões por eles promovidas, as quais certamente contribuíram para a qualidade final do presente trabalho.

Agradeço a toda equipe que contribuiu durante a exaustiva fase de campo dos experimentos: Dr. Geraldo Sérgio Senra Carneiro Barbosa e Dr. Clarindo Inácio de Aparecida Queiroz, estimados professores do Instituto de Ciências Agrárias da UFV, *campus* Florestal, e aos demais participantes, Faber Kanigan Maciel Naddeo, Letícia Carla Silveira Souza e Yara da Costa Guedes. Aos demais funcionários do setor de bovinocultura de leite da UFV, *campus* Florestal, também deixo o meu muito obrigado.

Dois importantíssimos auxiliares, os quais atuaram principalmente na fase de campo da pesquisa, foram ex-alunos meus do curso de Medicina Veterinária da Escola Superior São Francisco de Assis (ESFA), em Santa Teresa (ES). São eles: Paulo Henrique Puphal Küster e Gabriela Ponath Peruzzo. Sou imensamente grato e orgulhoso desses pupilos, os quais prosperaram e hoje se destacam como profissionais de excelência. Paulo Henrique já concluiu

sua residência em Patologia Clínica Veterinária pela UFMG e Gabriela já concluiu seu mestrado em Ciências Veterinárias pela UFES. Gratidão a vocês dois e sucesso em suas vidas, sempre.

Agradeço à Dra. Fabíola de Oliveira Paes Leme e Dr. Paulo Ricardo de Oliveira Paes, ambos professores do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da UFMG, pela contribuição nas análises de bioquímica clínica.

Agradeço ao Dr. Leandro Abreu da Fonseca, do Departamento de Veterinária da UFV, *campus* Viçosa, e ao pesquisador MSc. Lucas Drumond Bento, pela viabilização das análises das proteínas de fase aguda.

Especial agradecimento ao Dr. Tales Fernando da Silva, residente pós-doutoral no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Fisiologia e Farmacologia da UFMG, e à Dra. Flávia Figueira Aburjaile, professora do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFMG, pela realização das análises de bioinformática e auxílio na obtenção dos resultados dos dados de metagenômica ruminal e fecal. Tais análises foram viabilizadas por cooperação da Rede MIN.AS Microbiomas, a qual sou igualmente grato.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Genética Bioquímica (LGB), do Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG, especialmente aos pesquisadores Dr. Bruno Carvalho Resende, Dra. Daniela de Laet Souza e Dra. Verônica Santana da Silva. Agradeço também à Dra. Glória Regina Franco e ao Dr. Carlos Renato Machado, ambos professores os quais, juntamente com minha orientadora, coordenam as atividades do referido laboratório.

Sou muito grato também aos membros da Comissão de Acompanhamento Discente do Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia da UFMG: Dra. Mariana Torquato Quezado de Magalhães, Dr. Flávio Almeida Amaral e Dr. Jader dos Santos Cruz. Sou igualmente grato a então coordenadora do programa, Dra. Leda Quercia Vieira e às atuais coordenadora e subcoordenadora, Dra. Fabíola Mara Ribeiro e Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira, respectivamente. Precisei muito contar com o auxílio e compreensão de toda essa equipe de gestores, devido a sérios problemas de saúde por mim enfrentados durante a pesquisa. A empatia e a atenção deles e da minha orientadora constituíram fator *sine qua non* para concretização e finalização deste trabalho.

Sou muito grato também a outros membros do programa de pós-graduação. Um agradecimento especial aos responsáveis pela secretaria: Sr. Alexandre Estevan dos Santos e Sr. Orlando Rocha de Matos. Esse último, para tristeza de todos, veio a falecer, algo que gerou grande comoção em todos do Programa e em mim, particularmente. Assim como Alexandre, Orlando sempre foi muito atencioso e paciente. Tenho certeza de que hoje Orlando está em um lugar melhor e a lembrança dele, de sua gentileza e eficiência, sempre tocará nossos corações.

Deixo também um grande agradecimento a todos os incríveis professores do Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia da UFMG. Ao longo das várias disciplinas que cursei, constantemente me via absolutamente deslumbrado com tamanha qualidade e excelência das pesquisas por eles desenvolvidas. Não é à toa que o programa conta com o conceito 7, nota máxima concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Muito obrigado a todos pela partilha e pelos ensinamentos. Agradecimento especial aos professores Dra. Maria de Fátima Martins Horta, Dr. Luis Henrique Franco e Dr. Rafael Pinto Vieira.

Deixo meu agradecimento também à toda diretoria da instituição ESFA, onde tive o privilégio de lecionar e coordenar o curso de graduação em Medicina Veterinária. Agradeço especialmente à vice-diretora, Claudinéia Mognato Dalmaschio, e ao diretor pedagógico, MSc. Claudio David Cari. Ambos sempre me apoiaram em todos os aspectos, inclusive nos estudos deste doutorado. Agradeço igualmente a todos meus ex-alunos pelos anos de partilha e amizade.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização do presente trabalho e que, por algum descuido meu, possam não ter sido citados aqui. Um trabalho dessa magnitude depende de uma multiplicidade de integrantes. Sou imensamente grato a todos e a cada um de vocês.

"Seja a mudança que você quer ver no mundo" (Mahatma Gandhi)

Resumo

Estudos *in vitro* mostraram que ácidos graxos específicos adicionados ao meio de cultura modulam o receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa (PPAR- α) em bovinos, um regulador crucial do metabolismo lipídico hepático. Esses estudos descortinaram potencial estratégia para prevenir a esteatose hepática em vacas leiteiras em balanço energético negativo (BEN). No entanto, a escassez de experimentos *in vivo* demonstrando a efetiva modulação do receptor PPAR- α em vacas leiteiras, por meio da suplementação com óleos vegetais como fontes de ácidos graxos, limita a aplicabilidade desses resultados na pecuária leiteira. No presente trabalho, investigou-se a expressão de cinco genes-alvo do PPAR- α e do próprio receptor em fígado de novilhas suplementadas com três óleos vegetais comerciais – algodão, girassol e soja. Após 15 dias de suplementação, foi observado um aumento na expressão do gene 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMGCR), associado ao aumento da depuração hepática de acetil-CoA e exportação de triacilglicerol (TAG), particularmente com a suplementação de óleo de algodão. Esses achados foram corroborados por um aumento na concentração de colesterol no soro dos animais suplementados com todos os três óleos vegetais. Além disso, a suplementação com óleos de girassol e soja reduziu a expressão do gene da translocase de ácidos graxos (CD36), envolvido na internalização de ácidos graxos pelos hepatócitos, com potencial efeito preventivo sobre o acúmulo excessivo de gordura no fígado. O óleo de algodão também reduziu o consumo de matéria seca (CMS) sem comprometer o ganho de peso (GP). Ademais, a inclusão desses óleos não afetou negativamente diversos parâmetros de bioquímica clínica investigados, tanto aqueles relacionados às funções hepática e renal, como aqueles relacionados ao perfil lipídico sérico. Além disso, não foi observado impacto negativo sobre o estado inflamatório pela análise de dez proteínas de fase aguda (PFAs). Finalmente, a suplementação lipídica não resultou em alterações significativas nos microbiomas ruminal e fecal, embora tenha contribuído para o aumento relativo de gêneros bacterianos relacionadas à biohidrogenação ruminal, com potencial impacto positivo sobre o perfil lipídico da carne e do leite dos animais. Os achados fornecem perspectivas valiosas sobre o uso de óleos na nutrição de bovinos leiteiros, ao ampliar seu papel convencional de aumento da densidade energética da dieta.

Palavras-chave: Bovinos leiteiros, Suplementação com óleos na dieta, Esteatose hepática, Nutrigenômica em animais de produção, Balanço energético negativo, Genes-alvo do PPAR- α , Microbioma

Abstract

In vitro studies have shown that specific fatty acids added to culture media modulate the bovine peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR- α), a crucial regulator of hepatic lipid metabolism. These studies provide a potential strategy for preventing hepatic steatosis in dairy cows experiencing negative energy balance (NEB). However, there is a lack of *in vivo* experiments demonstrating the effective modulation of this receptor in these animals through the supplementation of vegetable oils as a source of fatty acids. Herein, we investigated the expression of five PPAR- α target genes and the receptor itself in the liver of heifers supplemented with three commercial vegetable oils: cottonseed, sunflower, and soyabean. After 15 days of supplementation, we observed an increase in the expression of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR) gene associated with increasing hepatic clearance of acetyl-CoA and triacylglycerol (TAG) exportation, particularly with cottonseed oil supplementation. These findings were corroborated by an increase in cholesterol concentration in the serum of animals supplemented with all three vegetable oils. Additionally, supplementation with sunflower and soyabean oils reduced the expression of the fatty acid translocase (CD36) gene, involved in the internalization of fatty acids by hepatocytes, potentially preventing excessive accumulation of liver fat. Cottonseed also reduced dry matter intake (DMI) without compromising weight gain. Importantly, the inclusion of these oils did not negatively affect the clinical biochemical parameters investigated, including those related to liver and kidney functions, as well as the serum lipid profile. Furthermore, no negative impact on the inflammatory state of the animals was observed through the analysis of ten acute-phase proteins. Finally, lipid supplementation did not induce significant modifications in the ruminal and fecal microbiomes. However, it fostered a relative increase in bacterial genera associated with ruminal biohydrogenation, which may positively influence the lipid profile of the animals' meat and milk. Our findings provide valuable insights into the use of oils in dairy cattle nutrition, extending their conventional role of increasing energy density in feed.

Keywords: Dairy cattle, Dietary oil supplementation, Liver steatosis, Livestock nutrigenomic, Negative energy balance, PPAR- α target genes, Microbiome

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Baías e novilhas alojadas durante a fase de campo do experimento.....	39
Figura 2 – Silagem de milho, misturador de ração e concentrado pós-mistura.....	40
Figura 3 – Preparação inicial do campo operatório para biópsia	49
Figura 4 - Anestesia local e antissepsia do campo operatório	50
Figura 5 – Ultrassonografia da região abdominal direita em novilha contida em tronco-balança	51
Figura 6 – Procedimento de biópsia hepática para extração de RNA	52
Figura 7 - Sutura e aplicação de spray protetor cutâneo após o término da biópsia	53
Figura 8 - Sítio cirúrgico dos dezesseis animais após transcorridos sete dias da primeira biópsia hepática.....	54
Figura 9 - Coleta de sangue na veia coccígea.....	54
Figura 10 - Gel de eletroforese de RNA total extraído das biópsias de fígado bovino	60
Figura 11 – Coleta e acondicionamento de amostras de líquido ruminal e fezes.....	65
Figura 12 – Abundância relativa de mRNA (Δ CT, log2) de genes associados ao metabolismo de lipídios em fígado de novilhas leiteiras suplementadas com óleos vegetais em comparação à dieta controle, em diferentes tempos de amostragem.....	70
Figura 13 - Níveis de lipídeos séricos em novilhas leiteiras suplementadas com óleos vegetais em comparação com a dieta controle, em diferentes tempos de amostragem.....	75
Figura 14 - Perfil microbiano em diferentes níveis taxonômicos (domínio e filo) e diversidade alfa em amostras de fluido ruminal obtidas em D+30 em novilhas leiteiras suplementadas com óleos vegetais em comparação à dieta controle.....	86
Figura 15 – Gêneros microbianos sensíveis à suplementação com óleos vegetais em amostras de fluido ruminal obtidas de novilhas leiteiras	87
Figura 16 - Perfil microbiano em diferentes níveis taxonômicos (domínio e filo) e diversidade alfa em amostras fecais obtidas em D+30 em novilhas leiteiras suplementadas com óleos vegetais em comparação à dieta controle	88
Figura 17 - Gêneros microbianos sensíveis à suplementação com óleos vegetais em amostras fecais obtidas de novilhas leiteiras	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição nutricional dos ingredientes da dieta basal.....	40
Tabela 2 - Níveis de garantia por quilograma do suplemento mineral-vitamínico NC Bovilac 50, Master Alimentos® ¹	41
Tabela 3 - Níveis de garantia por quilograma da mistura mineral Mineralalpha 75, Alpha Nutrição Animal® ¹	42
Tabela 4 - Quadro de Análise de Variância (ANOVA) válido para todas as variáveis analisadas, exceto para os parâmetros de metagenômica ruminal e fecal, GP e CMS	43
Tabela 5 - Quadro de Análise de Variância (ANOVA), específico para o parâmetro CMS	43
Tabela 6 - Composição nutricional dos diferentes óleos utilizados ¹	46
Tabela 7 - Composição em ácidos graxos ¹ e preço de aquisição no varejo dos óleos utilizados ²	47
Tabela 8 - Composição percentual e níveis nutricionais das dietas experimentais	48
Tabela 9 - Genes selecionados para quantificação dos níveis de mRNA em tecido hepático bovino	56
Tabela 10 - Concentração de RNA e razão entre as absorbâncias nos comprimentos de onda 260/280 nm	58
Tabela 11 - Gene, número de acesso no GenBank, direção e sequência dos primers na espécie bovina (<i>Bos taurus</i>)	61
Tabela 12 - Ganho de peso (GP) de novilhas alimentadas com diferentes dietas ¹	74
Tabela 13 – Consumo de Matéria Seca (CMS) ¹ em novilhas suplementadas com óleos vegetais em comparação à dieta controle, em diferentes tempos de amostragem	74
Tabela 14 – Concentração sérica de analitos referentes à bioquímica clínica em novilhas leiteiras suplementadas com óleos vegetais em comparação à dieta controle em diferentes tempos de amostragem	79
Tabela 15 – Concentração sérica de proteínas de fase aguda (PFA) em novilhas leiteiras suplementadas com óleos vegetais em comparação à dieta controle em diferentes tempos de amostragem.....	83
Tabela 16 - Concentração sérica de ceruloplasmina (CER) em novilhas leiteiras suplementadas com óleos em comparação à dieta controle em diferentes tempos de amostragem	84

LISTA DE SIGLAS

A2M: α -2 macroglobulina
AA1: apolipoproteína A1
AA4: apolipoproteína A4
ACC: acetil-CoA carboxilase
ACOX1: acil-CoA oxidase 1
ACSL1: acil-CoA ligase 1
ACTB: β -actina
AFMP: ácido fenoxi-2-metil-2-propiónico
AGCC: ácido graxo de cadeia curta
AGCL: ácido graxo de cadeia longa
AGCM: ácido graxo de cadeia média
ALB: albumina
ANGPTL4: proteína semelhante à angiopoietina 4
AST: aspartato aminotransferase
BEN: balanço energético negativo
BHB: β -hidroxibutirato
BHD2: β -hidroxibutirado desidrogenase 2
BSA: albumina sérica bovina
CD36: ácido graxo translocase
CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais
ChREPB: proteína de ligação a elemento de resposta a carboidrato
CLA: ácido linoléico conjugado
CMS: consumo de matéria seca
CPT1A: carnitina palmitoil transferase 1A
CPT2: carnitina palmitoil transferase 2
CT: colesterol total
CV: coeficiente de variação
DGAT1: diacilglicerol O-aciltransferase 1
DIC: delineamento inteiramente casualizado
DNA: ácido desoxirribonucleico
DPA: ácido docosapentaenóico
EA: eficiência alimentar

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

EE: extrato etéreo

EL: energia líquida

EPA: ácido eicosapentaenóico

F1: meio sangue

FDA: fibra insolúvel em detergente ácido

FDN: fibra insolúvel em detergente neutro

G6PC: glicose-6-fosfatase

GAC: α -1-glicoproteína ácida

GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GGT: γ -glutamilttransferase

GP: ganho de peso

HAP: haptoglobina

HDL: lipoproteína de alta densidade

HMGCR: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase

IC: intervalo de confiança

IgG: imunoglobulina G

IGL: IgG de cadeia leve

IGP: IgG de cadeia pesada

IL-1: interleucina 1

IL-6: interleucina 6

LDH: lactato desidrogenase

MALDI: ionização e dessorção a laser assistida por matriz

MAPA: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MDBK: células renais bovinas Mandi-Darby

MM: matéria mineral

mRNA: ácido ribonucleico mensageiro

MS: matéria seca

MUT: metilmalonil-CoA mutase

NDT: nutrientes digestíveis totais

NEFA: ácidos graxos não esterificados

NGS: sequenciamento de nova geração

OCTN2: transportador de cátions orgânicos 2

OTU: unidade taxonômica operacional

PB: proteína bruta

PBS: tampão fosfato salina

PC: piruvato carboxilase

PCK1: fosfoenolpiruvato carboxiquinase citosólica

PEPCK-C: fosfoenolpiruvato carboxiquinase citosólica

PFA: proteínas de fase aguda

PO: puro de origem

PPAR: receptor ativado por proliferador de peroxissomo

PPARA: receptor ativado por proliferador de peroxissomo α

PT: proteína total

PUFA: ácidos graxos polinsaturados

PV: peso vivo

PVC: policloreto de vinila

RNA: ácido ribonucleico

RPS9: proteína ribossomal S9

rRNA: ácido ribonucleico ribossomal

RT-qPCR: reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa quantitativa

SCD: estearoil-CoA-dessaturase

SCL2A2: transportador de glicose 2

SDS-PAGE: gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

SREBP: proteína de ligação a elemento regulador de esterol

TAE: tampão tris-acetato-EDTA

TAG: triacilglicerol

TBHQ: Terc-butil-hidroquinona

TGI: trato gastrintestinal

TNF: fator de necrose tumoral

TOF: separador de íons por tempo de voo

TRA: transferrina

Tris-HCL: tris(hidroximetil)aminometano hidrocloreto

VR: valores de referência

Δ CT: Δ *cycle threshold* (limiar de ciclo)

SUMÁRIO

1. Introdução.....	22
2. Estado da arte.....	25
2.1. BEN e seus impactos sobre o metabolismo hepático em vacas.....	25
2.2. PPAR- α e a regulação da expressão gênica e do metabolismo hepático	28
2.3. Óleos vegetais na alimentação de bovinos: para além da nutrigenômica	31
3. Objetivos.....	37
4. Material e Métodos	38
4.1. Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	38
4.2. Local	38
4.3. Animais, instalações e dieta basal.....	38
4.4. Delineamento experimental e testes estatísticos	42
4.5. Grupos experimentais	45
4.6. Obtenção de biópsias hepáticas e amostras de sangue.....	48
4.7. Genes selecionados para análise de expressão diferencial no tecido hepático	55
4.8. Extração e purificação do RNA das amostras de tecido hepático	55
4.8.1. Preparo do ambiente, homogeneização do tecido hepático e extração do RNA.....	55
4.8.2. Análise da concentração, pureza e integridade do RNA extraído.....	58
4.9. Determinação da expressão gênica diferencial em tecido hepático.....	60
4.10. Determinação do CMS e do GP dos animais.....	62
4.11. Bioquímica sérica	62
4.11.1. Lipídeos séricos e bioquímica clínica	62
4.11.2. PFA.....	63
4.12. Metagenômica ruminal e fecal.....	64
4.12.1. Amostragem de fluido ruminal e fezes	65
4.12.2. Extração e purificação do DNA das amostras de fluido ruminal e fezes	66
4.12.3. Sequenciamento de <i>amplicon</i> (16S rRNA)	67
4.12.4. Processamento e análise bioinformática	67
5. Resultados.....	69
5.1. Expressão gênica hepática	69
5.2. Ganho de peso e consumo alimentar	73
5.3. Lipídeos séricos e bioquímica clínica.....	74

5.4. PFA	81
5.5. Análise metagenômica	85
5.5.1. Metagenômica ruminal.....	85
5.5.2. Metagenômica fecal	87
6. Discussão	90
7. Conclusões.....	105
8. Referências bibliográficas	106
9. Anexo: artigo completo submetido em 2024 ao periódico <i>Livestock Science</i>	117

1. Introdução

O balanço energético negativo (BEN), comum em vacas no período de transição, especialmente no pós-parto imediato, representa um dos mais importantes desafios da pecuária leiteira, visto impactar negativamente diversos aspectos produtivos e de bem-estar animal. A mobilização excessiva de tecido adiposo desencadeada pelo BEN sobrecarrega especialmente a função hepática, pela captação, oxidação e reesterificação de ácidos graxos no interior dos hepatócitos, com consequente maior predisposição à cetose e à esteatose hepática nesses animais (Laguna *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2019). Essa cetose e esteatose, segundo Ji *et al.* (2014), resultam de uma inadequada adaptação do metabolismo hepático de lipídeos e de carboidratos, embora os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo ainda não sejam bem compreendidos.

O correto entendimento da adaptação metabólica e o estabelecimento de estratégias de intervenção para minimizar os efeitos indesejados do BEN demandam a compreensão da expressão de genes relacionados ao metabolismo energético, principalmente no fígado, bem como dos mecanismos de regulação desta expressão em bovinos.

Estudos iniciais relacionados à regulação do metabolismo energético hepático em bovinos já avaliaram a expressão diferencial de algumas dezenas de genes em função de fatores como o grupo genético dos animais (Laguna *et al.*, 2017) e o estado fisiológico (Angeli *et al.*, 2019; Laguna *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2019). Achados experimentais preliminares indicam que mudanças na expressão gênica constituem a base das variações no metabolismo energético observadas nos bovinos, especialmente no período de transição. Segundo Ebrahimi *et al.* (2015), alguns dos genes já identificados que regulam essa resposta são fatores de transcrição, dentre eles os Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma (PPARs).

Os PPARs se caracterizam como moléculas ativáveis por ácidos graxos, as quais controlam a expressão de uma variedade de genes envolvidos em muitas vias do metabolismo lipídico, segundo Atrice Desvergne, Michalik e Wahli (2006). Esses autores destacam que o isotipo PPAR- α é altamente expresso em tecidos com alta atividade catabólica de lipídeos, como o fígado, tecido adiposo marrom, músculo esquelético e músculo cardíaco. A ativação desse receptor, exerce um papel central no aumento da oxidação de ácidos graxos de cadeia

longa (AGCL), especialmente no fígado, tanto em animais não ruminantes como em ruminantes (Bionaz, Thering e Loor, 2012).

Nesse contexto, alguns estudos realizados *in vitro* (Bionaz, Thering e Loor, 2012; Weld, Erb e White, 2019) e *in vivo* (Akbar *et al.*, 2013; Ebrahimi *et al.*, 2015; Silva, Da *et al.*, 2016) demonstraram o potencial efeito agonista que AGCL exercem sobre o PPAR- α e sua resposta sobre a expressão de genes relacionados ao metabolismo de lipídeos em ruminantes domésticos. Nenhum desses estudos, no entanto, avaliou os efeitos *in vivo* sobre o receptor PPAR- α e seus alvos gênicos pela inclusão de óleos vegetais comerciais na dieta de bovinos, como fontes lipídicas de baixo custo e alta disponibilidade. Essa ausência de experimentos *in vivo* usando óleos vegetais comerciais, em parte se deve à complexidade dos estudos da interação dieta e expressão gênica em animais de grande porte, como os bovinos, mas também pelo risco potencial desses óleos não serem protegidos da interação com o microbioma ruminal.

De fato, o estudo da interação dieta - expressão gênica é relativamente novo em ruminantes. Segundo Osorio *et al.* (2017), a "revolução ômica" deu origem ao campo da nutrigenômica, relativamente novo em ruminantes, o qual se propõe estudar as influências da nutrição sobre a expressão do genoma. Pode-se considerar o termo nutrigenômica um neologismo dentro do conceito de epigenética, o qual quer delimitar apenas os efeitos da nutrição, em detrimento de outros componentes ambientais, sobre a regulação da expressão gênica.

Assim, estudos *in vivo* relativos à inclusão de fontes lipídicas na dieta de bovinos leiteiros e a avaliação de seus efeitos sobre a expressão de genes alvo do PPAR- α no fígado, se colocam na vanguarda das pesquisas com animais de produção, dado o grande potencial em contribuir com estratégias práticas para mitigar a ocorrência das relatadas desordens relacionadas ao metabolismo energético hepático em vacas no período de transição e dada a escassez de publicações.

O aumento da expressão hepática de genes alvo do PPAR- α , induzida pela manipulação da composição lipídica da dieta, implica no possível aumento da capacidade do fígado bovino em lidar com a sobrecarga de ácidos graxos não esterificados (NEFA), provenientes do tecido adiposo durante o BEN, efeito este desejável do ponto de vista da produtividade e do bem-estar animal.

No entanto, em ruminantes, cautela é exigida sempre que se propõe aumentar o suprimento dietético de ácidos graxos, pelo uso de fontes lipídicas, como os óleos vegetais. Se por um lado são esperados efeitos benéficos, como os mencionados anteriormente, possíveis efeitos adversos devem ser considerados, especialmente quando se utiliza fontes lipídicas não protegidas da interação com o ambiente ruminal (Bionaz, Vargas-Bello-Pérez e Busato, 2020; Kaewpila, Sommart e Mitsumori, 2018; Loor, Elolimy e McCann, 2016).

Há que se considerar que o uso de fontes lipídicas dietéticas, por interferirem diretamente sobre a atividade do microbioma dos pré-estômagos e, por consequência, no aporte de energia e proteínas para os animais, pode promover alterações no consumo de matéria seca (CMS), no ganho de peso (GP) e no estado de saúde dos animais. Por isso, trabalhos experimentais *in vivo* voltados à avaliação dos efeitos epigenéticos do uso de fontes lipídicas na nutrição de ruminantes não devem se limitar ao estudo das alterações na expressão gênica tecidual *per si*, mas avaliar, concomitantemente, diferentes parâmetros de controle relativos ao desempenho, saúde e bem-estar dos animais.

2. Estado da arte

2.1. BEN e seus impactos sobre o metabolismo hepático em vacas

Vacas no pós-parto imediato estão particularmente susceptíveis ao BEN, devido ao aumento da exigência energética para a lactação associado ao insuficiente consumo alimentar inerente à esta fase (Singh *et al.*, 2019). Como consequências diretas do BEN em vacas são esperados: o aumento da mobilização do tecido adiposo, o aumento dos níveis séricos de NEFA, a cetose e a esteatose hepática (Laguna *et al.*, 2017). Apesar de poderem ser utilizados como fontes de energia por outros tecidos, o órgão mais importante para a remoção de NEFA da circulação sanguínea é o fígado, local onde esses ácidos graxos poderão sofrer oxidação completa ou formar corpos cetônicos, como o β -hidroxibutirato (BHB), ou ainda serem esterificados para formar triacilgliceróis (TAG) (Drackley, 1999).

A esteatose hepática, caracterizada pelo acúmulo excessivo de TAG no fígado, é uma desordem metabólica comum em vacas de alta produção durante o período de transição, especialmente nas primeiras semanas após o parto. Estima-se que cerca de 5 a 10% dos animais desenvolvam formas severas da condição, enquanto aproximadamente 30 a 40% apresentem graus leves a moderados de acometimento hepático (Du *et al.*, 2018). Esse quadro clínico, frequentemente associado à cetose, resulta de uma adaptação incompleta ou disfuncional do metabolismo de lipídeos e carboidratos frente ao BEN, característico do início da lactação (Ji *et al.*, 2014). A compreensão detalhada dos mecanismos moleculares envolvidos nesse processo adaptativo, em especial os relacionados à expressão e à regulação de genes associados ao metabolismo energético hepático, é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e intervenção eficazes nessa fase crítica da vida produtiva dos bovinos.

O advento de tecnologias de estudo do genoma, proteoma e metaboloma, as chamadas ferramentas ômicas, ofereceu a oportunidade de se estudar múltiplos níveis de informação biológica para melhor entendimento acerca da resposta animal à nutrição, ao ambiente, estado fisiológico e suas interações (Osorio *et al.*, 2017). Neste contexto, estudos relacionados à regulação do metabolismo energético hepático em bovinos já avaliaram a expressão diferencial de genes em função de fatores como o grupo genético dos animais (Laguna *et al.*, 2017) e o estado fisiológico (Angeli *et al.*, 2019; Laguna *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2019).

Laguna et al. (2017) investigaram a expressão de genes que codificam enzimas e outros fatores envolvidos no metabolismo de carboidratos e lipídeos no fígado bovino em dois grupos genéticos: vacas holandesas puro de origem (PO) e vacas girolando meio sangue (F1). Foram avaliadas a expressão dos genes codificadores das proteínas glicose-6-fosfatase (G6PC), fosfoenolpiruvato carboxiquinase citosólica (PEPCK-C), metilmalonil-CoA mutase (MUT), β -hidroxibutirato desidrogenase 2 (BHD2), acetil-CoA carboxilase (ACC), carnitina palmitoil transferase 2 (CPT2), 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMGCR), transportador de glicose 2 (SCL2A2) e PPAR- α . Biópsias de fígado foram coletadas de 12 vacas nos dias -15, +6, +21, +36, +51 e +66 em relação ao parto. Em ambos os grupos de vacas, a expressão dos genes que codificam G6PC e PEPCK-C foi menor nos dias +21 e +36 e maior no dia +51, quando comparada à expressão no pré-parto, e a expressão de genes que codificam enzimas-chave da gliconeogênese diminuiu após o parto. Pelo fato da expressão do gene MUT ter sido maior em F1 em relação a PO, os autores especulam que o BEN pode ser menos danoso no primeiro grupo, já que este gene codifica uma enzima responsável pela conversão de propionato em succinato, uma reação essencial do metabolismo hepático de ruminantes.

Como mencionado anteriormente, a cetose está entre as manifestações mais comuns relacionadas ao BEN em vacas. Zhu et al. (2019) afirmam que uma desordem na expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico no fígado desempenha um importante papel no início e na progressão da cetose nesses animais. Os autores investigaram os padrões de expressão de onze genes candidatos, envolvidos na capacidade do fígado em captar, transportar, ativar, oxidar, sintetizar e esterificar ácidos graxos, em vacas saudáveis e naquelas que apresentavam um quadro de cetose clínica e subclínica, de acordo com os níveis plasmáticos de BHB e com os sinais clínicos. Os autores observaram que a expressão de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) de genes relacionados à captação, transporte e ativação de ácidos graxos estavam aumentadas nas vacas com cetose subclínica e clínica. Observaram também que a oxidação de ácidos graxos esteve aumentada nas vacas com cetose subclínica, mas marcadamente diminuída nas vacas com cetose clínica. Além disso, observaram que a síntese de TAG está significativamente aumentada em vacas com cetose clínica, o que pode induzir à esteatose hepática nestes animais.

Angeli et al. (2019) avaliaram a expressão de genes e a síntese de proteínas hepáticas relacionadas ao metabolismo lipídico, bem como biomarcadores plasmáticos em bovinos leiteiros no período de transição. Foram coletadas amostras de sangue e biópsias hepáticas de

um grupo de oito vacas multíparas nos dias -28, -14, +4, +14, +28 e +56 em relação ao parto. Picos de concentração de NEFA e BHB, com alto conteúdo de TAG no fígado, foram obtidos no dia +4. Além disso, a expressão gênica das enzimas carnitina palmitoil transferase 1A (CPT1A) e acil-CoA oxidase 1 (ACOX1) aumentaram, enquanto a expressão da enzima diacilglicerol O-aciltransferase 1 (DGAT1) diminuiu. Apesar da variação nos níveis de mRNA, não foram detectadas variações na expressão da proteína CPT1A durante todo período avaliado. Já a expressão da proteína ACOX1 aumentou no dia 56 pós-parto. Adicionalmente, os níveis da proteína PPAR- α aumentaram no dia 28 pós-parto e da proteína DGAT1 diminuíram no dia 14 pós-parto. Como esperado, a expressão dos genes associados com a oxidação de ácidos graxos aumentou nos primeiros dias após a parição, mas, notavelmente, a expressão das proteínas foi maior depois do período de transição (mais que 3 semanas após o parto).

De acordo com Singh et al. (2019), o fígado, por ser um órgão chave para o metabolismo, desempenha um papel importante na capacidade do organismo em lidar com o BEN. Esses pesquisadores analisaram o transcriptoma hepático de búfalas na fase inicial da lactação, por meio de biópsias, colhidas no dia 15 e 30 pós-parto, e utilizaram bezerras em diestro como grupo controle. No que se refere ao metabolismo de lipídeos, tanto no dia 15 como no dia 30, foi observado o aumento na expressão de genes relacionados à oxidação de ácidos graxos de cadeia média (AGCM) e AGCL, bem como de genes relacionados ao acúmulo de lipídeos.

Os achados experimentais apresentados até aqui apontam que as variações na expressão gênica hepática estão por trás das alterações no metabolismo energético observadas nos bovinos, especialmente no período de transição. Ebrahimi et al. (2015) afirmam que a expressão gênica desempenha um papel crítico na resposta adaptativa, por meio da alteração da atividade de enzimas em vias metabólicas relevantes, e que alguns fatores de transcrição, que regulam esta resposta, já foram identificados. Dentre estes fatores de transcrição, estão incluídos o PPAR (Desvergne, Michalik e Wahli, 2006) a proteína de ligação a elemento regulador de esterol - SREBP (Horton, Goldstein e Brown, 2002) e a proteína de ligação a elemento de resposta a carboidrato - ChREBP (Clarke e Jump, 1993). Ressalta-se que a atividade desses fatores de transcrição é regulada não apenas por hormônios, mas também por nutrientes e metabólitos (Jump e Clarke, 1999; Kersten, 2001).

2.2. PPAR- α e a regulação da expressão gênica e do metabolismo hepático

Os PPARs foram os primeiros receptores nucleares identificados como "sensores", ao invés dos clássicos receptores hormonais. Tais receptores se caracterizam como moléculas ativáveis por ácidos graxos, as quais controlam a expressão de uma variedade de genes, em muitas vias do metabolismo lipídico. São reconhecidos três isotipos de PPAR: PPAR- α , PPAR- β (também denominado PPAR- δ) e PPAR- γ . Esse último com duas isoformas, PPAR- γ 1 e PPAR- γ 2. O PPAR- α é altamente expresso em tecidos com alta atividade catabólica de lipídeos, como o fígado, tecido adiposo marrom, músculo esquelético e músculo cardíaco, enquanto o PPAR- β é expresso nos tecidos de forma ubíqua. PPAR- γ 1 é expresso principalmente no tecido adiposo, mas também foi detectado no cólon, baço, retina, células da linhagem hematopoiética e no músculo esquelético. PPAR- γ 2 foi encontrado principalmente nos tecidos adiposos branco e marrom (revisado por Atrice Desvergne, Michalik e Wahli, 2006).

O receptor PPAR- α representa um alvo molecular para a prevenção de desordens associadas ao metabolismo de lipídeos (Bragt e Popeijus, 2008). A ativação desse receptor, exerce um papel central no aumento da oxidação de AGCL, especialmente no fígado, tanto em animais não ruminantes como em ruminantes (Bionaz, Thering e Loor, 2012). Assim, o estudo de substâncias que promovam efeito agonista sobre o PPAR- α pode permitir o estabelecimento de estratégias para minimizar, ou mesmo prevenir, consequências deletérias do BEN em vacas no periparto, bem como garantir uma melhora na produtividade e no bem-estar destes animais.

Nesse contexto, alguns estudos *in vitro* já demonstraram o efeito agonista que AGCL exercem sobre o PPAR- α em bovinos e sua resposta sobre a expressão de genes relacionados ao metabolismo de lipídeos.

Weld, Erb e White (2019) quantificaram a expressão de enzimas chave, envolvidas na gliconeogênese e no transporte de ácidos graxos para o interior da mitocôndria, em culturas de hepatócitos primários, obtidos de bezerros recém-nascidos. As culturas foram expostas a uma mistura de ácidos graxos que mimetizava o perfil circulante no plasma durante o periparto, com ou sem enriquecimento com ácido palmítico (16:0), ácido esteárico (18:0) e oléico (18:1). Após incubação por 24 horas, amostras foram submetidas à técnica de reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR) para a avaliação dos níveis de mRNA

de genes de interesse. A adição de ácidos graxos aumentou a expressão dos genes codificadores de CPT1A e fosfoenolpiruvato carboxiquinase citosólica (PCK1).

No estudo de Bionaz, Thering e Loor (2012), realizado com culturas de células renais bovinas Mandi-Darby (MDBK), foi avaliada a expressão de genes alvo do PPAR- α frente a adição de um agonista seletivo, o fibrato WY-14643, e de doze diferentes AGCL. Os autores observaram efeitos agonistas mais fortes sobre o PPAR- α nos tratamentos com adição dos ácidos graxos 16:0, 18:0 e eicosapentaenóico (20:5n-3, EPA). Ao se considerar o efeito geral sobre a expressão de 30 genes selecionados, os AGCL 16:0, 18:0 e EPA tiveram os maiores efeitos, seguidos pelo ácido araquídico (20:0) e pelo ácido linoléico conjugado (c9t11-18:2, CLA). Uma análise de rede de genes indicou um aumento geral no metabolismo lipídico com o WY-14643 e com todos os AGCL adicionados, com um papel central do PPAR- α , mas também de fatores de transcrição putativos adicionais. De acordo com os autores, os dados obtidos parecem evidenciar uma adaptação evolucionária teleológica do PPAR- α de ruminantes para lidar com uma maior disponibilidade de AGCL saturados ao invés de insaturados.

Outro estudo que também ressalta a importância do PPAR- α na modulação do metabolismo energético hepático em ruminantes foi desenvolvido por Da Silva et al. (2016). Esses pesquisadores, assim como no estudo de Bionaz, Thering e Loor (2012), também avaliaram o efeito de um fibrato, o ácido fenoxi-2-metil-2-propiónico (AFMP), porém, nesse caso, a pesquisa utilizou o modelo *in vivo*, com ovelhas durante o período de transição. Esta espécie animal está sujeita a uma desordem metabólica, comum nas últimas seis semanas de gestação, a chamada toxemia da prenhez, a qual é resultado da incapacidade de se manter uma adequada homeostase energética, semelhante ao que ocorre nas vacas. Um total de 33 ovelhas gestantes foram submetidas ao jejum, do dia gestacional 130, cerca de 20 dias antes do parto, até a manifestação de doença clínica. A partir desse momento, os animais foram tratados durante seis dias com três alternativas terapêuticas: (i) 10 mg/kg AFMP; (ii) 10 mg/kg AFMP + 100 mL de propilenoglicol (PG) por via oral; (iii) 100 mL de PG por via oral. Os níveis plasmáticos de glicose e BHB foram determinados diariamente. Biópsias de fígado foram obtidas no dia gestacional 130, no início do tratamento, no final do tratamento e no dia 5 pós-parto, para a avaliação da extensão e do grau da esteatose hepática. Apesar do fato de que nas ovelhas tratadas com AFMP os níveis de glicose e de BHB no plasma se recuperaram mais lentamente, os autores concluíram que o AFMP sozinho, ou combinado com o PG, pode ser

usado como uma alternativa para efetivamente tratar a esteatose hepática e, conseqüentemente, a toxemia da prenhez em ovelhas.

Embora fundamentais, estudos *in vivo* relacionados à manipulação da composição da dieta, especificamente do nível de inclusão e do perfil de ácidos graxos, e seus efeitos sobre o PPAR- α no fígado dos ruminantes domésticos, são muito escassos. Consultas amplas sobre este tema, realizadas até o mês de maio de 2024, nos indexadores "Periódicos Capes", "Google Scholar", "Scielo" e "PubMed", resultaram em apenas um artigo experimental relativo a bovinos (Akbar *et al.*, 2013) e um relativo a caprinos (Ebrahimi *et al.*, 2015).

O estudo de Akbar *et al.* (2013) analisou no fígado de bovinos os efeitos nutrigenômicos da inclusão de duas fontes lipídicas: óleo de peixe e uma mistura comercial composta por lipídeos de origem animal e vegetal (Energy Booster™, MSG™). A expressão do gene codificador da enzima ácido graxo translocase (CD36), responsável pela captação de AGCL, foi significativamente menor no período pré-parto em vacas alimentadas com a mistura comercial em comparação com os tratamentos com óleo de peixe e com a dieta controle. Já no período pós-parto a expressão de CD36 foi ainda menor, porém em resposta ao tratamento com óleo de peixe. A expressão do gene codificador da enzima estearoil-CoA dessaturase (SCD), atuante na lipogênese, foi mais baixa nas vacas alimentadas com óleo de peixe durante todo o período estudado. Genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos, como acil-CoA ligase 1 (ACSL1) e ACOX1, mostraram variações significativas dependendo da dieta, com menores expressões em vacas alimentadas com a mistura comercial comparadas às alimentadas com óleo de peixe no pós-parto. A expressão de enzimas relacionadas à gliconeogênese, como a piruvato carboxilase (PC) e a PCK1, foi maior no pós-parto em vacas do grupo controle, enquanto vacas alimentadas com óleo de peixe e mistura comercial mostraram menores expressões.

Assim, os achados de Akbar *et al.* (2013) corroboram a hipótese de que a suplementação com diferentes fontes lipídicas pode modular a expressão gênica de maneiras distintas, e afetar processos como captação e transporte de ácidos graxos, esterificação, oxidação e metabolismo energético no fígado, o que pode ter implicações importantes na saúde e produtividade das vacas durante o período de transição. Apesar dos dados apresentados serem bastante valiosos, é importante ressaltar que, em todo o território nacional, a produção, a comercialização e a utilização de produtos destinados à alimentação de ruminantes que contenham em sua composição proteínas e gorduras de origem animal é proibida pela Instrução Normativa 8/2004, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Desse modo, a pesquisa em

pecuária bovina que objetiva estudar o efeito da inclusão de fontes lipídicas na alimentação, deve estar restrita aos produtos de origem vegetal.

No estudo de Ebrahimi et al. (2015), foram avaliados os efeitos de uma dieta rica em ácido α -linolênico (18:3n-3) sobre a composição lipídica e sobre a expressão dos genes do PPAR- α e da enzima SCD em fígado de cabras. Quatorze animais foram divididos em dois tratamentos: o da dieta controle, a qual continha óleo de palmiste como fonte lipídica principal, e o da dieta rica em 18:3n-3, a qual continha o óleo de linhaça (1,3% da matéria seca, MS) como fonte lipídica principal. A amostragem do tecido hepático se deu após 100 dias do fornecimento contínuo das duas dietas. Um aumento nos níveis de 18:3n-3, EPA, ácido docosapentaenóico (22:5n-3, DPA) e docosahexaenóico (22:6n-3, DHA) foi observado no fígado das cabras do grupo alimentado com óleo de linhaça. Nesse mesmo grupo, a expressão do gene PPAR- α foi significativamente maior quando comparada ao grupo controle. O oposto ocorreu para a expressão do gene SCD. Como a ativação do receptor PPAR- α tem potencial para promover grandes alterações no metabolismo energético hepático, especialmente no metabolismo lipídico, os autores concluíram que o fornecimento do óleo de linhaça, ou outra fonte lipídica rica em ácido α -linolênico, se mostrou como possíveis alternativas nutricionais para modular o metabolismo hepático em cabras.

2.3. Óleos vegetais na alimentação de bovinos: para além da nutrigenômica

Lock e Souza (2018) afirmam que é prática comum a adição de fontes suplementares de ácidos graxos na dieta de vacas leiteiras, estratégia esta que visa a aumentar a densidade energética da ração e a sustentar a produção de leite, especialmente em animais sujeitos ao BEN, no pós-parto imediato. No entanto, diferentes fontes lipídicas resultam em diferentes respostas metabólicas e produtivas, na dependência, em especial, do perfil de ácidos graxos oferecido pelas mesmas (Souza e Lock, 2019).

Nos últimos anos, a pesquisa relativa à utilização de diferentes óleos vegetais na alimentação de bovinos tem focado, principalmente, nos seus efeitos sobre o perfil nutricional do leite (Antonacci *et al.*, 2017; Aprianita *et al.*, 2014; Prieto-Manrique *et al.*, 2018; Ribeiro *et al.*, 2014; Salles, Márcia S.V. *et al.*, 2019) e sobre parâmetros ruminais (Granja-Salcedo *et al.*, 2017; Judy *et al.*, 2019; Salles, Márcia S.V. *et al.*, 2019; Sun, Allen e Lock, 2019; Zened *et al.*, 2013).

Leroux et al. (2016) afirmam que apesar de conhecidos os efeitos da nutrição sobre a composição do leite, os mecanismos gerais subjacentes a esta regulação estão longe de serem entendidos. Neste sentido, algumas pesquisas têm buscado elucidar os mecanismos envolvidos nas adaptações metabólicas que resultam nas alterações da composição do leite induzidas pela adição de diferentes óleos na alimentação de bovinos, por meio de ferramentas de biologia molecular, como a análise transcriptômica e o sequenciamento *high throughput* (Ibeagha-Awemu *et al.*, 2016, 2018; Leroux *et al.*, 2016; Mobuchon *et al.*, 2017).

Pesquisas mostram que o GP e a eficiência alimentar também podem ser influenciados pela suplementação de lipídios na dieta de ruminantes. Autores ponderam que apesar do potencial de melhora destes parâmetros, a adição de fontes lipídicas deve ser cuidadosamente balanceada para evitar impactos negativos na digestibilidade da fibra e na saúde ruminal (Kaewpila, Sommart e Mitsumori, 2018; Loor, Elolimy e McCann, 2016)

Do ponto de vista de benefícios potenciais, a inclusão de fontes lipídicas na dieta de bovinos leiteiros tem mostrado impactos significativos tanto no GP quanto no CMS. Há muito já se tem evidências de que a suplementação com ácidos graxos saponificados, mais especificamente o óleo de palma, influencia o CMS, a produção de leite e o GP em vacas leiteiras, o que sugere que tal suplementação seja eficaz em melhorar o balanço energético e o desempenho produtivo de vacas em diferentes estágios de lactação (Hermansen, 1990).

Todavia, trinta anos depois, estudos similares permanecem investigando efeitos potenciais de inclusão de diferentes óleos na dieta de vacas leiteiras. Por exemplo, Boland et al. (2020) examinaram os efeitos da inclusão de diferentes fontes de ácidos graxos, como ácido esteárico, óleo de linhaça e óleo de soja. Esses autores encontraram que o CMS foi menor para vacas suplementadas com óleo de linhaça e óleo de soja. Ademais, observou-se que vacas suplementadas com esses óleos apresentaram maior produção de leite e rendimento de proteína láctea em comparação com aquelas suplementadas com ácido esteárico (Boland *et al.*, 2020). Micek et al. (2019), por sua vez, investigaram a inclusão de aditivos com diferentes fontes de gordura na dieta de vacas em lactação e os resultados indicaram uma melhoria na ingestão alimentar e no desempenho produtivo de leite. Esse estudo concluiu que a suplementação com fontes de gordura pode ser indicada para melhorar a eficiência alimentar e a produção de leite (Micek *et al.*, 2019).

Por outro lado, Bionaz, Vargas-Bello-Pérez e Busato (2020) destacaram que apesar da inclusão de ácidos graxos polinsaturados (PUFA) na dieta de vacas leiteiras ter mostrado benefícios no aumento do peso corporal, é crucial a proteção desses ácidos graxos contra a biohidrogenação no rúmen, para assegurar sua eficácia e prevenir efeitos deletérios sobre o microbioma ruminal. Esses autores afirmam ainda que a toxicidade dos PUFAs para as bactérias é frequentemente maior comparada aos ácidos graxos saturados, o que sugere que o processo de biohidrogenação pelas bactérias ruminais é uma defesa essencial contra esses efeitos tóxicos dos PUFAs.

Mecanismos moleculares que buscam explicar os efeitos deletérios da suplementação com PUFAS em vacas leiteiras incluem a inserção direta desses lipídios na membrana fosfolipídica de bactérias do rúmen, com consequentes alterações na sua fluidez e permeabilidade. Isso pode resultar em perturbações na integridade celular e no metabolismo microbiano (Lopreiato *et al.*, 2020).

Baker *et al.* (2018) demonstraram que a exposição de bactérias a PUFAs leva ao aumento da acumulação de brometo de etídio nos ácidos nucleicos, indicativo de aumento na permeabilidade da membrana celular e consequente comprometimento da integridade dessa barreira. Estudo anterior, com bactérias ruminais, já havia demonstrado que os PUFAs podiam causar *lag phases* no crescimento bacteriano por alterar a integridade da membrana (Maia *et al.*, 2010).

Métodos como encapsulação em matrizes proteicas e produção de sabão de cálcio têm sido utilizados para proteger fontes dietéticas de ácidos graxos no rúmen (Bionaz, Vargas-Bello-Pérez e Busato, 2020). Vale ressaltar, no entanto, que tais estratégias tendem a aumentar o custo das fontes lipídicas tornando sua adoção economicamente inviável para grande parte dos criadores. Dessa forma, o desenvolvimento de abordagens que utilizem óleos vegetais comerciais não protegidos e de menor custo passa a ser fundamental para permitir que os achados experimentais possam ser aplicados na prática pecuária.

Para além do GP e do CMS é relevante avaliar os efeitos da inclusão dos óleos vegetais sobre parâmetros de bioquímica clínica, no contexto da avaliação do estado geral de saúde dos animais, bem como de funções específicas, como as funções hepática e renal. Nesse aspecto, dosagens de níveis séricos de diversos parâmetros como proteínas e metabólitos, incluindo

enzimas, proteínas de fase aguda (PFA) e lipídeos como NEFA, BHB e colesterol, têm sido utilizadas.

No estudo de Chen *et al.* (2024), por exemplo, a adição de fonte lipídica na dieta de vacas em lactação aumentou os níveis séricos de enzimas como aspartato aminotransferase (AST) e γ -glutamil transferase (GGT), o que indica potencial impacto negativo sobre a função hepática. Por outro lado, estudos evidenciaram que a inclusão de fontes lipídicas na dieta de bovinos tende a aumentar os níveis de NEFA e BHB na circulação, indícios de um maior catabolismo de ácidos graxos (Chen *et al.*, 2024; Niwa *et al.*, 2023)

Ademais, segundo Elbaz *et al.* (2019), diversos estudos demonstram o efeito advindo de ácidos graxos, especialmente da série n-3, sobre o estado inflamatório de animais. De modo geral, esses ácidos graxos desempenham papel como precursores de sinalizadores anti-inflamatórios, com destaque para o EPA e o DHA.

Nesse contexto, as PFAs, que são proteínas cuja concentração no sangue aumenta ou diminui significativamente em resposta a inflamações, infecções, estresse ou traumas podem ser usadas como biomarcadores do estado inflamatório (Akbar *et al.*, 2015; Montagner *et al.*, 2017).

Essas PFAs são produzidas principalmente pelo fígado em resposta a citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Ceciliani *et al.*, 2012; Murata, Shimada e Yoshioka, 2004). Elas podem ser classificadas em positivas ou negativas, a depender da sua resposta à inflamação. As PFAs positivas têm seus níveis séricos aumentados em resposta ao estímulo inflamatório, enquanto as PFAs negativas têm seus níveis séricos reduzidos.

São exemplos de PFAs positivas: (i) a haptoglobina, que se eleva significativamente durante processos inflamatórios e infecciosos e atua pela ligação a hemoglobina livre, para prevenir danos oxidativos (Eckersall e Bell, 2010); (ii) a glicoproteína ácida, também conhecida como orosomucoide, que encontra-se aumentada em resposta a inflamações e possui propriedades imunomoduladoras e anti-inflamatórias (Ceciliani, Giordano e Spagnolo, 2002); (iii) a apolipoproteína A1 e (iv) a apolipoproteína A4, que embora tradicionalmente associadas ao transporte de lipídios, seus níveis também podem aumentar durante inflamações (Bertoni *et al.*, 2008; Qu *et al.*, 2019) e (v) a ceruloplasmina, a qual atua no transporte de cobre e possui atividade antioxidante (González *et al.*, 2011).

Exemplos de PFAs negativas incluem: (i) a albumina, que tem sua concentração sérica diminuída durante inflamações agudas, já que a síntese hepática é redirecionada para outras PFAs positivas (Petersen, Nielsen e Heegaard, 2004); (ii) a transferrina, cuja produção diminui em resposta à inflamação, o que ajuda a reduzir a disponibilidade de ferro para patógenos (Gabay e Kushner, 1999); (iii) a IgG de cadeia leve e (iv) a IgG de cadeia pesada, cuja síntese pode ser reduzida também devido ao foco na produção de PFAs positivas (Murata, Shimada e Yoshioka, 2004); (v) a α -2- macroglobulina, que pode ter uma resposta variável, mas em alguns contextos inflamatórios sua concentração pode diminuir (Murata, Shimada e Yoshioka, 2004).

Essas proteínas desempenham papéis críticos na resposta imune e na regulação do metabolismo durante eventos inflamatórios e são, portanto, indicadores valiosos do estado de saúde e do estresse fisiológico em bovinos. A análise das PFAs no contexto de suplementação dietética permite avaliar não apenas a saúde geral dos animais, mas também a eficácia e os possíveis impactos das intervenções nutricionais (Ceciliani *et al.*, 2012).

Para além da avaliação do impacto sobre a resposta imune dos bovinos e outros ruminantes, igualmente relevantes são os impactos potenciais da adição dietética de fontes lipídicas sobre o microbioma do trato digestório, especialmente dos pré-estômagos. Nesse aspecto, estudos recentes sobre o microbioma ruminal de bovinos leiteiros suplementados com lipídeos revelaram efeitos significativos na composição, diversidade e função do microbioma.

Segundo Lin *et al.* (2023) e Torres Manno *et al.* (2023), o microbioma ruminal é composto principalmente por bactérias dos filos Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria e Fibrobacteres, e a adição de fontes lipídicas pode alterar a abundância desses filos. Frequentemente observa-se diminuição da abundância relativa de bactérias fibrolíticas (como Fibrobacteres) e aumento daquelas envolvidas no metabolismo de amido e açúcares (como Bacteroidetes). Segundo esses mesmos autores, um dos impactos mais marcantes dessas alterações nas populações microbianas é a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) pelos processos fermentativos. Em geral, a adição de lipídeos na dieta aumenta a produção de propionato e reduz a produção de acetato pela alteração no perfil microbiano ruminal. Como consequência, há alterações significativas no metabolismo energético do ruminante com maior atividade gliconeogênica e menor atividade lipogênica, o que pode resultar em implicações importantes na produtividade e na composição do leite e da carne.

Ainda sobre os efeitos da suplementação lipídica sobre o microbioma ruminal, pode haver inibição seletiva do crescimento de microrganismos metanogênicos e protozoários no rúmen, os quais são críticos para a produção de metano e para a degradação de fibras, respectivamente. Essa supressão pode ter implicações na eficiência do rúmen e na dinâmica da fermentação. Por exemplo, espécies de *Methanobrevibacter*, que são arqueias dominantes no rúmen, podem ser menos abundantes na presença de níveis mais altos de lipídios na dieta. A redução na abundância desses microrganismos e, conseqüentemente, na produção de metano, pode ser entendida como algo vantajoso do ponto de vista ambiental e do aproveitamento de energia pelo animal. Por outro lado, essa redução potencialmente traz também implicações negativas sobre o equilíbrio do pH no rúmen (Ge *et al.*, 2023; Lin *et al.*, 2023; Torres Manno *et al.*, 2023).

Em suma, a adição de lipídeos na dieta de bovinos surge como uma estratégia potencial para combater desordens metabólicas relacionadas ao BEN. Todavia, a maior parte dos estudos já descritos na literatura foram feitos *in vitro*, ou utilizaram ácidos graxos isolados e fontes lipídicas de origem animal, ou estiveram focados em análises fenotípicas, sem avaliar impactos globais na saúde, GP, CMS e alterações do microbioma ruminal. Tudo isso ressalta a importância do presente estudo nutrigenômico, que concilia análises *in vivo* de múltiplos parâmetros de produtividade, de estado de saúde geral e de composição de microbiomas do trato digestório com aspectos moleculares do metabolismo hepático dos animais suplementados com óleos vegetais comerciais.

3. Objetivos

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar os efeitos nutrigenômicos da inclusão dietética de diferentes óleos vegetais sobre a expressão de genes associados ao receptor PPAR- α em fígado de novilhas leiteiras.

Para isso foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- i. avaliar a modulação da expressão de genes alvo do PPAR- α em biópsias hepáticas de novilhas leiteiras, suplementadas ou não com diferentes óleos vegetais em diferentes tempos experimentais;
- ii. avaliar o impacto das dietas sobre o GP e o CMS dos animais;
- iii. investigar o impacto das dietas sobre o perfil lipídico sérico;
- iv. avaliar o impacto das dietas na saúde dos animais por meio da análise de parâmetros de bioquímica clínica e PFAs;
- v. caracterizar, por estratégia de metagenômica, o impacto das dietas sobre os microbiomas ruminal e fecal.

4. Material e Métodos

4.1. Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

A presente pesquisa foi submetida e aprovada pela CEUA da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob o número de protocolo 294/2019.

4.2. Local

A fase de campo foi conduzida na fazenda experimental da Universidade Federal de Viçosa (UFV), *campus* Florestal/MG. As análises laboratoriais foram realizadas na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em Belo Horizonte/MG, tanto no Laboratório de Nutrição Animal e Laboratório de Patologia Clínica, da Escola de Veterinária (EV), como no Laboratório de Genética Bioquímica (LGB) e no Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM), ambos do Instituto de Ciências Biológicas (ICB). Parte das análises ocorreu no Laboratório de Pesquisa em Patologia Clínica, do Departamento de Veterinária da UFV, *campus* Viçosa/MG.

4.3. Animais, instalações e dieta basal

Foram utilizadas 16 novilhas mestiças holandês-zebu, pertencentes ao rebanho do setor de bovinocultura leiteira da UFV *campus* Florestal, desmamadas 60 dias após o nascimento, com peso e idade médios de $250,67 \pm 26,44$ Kg e $7,3 \pm 2,1$ meses, respectivamente.

No primeiro dia de adaptação à dieta e às instalações, os animais foram vacinados (Poli-Star®, Vallée™, lote 11/19) para a prevenção de Botulismo (tipos C e D), Carbúnculo Sintomático, Gangrena Gasosa, Enterotoxemia, Doença do Rim Polposo e Morte Súbita dos Ruminantes. Neste mesmo dia, as novilhas também foram vermifugadas, com solução injetável a base de Doramectin a 1% (Dectomax®, Zoetis™) para a prevenção de nematódeos gastrintestinais e pulmonares, miíases, carrapatos, bernes, piolhos, ácaros da sarna e como auxiliar no controle da população da mosca-dos-chifres.

Os animais foram mantidos em confinamento, alojados aos pares em baias com área de $44,2\text{m}^2$. As dimensões das 8 baias foram as seguintes: área coberta com 6,0m de comprimento, 3,3m de largura e 4,0m de altura de pé direito no ponto mais alto; solário com 7,4m de comprimento e 3,3m de largura. A área coberta possuía telhas de cerâmica, piso de concreto,

comedouros de alvenaria com três repartições (dois cochos para alimentos e um cocho para mistura mineral) e bebedouro automático também de alvenaria. A área descoberta permitia aos animais o contato direto com o solo e promovia ampla ventilação, pela circulação natural do ar (Figura 1).

Figura 1 – Baias e novilhas alojadas durante a fase de campo do experimento



Fonte: arquivo do autor.

A dieta basal foi composta por silagem de milho, produzida no próprio setor de bovinocultura da UFV, *campus* Florestal, e concentrado. Esse último foi preparado em misturador de ração MFW Máquinas® modelo MRO 500 Plus e era composto por: milho moído, farelo de soja e suplemento vitamínico-mineral para mistura (NC Bovilac 50, Master Alimentos®) (Figura 2).

Figura 2 – Silagem de milho, misturador de ração e concentrado pós-mistura



Fonte: arquivo do autor.

A composição nutricional dos ingredientes da dieta está exposta na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição nutricional dos ingredientes da dieta basal

Item	Silagem de Milho	Milho Moído	Farelo de Soja	Suplemento Vit.-Min. ²
MS	30,7	88,0	89,0	95,0
MM ¹	4,3	1,60	7,30	100,0
PB ¹	7,0	10,0	49,0	0,0
EE ¹	2,3	4,3	1,5	0,0
FDN ¹	58,0	9,0	15,0	0,0
FDA ¹	33,0	3,0	10,0	0,0
Cálcio ¹	0,30	0,03	0,30	19,5
Fósforo ¹	0,19	0,30	0,68	5,0

¹Porcentagem na MS; ²NC Bovilac 50, Master Alimentos[®]; MM: matéria mineral; PB: proteína bruta; EE: extrato etéreo; FDN: fibra insolúvel em detergente neutro; FDA: fibra insolúvel em detergente ácido.

Os níveis de garantia informados pelo fabricante do suplemento vitamínico-mineral, utilizado para o preparo do concentrado, estão expostos na Tabela 2.

Tabela 2 - Níveis de garantia por quilograma do suplemento mineral-vitamínico NC Bovilac 50, Master Alimentos^{®1}

Componente	Nível de garantia
Cálcio (Mín. / Máx)	195,0 g / 210,0 g
Cobre (Mín.)	557,5 mg
Cobalto (Mín.)	12,5 mg
Ferro (Mín.)	62,50 mg
Flúor (Máx.)	500 mg
Fósforo (Mín.)	50 g
Componente	Nível de garantia
Iodo (Mín.)	31,5 mg
Magnésio (Mín.)	43,0 g
Manganês (Mín.)	1.812,5 mg
Monensina (Mín.)	360,0 mg
Selênio (Mín.)	14,5 mg
Vitamina A (Mín.)	200.000 UI
Vitamina D3 (Mín.)	50.000 UI
Vitamina E (Mín.)	1.250 UI
Sódio (Mín.)	65,0 g
Zinco (Mín.)	2.125,0 mg
BHT (Mín.)	100,0 mg

¹dados informados pelo fabricante

A silagem foi fornecida à vontade, em duas porções diárias, às 8:00h e às 16:00h, assim como o concentrado, que foi misturado no cocho no momento do fornecimento. Além do suplemento mineral, referido anteriormente, que foi incorporado ao concentrado durante a mistura mecanizada, outra mistura mineral (Mineralalpha 75, Alpha Nutrição Animal[®]), de pronto uso, foi disponibilizada à vontade aos animais em cocho individualizado no interior de cada baia. Os níveis de garantia informados pelo fabricante desta segunda mistura mineral estão expostos na Tabela 3.

Tabela 3 - Níveis de garantia por quilograma da mistura mineral Mineralalpha 75, Alpha Nutrição Animal^{®1}

Componente	Nível de garantia
Cálcio (Mín. / Máx)	135,0 g / 165,0 g
Cobre (Mín.)	1.500,0 mg
Cobalto (Mín.)	100 mg
Cromo (Mín.)	30,0 mg
Enxofre (Mín.)	26,0 g
Ferro (Mín.)	2.000,0 mg
Componente	Nível de garantia
Flúor (Máx.)	780,0 mg
Fósforo (Mín.)	78,0 g
Iodo (Mín.)	80,0 mg
Magnésio (Mín.)	20,0 g
Manganês (Mín.)	2.000 mg
Selênio (Mín.)	30,0 mg
Sódio (Mín.)	114,0 g
Zinco (Mín.)	5.000 mg

¹dados informados pelo fabricante

4.4. Delineamento experimental e testes estatísticos

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com arranjo em parcelas subdivididas, sendo as parcelas os quatro grupos experimentais, cada um designado a uma dieta específica (detalhes no item 4.5. a diante), e as subparcelas os três tempos de amostragem, ou seja, dias 0, +15 e +30 em relação ao início dos tratamentos (D+0, D+15 e D+30, respectivamente).

As fontes de variação e os respectivos graus de liberdade estão expostos nos quadros de análise de variância (ANOVA) adiante. Cada grupo experimental foi composto por quatro animais, no qual cada animal se constituiu a unidade experimental (Tabela 4).

Tabela 4 - Quadro de Análise de Variância (ANOVA) válido para todas as variáveis analisadas, exceto para os parâmetros de metagenômica ruminal e fecal, GP e CMS

Fontes de Variação	Graus de Liberdade
Parcelas (dietas)	$a - 1 = 03$
Erro A	$a(r - 1) = 12$
Subparcelas (tempos de amostragem)	$b - 1 = 02$
Interação A x B	$(a - 1)(b - 1) = 06$
Erro B	$ab(r - 1) = 36$
Total das parcelas	$ar - 1 = 15$
Total das subparcelas	$ab(r - 1) + (b - 1) + (a - 1)(b - 1) = 44$
Total	$abr - 1 = 47$

a: número de parcelas (dietas = 4); b: número de subparcelas (tempos de amostragem = 3); r: número de repetições por tratamento (animais = 4 por tratamento)

Apenas no caso da variável CMS as unidades experimentais foram as baias, com dois animais cada. Isso se deu pela impossibilidade de se aferir o consumo individual por coleta total. As fontes de variação e os graus de liberdade específicos para esse parâmetro estão expostos na Tabela 5.

Tabela 5 - Quadro de Análise de Variância (ANOVA), específico para o parâmetro CMS

Fontes de Variação	Graus de Liberdade
Parcelas (dietas)	$a - 1 = 03$
Erro A	$a(r - 1) = 04$
Subparcelas (tempos de amostragem)	$b - 1 = 02$
Interação A x B	$(a - 1)(b - 1) = 06$
Erro B	$ab(r - 1) = 14$
Total das parcelas	$ar - 1 = 7$
Total das subparcelas	$ab(r - 1) + (b - 1) + (a - 1)(b - 1) = 22$
Total	$abr - 1 = 23$

a: número de parcelas (dietas = 4); b: número de subparcelas (tempos de amostragem = 3); r: número de repetições por tratamento (baias = 2 por tratamento)

Utilizou-se o DIC, sem subdivisão em subparcelas para as variáveis GP e abundância relativa de unidades taxonômicas operacionais (OTUs), que neste caso correspondem aos domínios, filos ou gêneros microbianos obtidos das análises metagenômicas de fluido ruminal e fezes. Isso conferiu o valor de 12 graus de liberdade do erro, o que equivale ao Erro A expresso na Tabela 4. Ambas as variáveis se caracterizaram como valores únicos para todo período experimental, ao contrário das demais respostas, para as quais se obteve valores em três tempos de amostragem. O GP foi calculado pela subtração do peso de cada animal em D+30 pelo peso em D+0. Já a abundância relativa de OTUs, no rúmen e nas fezes, foi obtida em amostras colhidas de cada animal em D+30.

Sampaio (2010) propõe o cálculo do número de repetições por tratamento (r) em função do intervalo de confiança da média (IC), ao se considerar o percentual de oscilação em torno da média (Δ), o valor de t (valor tabelado em função dos graus de liberdade do erro e da probabilidade do erro tipo I) e o desvio padrão da média (s) pela aplicação da seguinte equação:

$$\Delta = \frac{ts}{\sqrt{r}}$$

Como o presente estudo avalia o comportamento de diversas variáveis frente aos tratamentos, buscou-se utilizar a variável mais instável como referência para o cálculo de r, ou seja, a variável que tenha apresentado o maior coeficiente de variação (CV) em estudos prévios. A avaliação de dados da literatura, relativos às variáveis analisadas no presente estudo, permitiu identificar o maior CV para os dados de glicemia. Tendo como referência o estudo de Laguna et al. (2017), a média de glicemia obtida das vacas utilizadas no experimento foi igual a 65,56 $\pm$ 9,84 mg/dL, o que resulta em um CV igual a 15,01%. Nesse caso, ao se aplicar a equação referida anteriormente e ao se considerar o valor de t igual a 1,782 (considerando 12 graus de liberdade para o erro A e 10% de probabilidade do erro tipo I), o valor de s igual a 9,84 mg/dL e o valor de Δ igual a 15% da média, ou seja, 9,83 mg/dL, se obtém um valor de r igual a 3,18. Esse resultado explica a escolha pelo número de 4 repetições (animais) por tratamento no presente estudo.

Foram realizados os testes estatísticos de Komogorov-Smirnov (Massey, 1951) e de Levene (1960), para averiguar a normalidade dos dados e a homoscedasticidade das variâncias, respectivamente, nas diferentes respostas analisadas. Confirmados os pressupostos para o uso da estatística paramétrica, ou seja, dados com distribuição normal e variâncias homocedásticas, as médias foram comparadas pelo teste F de Fisher com pós-teste de Tukey (Sampaio, 2010),

em um nível de significância de 5%. Se um dos pressupostos para o uso da estatística paramétrica não foi cumprido, as medianas foram comparadas por meio de testes da estatística não paramétrica, também em um nível de significância de 5%: teste de Friedman (1937), para variáveis dependentes (tempos de amostragem em cada dieta, neste caso); teste de Kruskal e Wallis (1952), para variáveis independentes (dietas dentro de cada tempo, neste caso); pós-teste de Dunn (1964).

Para as análises estatísticas dos dados de metagenômica ruminal e fecal, confirmados os pressupostos para o uso da estatística paramétrica, as médias dos valores de abundância relativa de OTUs foram comparadas pelo teste F de Fisher com pós-teste de Bonferroni (Dunn, 1961), em um nível de significância de 5%.

As análises estatísticas e as figuras foram obtidas com o auxílio dos softwares Sisvar®, versão 5.0, Minitab™, versão 8.1 e GraphPad Prism™, versão 7.0.

4.5. Grupos experimentais

Todas as novilhas passaram por um período de 15 dias de adaptação às instalações e à dieta basal, sem inclusão de óleo (D-15 a D+0). A partir daí se deu o sorteio, alocação dos animais nos grupos experimentais e início dos tratamentos, os quais foram administrados por 30 dias (D+0 a D+30).

No dia D+0, após a coleta das biópsias hepáticas e das amostras de sangue pela manhã, deu-se início à inclusão de óleo nas dietas dos grupos experimentais no trato da tarde, exceto para o grupo controle. Os tratamentos, nos grupos, foram distribuídos da seguinte forma: (i) dieta basal sem inclusão de óleo, (ii) dieta basal com inclusão de 4% de óleo de algodão na MS (Flor de Algodão®, Icofort™), (iii) dieta basal com inclusão de 4% de óleo de girassol na MS (Liza®, Cargill™), (iv) dieta basal com inclusão de 4% óleo de soja na MS (Liza®, Cargill™).

O fabricante do óleo de algodão informa os seguintes ingredientes: óleo vegetal refinado de semente de algodão, antioxidante terc-butil-hidroquinona (TBHQ), ácido cítrico e antiespumante dimetilpolisiloxano. No caso do óleo de soja o fabricante destaca se tratar de óleo 100% puro e refinado de soja geneticamente modificada (*Agrobacterium tumefaciens* e *Bacillus thuringiensis*). Para o óleo de girassol, o fabricante descreve este produto como o único

ingrediente presente no frasco. As composições nutricionais informadas pelos fabricantes dos referidos óleos estão expostas na Tabela 6.

Tabela 6 - Composição nutricional dos diferentes óleos utilizados¹

Parâmetro	Óleo de Algodão ²	Óleo de Girassol ³	Óleo de Soja ⁴
Valor energético	108 Kcal	108 Kcal	108 Kcal
Carboidratos	0 g	0 g	0 g
Proteínas	0 g	0 g	0 g
Gorduras totais	12 g	12 g	12 g
Gorduras saturadas	3,1 g	1,2 g	2,0 g
Gorduras trans	Não contém	Não contém	Não contém
Gorduras monoinsaturadas	2,3 g	Não informa	2,9 g
Gorduras poliinsaturadas	6,4 g	Não informa	7,1 g
Ácido linolênico	0,1 g	Não informa	Não informa
Ácido linoléico	6,3 g	Não informa	Não informa
Colesterol	0 g	Não informa	0 g
Fibra alimentar	0 g	0 g	0 g
Sódio	0 mg	0 g	0 g
Vitamina E	4,3 mg	4,8 mg	1,7 mg

¹Porção de 13 mL ou 1 colher de sopa; dados informados no rótulo de cada frasco; ²Flor de Algodão®, Icofort™; ³Liza®, Cargill™; ⁴Liza®, Cargill™

Os óleos foram misturados ao concentrado no momento de seu fornecimento, em recipiente apropriado, um para cada tipo de óleo, com auxílio de utensílio de aço inoxidável e de batedeira (M.K. Eletrodomésticos Mondial S.A., modelo Prática Black 350 W), em velocidade máxima por 2 minutos, até a completa homogeneização. A opção pela mistura do óleo ao concentrado no momento de seu fornecimento foi feita para que se evitassem perdas de qualidade do material, especialmente aquelas decorrentes da rancificação, e para que se garantisse a adequada quantidade de óleo a ser fornecida diariamente aos animais.

Os critérios para a seleção dos óleos foram características qualitativas, quantitativas e de diversidade, no que se refere aos seus perfis de ácidos graxos. O óleo de algodão destaca-se dos demais pela maior proporção de ácidos graxos saturados, o óleo de girassol por possuir maior proporção de ácidos graxos insaturados, especialmente o ácido linoleico (n-6), e o óleo de soja destaca-se pela maior proporção de ácido α -linolênico (n-3) (Raymon *et al.*, 2016). Adicionalmente, se buscou utilizar óleos que tivessem aplicabilidade na rotina dos criadores de bovinos. Portanto o preço e a disponibilidade de mercado também foram levados em consideração (Tabela 7).

Tabela 7 - Composição em ácidos graxos¹ e preço de aquisição no varejo dos óleos utilizados²

Ácidos graxos	Óleo de algodão (%p/p)	Óleo de girassol (%p/p)	Óleo de soja (%p/p)
Saturados	26,0	12,0	15,0
Oleico, n-9	19,0	19,0	24,0
Linoleico, n-6	50,5	68,0	50,8
α -Linolênico, n-3	1,0	1,0	6,8
Preço (R\$)	4,99	6,98	4,09

¹Composição em % do peso do total de ácidos graxos; adaptado de Raymon et al. (2016). ²Preço em reais (R\$) relativo a 900mL em dezembro de 2019; óleo de algodão, Flor de Algodão[®], IcofortTM; óleo de girassol, Liza[®], CargillTM; óleo de soja Liza[®], CargillTM.

Nos tratamentos com inclusão de óleo, as quantidades de volumoso e concentrado oferecidas aos animais foram ajustadas, a fim de se obter dietas isoproteicas (14% de PB na MS) e isoenergéticas (71% de nutrientes digestíveis totais – NDT na MS). A composição percentual dos ingredientes da dieta, exposta na Tabela 8, foi calculada com base nas exigências nutricionais e na composição dos alimentos estabelecidas pelo NRC (2001), com o auxílio do software Spartan Ration Evaluator/Balancer for Dairy CattleTM, Michigan State University.

Tabela 8 - Composição percentual e níveis nutricionais das dietas experimentais

Ingredientes	Dietas			
	Controle (% da MS)	Algodão (% da MS)	Girassol (% da MS)	Soja (% da MS)
Silagem de milho	49,5	65,5	65,5	65,5
Fubá de milho	32,3	9,2	9,2	9,2
Farelo de soja	16,4	18,7	18,7	18,7
Sup. Mineral ¹	1,8	2,4	2,4	2,4
Óleo de algodão	-	4,2	-	-
Óleo de girassol	-	-	4,2	-
Óleo de soja	-	-	-	4,2
PB	14,70	14,60	14,60	14,60
NDT	71,90	71,50	71,50	71,50
FDA	18,90	23,80	23,80	23,80
FDN	34,10	41,60	41,60	41,60
EE	2,80	6,30	6,30	6,30
MM	5,70	6,80	6,80	6,80
Ca	0,56	0,73	0,73	0,73
P	0,40	0,40	0,40	0,40

Nota: o teor de matéria seca total foi de 45,8% para a dieta controle e 39,8% para as dietas com incorporação de óleo¹ NC Bovilac 50, Master Alimentos[®]

4.6. Obtenção de biópsias hepáticas e amostras de sangue

Biópsias hepáticas e coletas de sangue foram realizadas em cada animal nos dias 0, +15 e +30 em relação ao início dos tratamentos (D+0, D+15 e D+30). O método de obtenção das biópsias seguiu o procedimento descrito por Angeli et al. (2019) em conformidade a padrões rigorosos de bem-estar animal e de higiene. As instalações permitiram que os animais fossem diretamente e calmamente conduzidos por corredores, das baias até o local onde eram contidos. A contenção foi realizada em equipamento de dupla função: balança eletrônica/tronco de contenção (Coimma[®], modelo convencional).

Com o animal devidamente contido no final do corredor para deslocamento da baia ao tronco-balança, o campo operatório foi demarcado e foram realizados, nesta ordem: limpeza

inicial com água e sabão neutro; tricotomia, com lâmina em aço inoxidável enriquecido com platina e cromo (BIC[®] Chrome Platinum); primeira antissepsia, com conjunto escova-esponja embebido em solução com tensoativos e 2% de digliconato de clorexidina (Riohex[®] 2%, lote 1900093); enxágue com álcool 70% (EMFAL[®], álcool 70° INMP, lote 0201.0151-08/19). Durante a antissepsia com o referido conjunto escova-esponja, volumes adicionais de solução com tensoativos e 2% de digliconato de clorexidina (Riohex[®] 2%, lote 1903421) foram utilizados, até a obtenção de ampla cobertura da solução em toda a área de pele tricotomizada (Figura 3).

Figura 3 – Preparação inicial do campo operatório para biópsia



Fonte: arquivo do autor.

Em seguida, os animais foram posicionados e contidos, um de cada vez, dentro do tronco-balança e a anestesia local foi realizada por infiltração subcutânea, na linha de incisão cirúrgica, com 5mL de solução de cloridrato de lidocaína à 2% (Dorfin[®], Ceva[™], lote 001/19). Um novo conjunto escova-esponja embebido em solução com tensoativos e 2% de digliconato de clorexidina (Riohex[®] 2%, lote 1900093) foi utilizado para a segunda antissepsia, seguida de enxágue com álcool 70% (EMFAL[®], álcool 70° INMP, lote 0201.0151-08/19) (Figura 4).

Figura 4 - Anestesia local e antisepsia do campo operatório



Fonte: arquivo do autor.

Na sequência, foi realizada incisão de 1 cm, aproximadamente, com lâmina em aço carbono descartável para bisturi, número 22 (SteriLance Medical, Suzhou, Inc., China), no 11º espaço intercostal do antímero direito, ao nível do trocanter maior, ponto este correspondente à posição topográfica do lobo direito do fígado. Ultrassonografia, com aparelho Mindray®, modelo DP-2200Vet, foi utilizada como forma de averiguar o correto posicionamento da incisão (Figura 5).

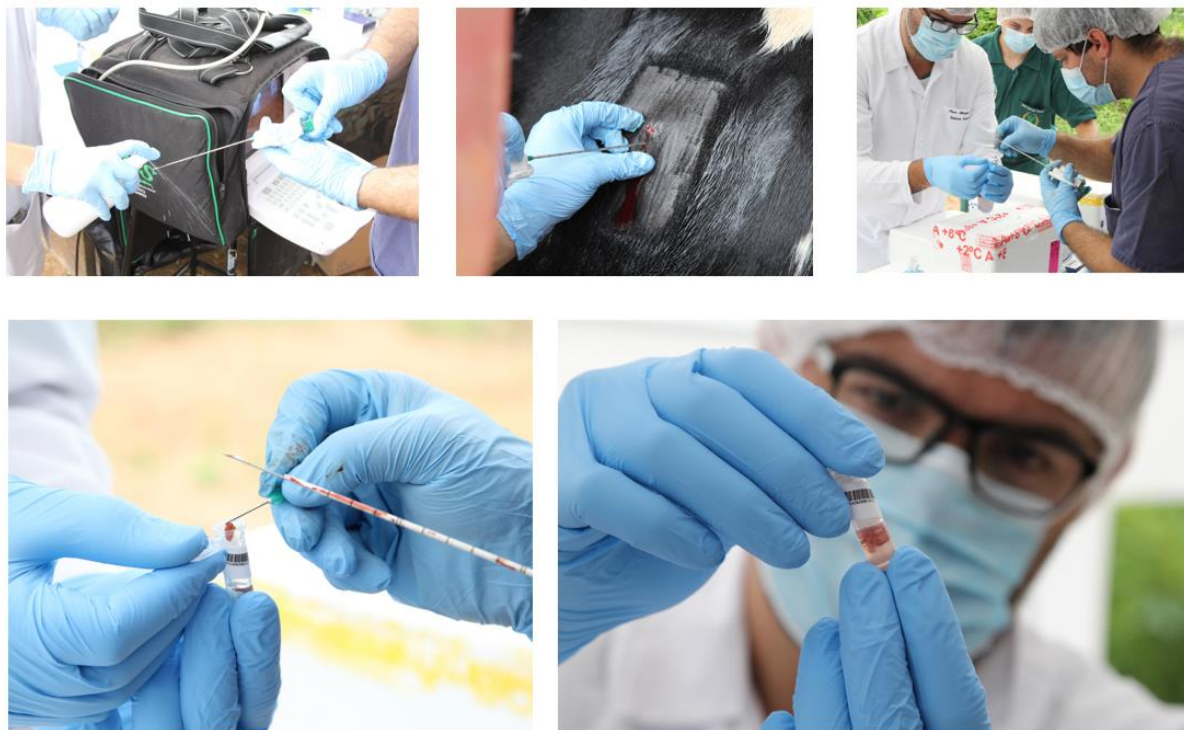
Figura 5 – Ultrassonografia da região abdominal direita em novilha contida em tronco-balança



Fonte: arquivo do autor.

Para obtenção do tecido hepático foram utilizadas cânulas estéreis para biópsia de tecidos moles semiautomáticas, 14G x 15 cm (Biomedical Srl[®], Itália). Imediatamente após serem retiradas das embalagens, foi aplicada solução de purificação (RNaseZAP[™], Ambion[™], Estados Unidos) em toda a superfície das cânulas para a eliminação de possíveis contaminações com RNases. Após sucessivas inserções da cânula através da incisão cirúrgica, um total de cerca de 200 mg de tecido hepático foi coletado. Durante a colheita, o tecido foi retirado da cânula com o auxílio de agulha hipodérmica descartável estéril. Imediatamente após coletados, os fragmentos de tecido hepático foram acondicionados em microtubos livres de RNase e DNase (cerca de 50 mg de tecido em cada tubo), com capacidade para 2mL (Kasvi[™]), os quais continham 500 µL de solução estabilizadora de RNA (RNAlater[™], Ambion[™], Estados Unidos) (Figura 6).

Figura 6 – Procedimento de biópsia hepática para extração de RNA



Fonte: arquivo do autor.

Todos os tubos com amostras de tecido hepático foram transportados, devidamente acondicionados em caixas de fibras de papelão com rack para microtubos (Kasvi™), dentro de caixas de poliestireno com gelo artificial, até o armazenamento em ultra freezer à -80°C, no Laboratório de Genética Bioquímica no ICB-UFMG.

Ao término da biópsia foram realizados os procedimentos de sutura, limpeza final do campo cirúrgico e aplicação de *spray* cutâneo com solução de ação repelente, inseticida, acaricida e antimicrobiana (Couro Limpo Prata®, Noxon®) (Figura 7).

Figura 8 - Sítio cirúrgico dos dezesseis animais após transcorridos sete dias da primeira biópsia hepática



Fonte: arquivo do autor.

Logo em seguida às biópsias, amostras de sangue foram coletadas de todos os animais para análises de bioquímica sérica. Após limpeza e assepsia com álcool 70%, um volume de 10 mL de sangue foi coletado na veia coccígea, com agulha estéril para coleta a vácuo 25 x 0,8 mm (Shandong Weigao Group Medical Polymer Co., Ltd., China), e distribuído em dois tubos para coleta de sangue a vácuo: um com fluoreto de sódio (tampa cinza) e um sem anticoagulante (tampa vermelha) (Figura 9).

Figura 9 - Coleta de sangue na veia coccígea



Fonte: arquivo do autor.

As amostras de sangue, nos tubos, foram transportadas em caixas de poliestireno com gelo reciclável até o laboratório de análises clínicas da Escola de Veterinária da UFMG. Logo em seguida, os tubos com fluoreto de sódio e os tubos sem anticoagulante, foram centrifugados por 15 minutos a 2000 x g. Após a centrifugação, as amostras de soro foram retiradas, armazenadas em microtubos e congeladas a -20°C, para posteriores análises de bioquímica sérica.

4.7. Genes selecionados para análise de expressão diferencial no tecido hepático

Cinco genes alvo do PPAR- α , que codificam proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos, foram selecionados para análise. Para todos os genes escolhidos o efeito regulatório do PPAR- α já foi demonstrado em estudos *in vitro* com tecidos bovinos (Bionaz, Thering e Loor, 2012; Weld, Erb e White, 2019; Zhou *et al.*, 2014). Foram selecionados ainda o gene codificador do próprio receptor PPAR- α e três genes de referência: β -actina (ACTB), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e proteína ribossômica S9 (RPS9). A Tabela 9 expõe a lista completa com os nove genes avaliados bem como a descrição, o local onde se situam e a função das proteínas codificadas por eles.

4.8. Extração e purificação do RNA das amostras de tecido hepático

A análise quantitativa dos níveis de mRNA pelo método de RT-qPCR demanda minuciosos cuidados e checagens de qualidade, desde a etapa de coleta do tecido, como já descrito em itens anteriores, como nas etapas de extração e purificação do RNA, descritas a seguir.

4.8.1. Preparo do ambiente, homogeneização do tecido hepático e extração do RNA

Todos os procedimentos foram realizados em laboratório climatizado e os locais de trabalho, nas bancadas, foram higienizados com álcool 70% e forrados com papel pardo. Além disso, durante todos os procedimentos, os laboratoristas utilizaram luvas de nitrila, toucas e máscaras descartáveis.

Tabela 9 - Genes selecionados para quantificação dos níveis de mRNA em tecido hepático bovino

Gene	Descrição	Local	Função
ACTB	β -actina (gene de referência)	CITO	Estrutura e motilidade
ANGPTL4	Proteína semelhante à angiopoietina 4	EC	Regulação metabólica ¹
CD36	Ácido graxo translocase	MP	Transporte de AG através da MP
CPT1A	Carnitina Palmitoiltransferase 1A	MM	Transporte de palmitoil-CoA através da MM
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (gene de referência)	CITO	Via glicolítica
HMGCR	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase	CITO	Síntese de colesterol
OCTN2	Transportador de cátions orgânicos 2	MP	Transporte de carnitina
PPARA	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa	N, CITO	Transcrição gênica
RPS9	Proteína ribossomal S9 (gene de referência)	CITO	Estrutura ribossomal

¹Metabolismo de glicose e de lipídeos; CITO = citosol; EC = extracelular; MM = membrana mitocondrial; MP = membrana plasmática; N = núcleo

Após retirados do freezer e enquanto ainda não eram manipulados, todos os reagentes e os microtubos com as amostras e a solução RNeasyTM, foram mantidos em caixa de poliestireno com gelo triturado.

A primeira etapa da homogeneização do tecido hepático envolveu a sua retirada dos microtubos contendo a solução RNeasyTM, com o auxílio de pinça cirúrgica autoclavada. Os tecidos foram transferidos para um novo microtubo estéril livre de DNase e RNase, com tampa de 6 mm e capacidade para 2 mL (Loccus®), o qual continha duas *beads* em aço de 2,8

mm (Loccus®). Os tubos também continham 1 ml do reagente TRIzol™ (Thermo Fisher Scientific™, lote 317903). Em seguida, esses microtubos contendo os tecidos foram levados à homogeneização em aparelho Precellys 24 Tissue Homogenizer™ (Bertin Instruments™), por 15 segundos a 6.000 RPM. Imediatamente após homogeneizados, os tubos foram submersos em nitrogênio líquido, para congelamento instantâneo, a fim de se evitar perdas de integridade do RNA pelo calor gerado com o atrito.

Na sequência, as amostras homogeneizadas foram descongeladas em gelo triturado, em seguida permaneceram em temperatura ambiente por 5 min para então serem centrifugados a 4°C, por 10 min a 12.000 x g, segundo as recomendações do fabricante do reagente TRIzol™. A centrífuga refrigerada, utilizada nessa e em todas as etapas seguintes, foi da marca Eppendorf™, modelo 5415 R. Após a referida centrifugação, as amostras foram cuidadosamente transferidas para um novo microtubo, no qual foram adicionados 200 µL de clorofórmio P.A. 100% (Synth®). Após vigorosa agitação manual por 15 segundos, as amostras foram acondicionadas em caixa de poliestireno com gelo triturado por 3 min. Os microtubos foram então centrifugados a 4°C, por 15 min a 12.000 x g, segundo as recomendações do fabricante do reagente TRIzol™. Em seguida, aproximadamente 400 µL de sobrenadante foram removidos e transferidos para outro microtubo. A esta fração, que continha RNA, foram adicionados e homogeneizados volumes iguais de etanol absoluto para biologia molecular (Sigma-Aldrich™), a fim de se iniciar a purificação do RNA por kit comercial, como descrito a seguir.

As etapas seguintes envolveram a purificação do RNA em coluna, por meio do kit comercial RNeasy Mini Kit™ (Qiagen™). Inicialmente, o conteúdo do microtubo da etapa anterior foi vertido na coluna, *mini spin column*, fornecida no referido kit e, em seguida levado à centrifugação a 4° C, por 1 min a 8.000 x g. Na sequência, após descarte do eluído, foram adicionados 350 µL do tampão RWI, fornecido no kit, e foi realizada nova centrifugação a 4°C, por 1 min a 8.000 x g. Após descarte do eluído, foram adicionados 80 µL de solução DNase I livre de RNase (Qiagen™) diluída em tampão RDD (Qiagen™), na proporção 1:7, totalizando 300 unidades Kunitz.

Após reação de digestão por 15 min em temperatura ambiente, foram realizadas três lavagens sequenciais, uma com 350 µL do tampão RWI e duas com 500 µL do tampão RPE, fornecidos no RNeasy Mini Kit™ (Qiagen™), com centrifugação a 4°C, por 1 a 2 min a 8.000 x g cada. Após descarte dos eluídos, o RNA foi extraído da coluna pela adição de 50 µL de

água ultrapura para biologia molecular (Phoneutria Biotecnologia®, lote 0122) e centrifugação a 4°C, por 1 min a 8.000 x g. O RNA purificado foi armazenado em ultrafreezer, à -80°C.

4.8.2. Análise da concentração, pureza e integridade do RNA extraído

A estimativa da concentração de RNA, em ng/μL, na solução obtida após a extração, bem como a análise da pureza da mesma, foi realizada em espectrômetro NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific™) e os dados obtidos estão expostos na Tabela 10. O grau de pureza foi avaliado pela razão entre as absorbâncias nos comprimentos de onda 260/280 nm. Segundo Desjardins e Conklin (2010), RNA puro produz valores próximos de 2 para a referida razão.

Tabela 10 - Concentração de RNA e razão entre as absorbâncias nos comprimentos de onda 260/280 nm

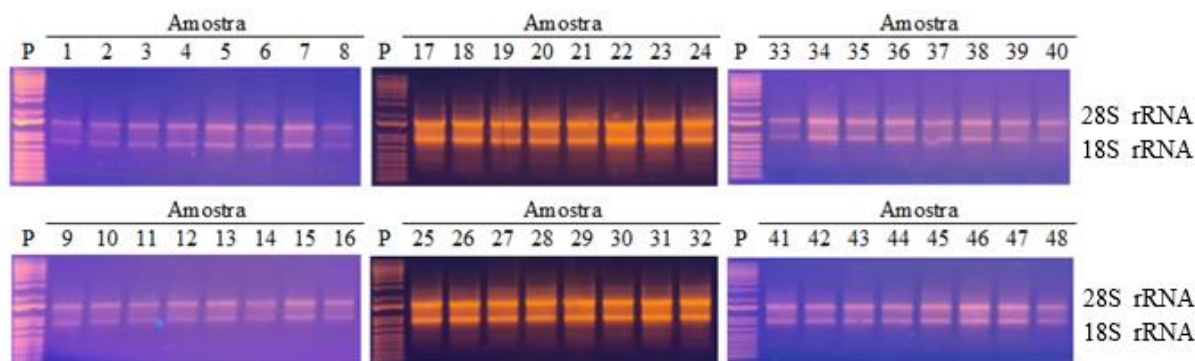
Amostra	[RNA] (ng/μL)	260/280	Amostra	[RNA] (ng/μL)	260/280	Amostra	[RNA] (ng/μL)	260/280
1	1.171,3	2,15	17	759,3	2,14	33	956,8	2,15
2	421,2	2,06	18	1.103,1	2,12	34	729,1	2,13
3	530,7	2,18	19	610,4	2,14	35	873,6	2,15
4	798,1	2,16	20	618,1	2,18	36	987,1	2,13
5	817,2	2,16	21	513,6	2,18	37	613,6	2,13
6	802,7	2,15	22	720,1	2,12	38	1.152,2	2,14
7	913,0	2,14	23	359,8	2,07	39	884,5	2,13
8	995,4	2,14	24	762,8	2,16	40	894,3	2,15
9	900,8	2,15	25	503,8	2,22	41	894,9	2,14
10	786,0	2,15	26	715,4	2,18	42	721,0	2,10
11	847,8	2,14	27	929,9	2,17	43	858,0	2,11
12	884,6	2,13	28	687,2	2,20	44	893,4	2,11
13	1.305,8	2,15	29	749,7	2,17	45	730,7	2,15
14	630,6	2,18	30	424,6	2,04	46	1.103,8	2,11
15	927,1	2,15	31	527,9	2,20	47	1.133,6	2,13
16	598,1	2,18	32	608,3	2,13	48	851,8	2,13

A integridade do RNA extraído foi avaliada por corrida em gel de eletroforese a fim de se detectar as bandas de RNA ribossomal 28S e 18S. Inicialmente, foi preparada uma solução tampão, necessária para produção do gel e para a corrida (tampão TAE). A solução continha Tris-Aminometano (54,2% p/v), ácido acético glacial (5,7% p/v), EDTA 0,5M pH 8,0 (10% v/v) e água Milli-Q qsp 1L. Para o preparo do meio de corrida, para cada 16 amostras, foram preparados 60 mL de gel a 1% de agarose (0,6 g de agarose em 60mL de TAE diluído em água destilada na proporção de 1:50). A solução foi aquecida em micro-ondas por cerca de 40 segundos, até a completa solubilização. Após alcançada a temperatura de contato foi adicionado brometo de etídio, na concentração de 1 μ L para cada 20 mL de solução. Em seguida, a solução foi depositada em cuba com 2 pentes, para 13 poços cada, e aguardou-se a polimerização e solidificação do gel.

Para a corrida eletroforética, foi utilizada cuba Bio-Rad wide mini-sub cell™. Após a inclusão do suporte com o gel solidificado na cuba, um volume de cerca de 500 mL do tampão TAE foi adicionado, quantidade esta suficiente para cobrir o gel. Nos poços de corrida do padrão de peso molecular (1Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen by Thermo Fischer Scientific™, lote 00821660) foram adicionados 10 μ L de uma solução preparada com 1 μ L do padrão, 1 μ L do tampão de amostra presente no kit do padrão e 8 μ L de água Milli-Q. Nos demais poços foram adicionados 10 μ L de solução preparada com 1 μ L do tampão de corrida do kit do padrão e 9 μ L de outra solução preparada com o produto da extração do RNA e água Milli-Q. Essa última foi produzida de modo a se obter um total de 150 ng do referido ácido nucléico. Para a realização dos cálculos dos volumes pipetados da solução de RNA, foram utilizados os dados de concentração obtidos em espectrômetro NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific™) e disponibilizados na Tabela 10.

Após a alocação do padrão e das amostras nos poços do gel, deu-se o início à corrida por meio da aplicação de corrente elétrica (90 V). A foto documentação foi realizada após 40 min do início da corrida em aparelho transiluminador (Loccus®). Os resultados obtidos nesta etapa, para as 48 amostras, evidenciaram satisfatória integridade do RNA extraído, haja vista a nitidez das bandas de RNA ribossomal (rRNA) 28S e 18S, conforme apresentado na Figura 10.

Figura 10 - Gel de eletroforese de RNA total extraído das biópsias de fígado bovino



P: padrão 1Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen (Thermo Fischer Scientific™; amostras para cada animal em D+0 (1 a 16), em D+15 (17 a 32) e em D+30 (33 a 48); gel de agarose a 1% em TAE, corado por brometo de etídio; Fonte: arquivo do autor.

4.9. Determinação da expressão gênica diferencial em tecido hepático

A síntese do DNA complementar (cDNA), a partir do RNA extraído das amostras de fígado bovino, foi realizada por meio do kit comercial High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit™ (AppliedBiosystems, Thermo Fisher Scientific™), conforme orientações do fabricante. Para as reações de RT-qPCR em tempo real, utilizou-se o equipamento Rotor-Gene Q (número de série R0716146, Qiagen™, Venlo, Holanda). As reações ocorreram segundo o protocolo padrão do equipamento. A sequência dos binômios tempo-temperatura foram: 95°C por 20 segundos, 60°C por 20 segundos e 72°C por 20 segundos. Após 40 ciclos, se deu a determinação da curva de dissociação (*melting*), por meio da variação de temperatura, de 55°C até 95°C, com elevação de 1°C a cada minuto.

Para as análises, além do cDNA, utilizou-se o kit PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (AppliedBiosystems, Thermo Fisher Scientific™, lote 01014977), de acordo com as orientações do fabricante. Água ultrapura para biologia molecular (Phoneutria Biotecnologia®, lote 0122) também foi utilizada.

O número de acesso no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e a sequência dos primers dos nove genes selecionados na espécie bovina (*Bos taurus*) estão expostos na Tabela 11.

Tabela 11 - Gene, número de acesso no GenBank, direção e sequência dos primers na espécie bovina (*Bos taurus*)

Gene	GenBank	Direção	Primers (5'-3') ²	Produto (pb)
ACTB	NM_173979.3	F	CAGGATGCAGAAAGAGATCACTGC	222
		R	AGGGTGTAAACGCAGCTAACAG	
ANGPTL4	NM_001046043	F	AGGAAGAGGCTAGCCCAAGAT	109
		R	CCCTCTCTCCCTCTTCAAACAG	
CD36	X91503	F	GTACAGATAGCAGCCTCATTTCC	81
		R	TAGGACCTAGCAAATATCAGAGGA	
CPT1A	NM_001304989.2	F	CCAAATCATGCACTGTTGACCA	109
		R	AAAACCTGAGAGACAAGCCCA	
GAPDH	U85042	F	GTCTTCACTACCATGGAGAAGG	197
		R	TCATGGATGACCTTGGCCAG	
HMGCR	BC153262	F	ACCCATGAGCGAGGTGTATC	241
		R	TAGTGCTGGCCACAAGACAG	
OCTN2	BC105377	F	CACAGTGGTCAGGAACATGG	181
		R	AATGGTGTCTGGGAGTGGAG	
PPARA	NM_001034036	F	AGGGCTGCAAGGGTTTCTTTAG	363
		R	TGACGAAAGGCGGGTTGTTGTTG	
RPS9	NM_001101152	F	AAGCTGATCGGCGAGTATG	140
		R	GCATTACCTTCGAACAGACG	

¹direção do primer (F = forward; R = reverse).

A sequência da maioria dos primers foi obtida da literatura: Hammon et al. (2003), para ACTB e GAPDH; Bionaz, Thering e Looor (2012), para ANGPTL4 e CD36; Laguna et al. (2017), para HMGCR e PPARA; Zhou et al. (2014), para OCTN2; Graber et al. (2010), para RPS9. Para o gene CPT1A, os primers foram desenhados com auxílio da ferramenta Primer-Blast™ disponível no site do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Os primers foram adquiridos da empresa Síntese Biotecnologia™, distribuidora exclusiva de Integrated DNA Technologies (IDT™) no Brasil.

Inicialmente foi feita a padronização dos primers e do cDNA, para se definir as concentrações ótimas para ambos. Assim, foram testadas três concentrações de cDNA (50, 100 e 200 ng/μL) frente a três concentrações de primer (5, 10 e 15 μM). De modo geral, os melhores desempenhos foram obtidos com o binômio 200 ng/μL de cDNA e 5 μM de primer. O cálculo

dos volumes das soluções a serem pipetados para que se obtivesse, para todas as amostras, 200 µg de cDNA, foram feitos com base nas concentrações deste último medidas em espectrômetro NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific™).

4.10. Determinação do CMS e do GP dos animais

O CMS foi determinado diariamente (D-7 a D+30), por meio da pesagem dos alimentos oferecidos e das sobras. Amostras compostas foram coletadas de alimentos oferecidos e sobras, e seu conteúdo de MS foi determinado seguindo as recomendações da AOAC International (AOAC, 2012).

O GP dos animais foi determinado pela pesagem das novilhas em tronco de contenção/balança eletrônica (Coimma™, modelo convencional) em dois momentos: D+0 e D+30. O CMS, em função do peso vivo (PV), foi obtido como a razão entre o CMS da baia e o PV combinado dos dois animais ali alojados.

4.11. Bioquímica sérica

Como já abordado, neste trabalho analisou-se a expressão gênica diferencial hepática para avaliar os efeitos epigenéticos (nutrigenômicos) das dietas bem como o CMS e o GP para avaliar o desempenho e estado de saúde geral dos animais. Paralelamente, dezenas de parâmetros de bioquímica sérica (detalhados a seguir) também foram analisados em amostras de sangue para se averiguar os efeitos das dietas e dos tempos de amostragem sobre o perfil de lipídeos séricos, sobre parâmetros de bioquímica clínica e sobre PFA, essas últimas como marcadores do estado inflamatório dos animais.

4.11.1. Lipídeos séricos e bioquímica clínica

Foram determinadas por colorimetria, por meio do uso do analisador bioquímico Cobas Mira Plus® (Roche Diagnostic Systems™, Suíça) e de kits comerciais para análises colorimétricas enzimáticas (BioTécnica®), as concentrações séricas de colesterol total (CT), lipoproteínas de alta densidade (HDL), triacilgliceróis (TAG), β-hidroxibutirato (BHB), ácidos

graxos não esterificados (NEFA), aspartato aminotransferase (AST), γ -glutamilttransferase (GGT), lactato desidrogenase (LDH), albumina, creatinina, glicose, lactato, ureia e proteína total (PT). O aparelho foi programado manualmente com auxílio do calibrador Autocal H® (BioTécnica®) e, em seguida foi testado com soro controle Quantinorm® (BioTécnica®). Previamente às análises, as amostras de soro dos animais foram aquecidas em aparelho de banho seco (modelo K80-S02®, Kasvi™), até que alcançassem a temperatura de 37°C.

4.11.2. PFA

Para as análises laboratoriais das PFAs, amostras congeladas de soro sanguíneo foram transportadas até o Laboratório de Pesquisa em Patologia Clínica, do Departamento de Veterinária da UFV, *campus* Viçosa/MG, em caixas de poliestireno com gelo reciclável.

A fim de se determinar os níveis séricos das proteínas ceruloplasmina, transferrina, α -1-glicoproteína ácida, apolipoproteína A4, apolipoproteína A1, α -2 macroglobulina, IgG de cadeia leve, IgG de cadeia pesada e haptoglobina, realizou-se eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme a técnica descrita por Laemmli (1970) modificada. A corrida foi realizada no sistema vertical de eletroforese Protean II XI, Vertical Electrophoresis Cells® (Bio-Rad™, Estados Unidos). Para o preparo do gel, no quarto superior do aparato de polimerização, a fim de que se ocorresse o empilhamento das proteínas, utilizou-se gel de poliacrilamida a 4%. A partir daí se utilizou a concentração de 10% de poliacrilamida. Para o fracionamento das proteínas, foram realizadas preparações pela diluição de 10 μ L de soro sanguíneo em 30 μ L de tampão fosfato salina (PBS) e 20 μ L de tampão de amostra.

Posteriormente, as preparações foram aquecidas em água em ebulição por 10 minutos. A cada procedimento de separação de proteínas, uma alíquota de 10 μ L de cada preparação foi pipetada em 17 de um total de 20 cavidades no gel de corrida. Nas outras três cavidades restantes, foram pipetadas: (i) 20 μ L de um padrão comercial, com proteínas de peso molecular conhecido (Precision Plus Protein™ Standards, Bio-Rad™, Estados Unidos); (ii) 10 μ L de um preparo com a proteína albumina sérica bovina (BSA) isolada; (iii) 10 μ L de um soro controle com proteínas de pesos moleculares conhecidos, determinados por espectrometria de massa no Núcleo de Análises de Biomoléculas (NUBIOMOL), da UFV, em espectrômetro de massas

MALDI (ionização e dessorção a laser assistida por matriz), com separador de íons por tempo de voo (TOF/TOF), modelo Ultraflex III (Brucker Daltonics®).

Após a deposição das soluções nas cavidades do gel, todo o conjunto do sistema de eletroforese foi montado, incluindo a adição de solução tampão de amostra nas extremidades inferior e superior da cuba. A passagem de corrente elétrica foi então iniciada a 100 Volts, por meio da fonte elétrica modelo PowerPac™ Basic (300V, 400mA, 75W) (Bio-Rad™, Estados Unidos). Passados 60 min do início da corrida, com as amostras já presentes no gel de separação, a corrente elétrica foi aumentada em 50% do valor inicial. Após mais 60 min, a voltagem foi então aumentada para 200 Volts, valor em que permaneceu até o fim da corrida.

Ao término da corrida, o gel foi retirado da placa e mergulhado em solução de azul de Coomassie® R-250 a 0,2%. Foi submetido a movimentação horizontal constante em agitador de laboratório orbital, modelo Laboshake™ (Gerhardt GmbH & Co. KG, Alemanha), por 30 minutos. Após ser colorido uniformemente, o gel foi submerso em solução descorante à base de metanol e ácido acético para retirada do excesso de corante e obtenção da nitidez das bandas proteicas no gel.

Por fim, os pesos moleculares e as concentrações das frações proteicas foram determinados por densitometria computadorizada (software LabImage 1D®, Loccus™), a partir do escaneamento das bandas nos géis em aparelho fotodocumentador (Bio-Rad™). Para o cálculo do peso molecular, utilizou-se marcadores de pesos moleculares de 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 e 10 kDa, além do soro controle espécie específico, cujas proteínas presentes eram previamente identificadas por meio de espectrometria de massa, conforme descrito anteriormente. Para a avaliação densitométrica das bandas proteicas foram confeccionadas curvas de referência a partir da leitura do marcador padrão.

4.12. Metagenômica ruminal e fecal

A identificação dos microrganismos presentes no fluido ruminal e nas fezes foi realizada por meio da técnica de sequenciamento de *amplicon* do gene 16S rRNA, a qual envolve as etapas descritas a seguir.

4.12.1. Amostragem de fluido ruminal e fezes

Amostras de fluido ruminal e fezes foram obtidas no último dia de amostragens (D+30). Com os animais contidos em tronco, aproximadamente 50g de fezes foram coletados diretamente na ampola retal, com uso de luvas plásticas descartáveis para palpação veterinária (Polysem™), e aproximadamente 160mL de fluido ruminal foram colhidos por meio de sonda esofágica flexível transparente de uso único, fabricada com policloreto de vinila (PVC) com reforço de camada de fios de poliéster (Himaflex®). Um tubo de PVC rígido foi introduzido na cavidade oral dos animais e serviu de guia para a introdução da referida sonda. Os materiais colhidos foram armazenados em coletores estéreis universais para amostras biológicas com capacidade para 80 mL (Firstlab®). No caso do fluido ruminal, foram desconsiderados os primeiros 200ml e aproveitados os volumes subsequentes. As coletas foram realizadas pela manhã, cerca de 2 horas após oferecida a alimentação aos animais (Figura 11).

Figura 11 – Coleta e acondicionamento de amostras de líquido ruminal e fezes



Fonte: arquivo do autor.

Amostras de fluido ruminal e fezes foram imediatamente congeladas em freezer à -20°C e então transportadas em caixas de poliestireno com gelo reciclável até o Laboratório de Genética Celular e Molecular no ICB-UFMG, onde permaneceram em ultra freezer, a -80°C, até a etapa de extração de DNA.

4.12.2. Extração e purificação do DNA das amostras de fluido ruminal e fezes

Para a lise celular, uma alíquota de 250mg de amostra foi transferida para um microtubo estéril livre de DNase e RNase, com saia, tampa de 6 mm e capacidade para 2mL (Loccus®), o qual continha duas *beads* em aço de 2,8 mm (Loccus®). Um volume de 1mL de tampão de lise também foi adicionado ao tubo. Tal solução foi preparada pela mistura dos seguintes componentes na proporção de 1:1:1:2:5, respectivamente: NaCl (Synth®, Brasil) a 500mM; Tris-HCl (Sigma-Aldrich™, Estados Unidos) a 50mM; EDTA (Sigma-Aldrich™, Estados Unidos) a 50mM; SDS (Invitrogen™, Estados Unidos) a 4%; água destilada.

Em seguida, os tubos foram levados à homogeneização em aparelho Precellys 24 Tissue Homogenizer™ (Bertin Instruments™, França), por 60 segundos a 6.500 RPM. Na sequência os tubos foram incubados a 70°C em banho-maria por 15 min, com agitação manual a cada 5 min. Os tubos foram então centrifugados por 5 min a 16.000 x g em centrífuga refrigerada a 4°C (5804 R, Eppendorf™, Alemanha). O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo estéril, livre de DNase e RNase, com capacidade para 2mL.

Finalizadas as etapas de lise celular, deu-se início às etapas para precipitação dos ácidos nucléicos. Foram adicionados aos tubos 2μL de RNase (Sinapse Biotecnologia®, Brasil), na concentração de 10mg/mL, e se deu a incubação em estufa a 37°C por 1 h. Ao término desse período, os tubos foram deixados para resfriarem em temperatura ambiente. Em seguida, 260μL de acetato de amônio (Neon®, Brasil), a 10M, foram adicionados e, após agitação vigorosa por inversão manual, foi feita incubação em gelo por 5 min. Os tubos foram então centrifugados por 10 min a 16.000 x g em centrífuga refrigerada a 4°C (5804 R, Eppendorf™, Alemanha).

Um volume de 1mL de sobrenadante foi transferido para um novo microtubo estéril livre de DNase e RNase com capacidade para 2mL e a ele foi adicionado 1mL de isopropanol gelado (Dinâmica®, Brasil). Após homogeneização por inversão, os tubos foram incubados em

gelo por 30 min. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 15 min a 16.000 x g a 4°C. O *pellet* obtido foi lavado com etanol (Dinâmica®, Brasil) a 70% e centrifugado a 4°C por 5 minutos a 16.000 x g. O etanol foi então removido por aspiração e o *pellet* deixado para secar em estufa a 37°C por 5 a 10 min. Finalmente, o *pellet* foi ressuscitado em água estéril *overnight* a 4°C.

A concentração do DNA foi aferida em espectrômetro NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific™, Estados Unidos) e a qualidade da extração do ácido nucléico foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1% (Sigma-Aldrich™, Estados Unidos).

4.12.3. Sequenciamento de *amplicon* (16S rRNA)

Para determinar os microbiomas fecal e ruminal foi utilizado o sequenciamento de *amplicon* da região 16S rRNA. Para a amplificação da referida região, utilizou-se primers universais específicos que cobrem as regiões V3-V4 (oligonucleotídeos 341F e 806R). A preparação das bibliotecas de sequenciamento foi realizada com o TruSeq Library Prep Kit (Illumina™, Estados Unidos) para sequenciamento dos *amplicons* microbianos. Para o sequenciamento utilizou-se o sistema MiSeq (Illumina™, Estados Unidos). Foram realizados ciclos de 500 leituras (*paired-end runs*) com o kit de sequenciamento V3 × 600 pb (Illumina™, Estados Unidos), com cobertura de 100.000 leituras por amostra.

4.12.4. Processamento e análise bioinformática

Os dados de sequenciamento foram analisados para a caracterização detalhada das comunidades microbianas presentes nas amostras fecais e ruminais, bem como para a comparação entre os diferentes grupos experimentais.

As sequências obtidas foram submetidas a um processo de controle de qualidade, que incluiu a remoção de sequências de baixa qualidade (pontuação Phred < 20), remoção de primers e truncamento de leituras de acordo com os padrões de qualidade. As leituras pareadas

foram mescladas em *contigs* e as sequências foram submetidas a desreplicação, ordenação por abundância, remoção de *singletons* e filtragem de quimeras.

As sequências pré-processadas foram então agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs) por meio de algoritmos de *clustering* baseados em similaridade de sequência (97% de similaridade) e atribuídas taxonomicamente.

A diversidade das comunidades microbianas do rúmen e das fezes foi estimada por meio do índice de Shannon (H'), uma medida de heterogeneidade que considera tanto a riqueza quanto a uniformidade das OTUs. A modelagem estatística por trás do índice de Shannon oferece uma forma de quantificar a diversidade de comunidades biológicas (Jost, 2006).

Todas as etapas anteriores foram realizadas no software QIIME2 (Bolyen *et al.*, 2019), versão 2024.10, com um limiar de similaridade de sequência de 97% contra o banco de dados SILVA.

5. Resultados

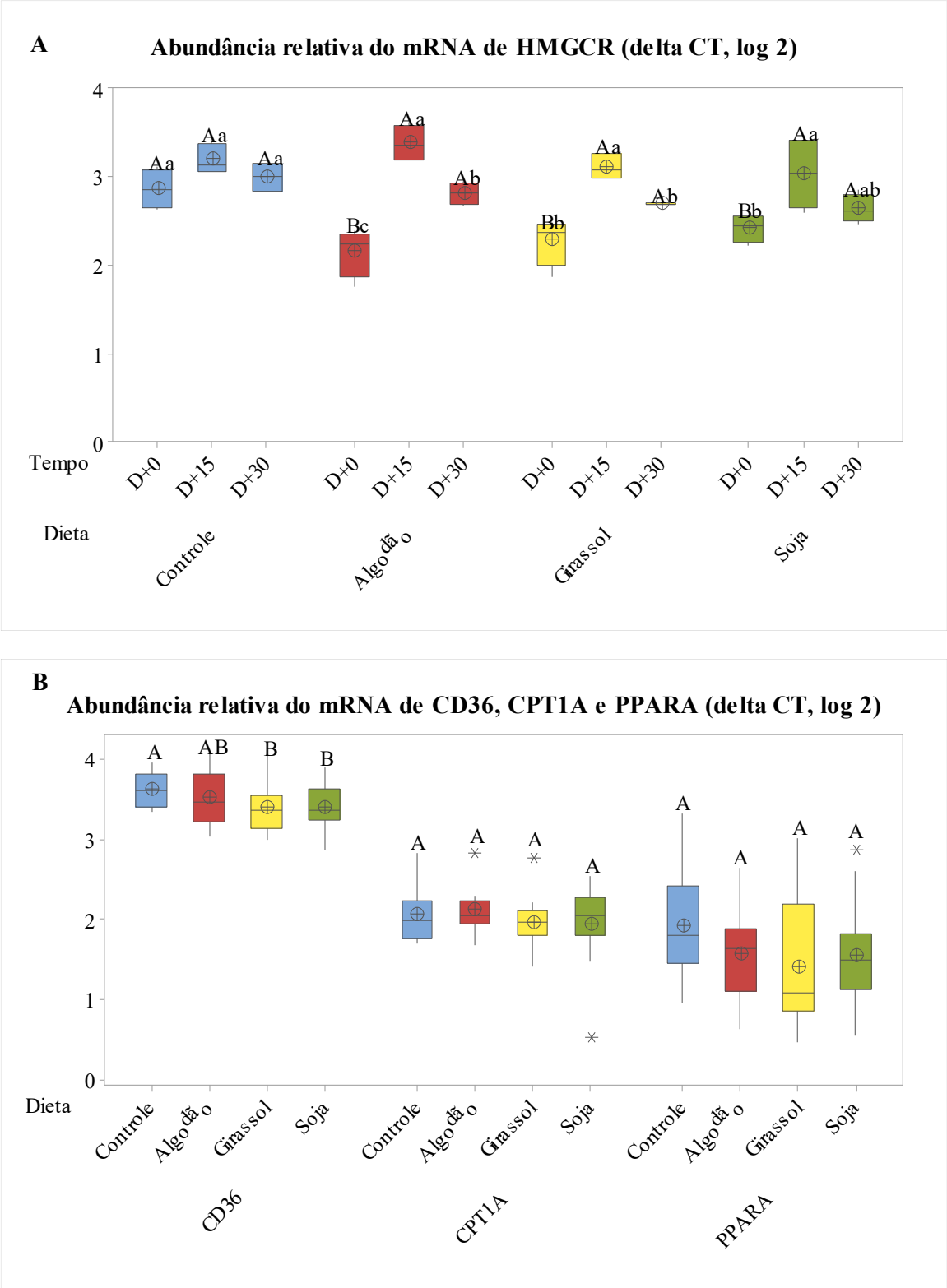
O objetivo principal do presente trabalho foi investigar o efeito da suplementação dietética com fontes vegetais de ácidos graxos sobre a expressão de genes associados ao metabolismo lipídico hepático em bovinos, pela eventual ativação do receptor nuclear PPAR- α . O racional por trás deste objetivo foi caracterizar molecularmente e *in vivo* uma estratégia capaz de aumentar a oxidação hepática de ácidos graxos em vacas leiteiras e assim, potencialmente, reduzir os efeitos deletérios do BEN, especialmente no período de transição, visto que esse tema é de extrema relevância para a pecuária leiteira de alto rendimento.

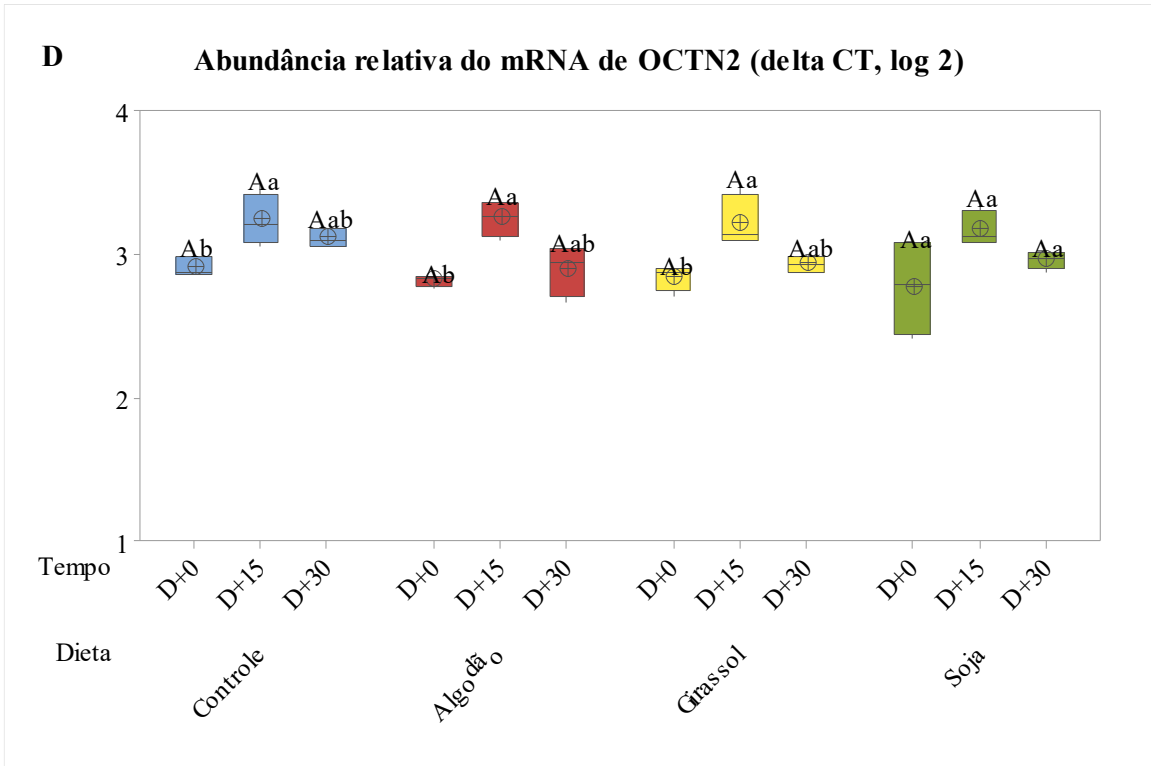
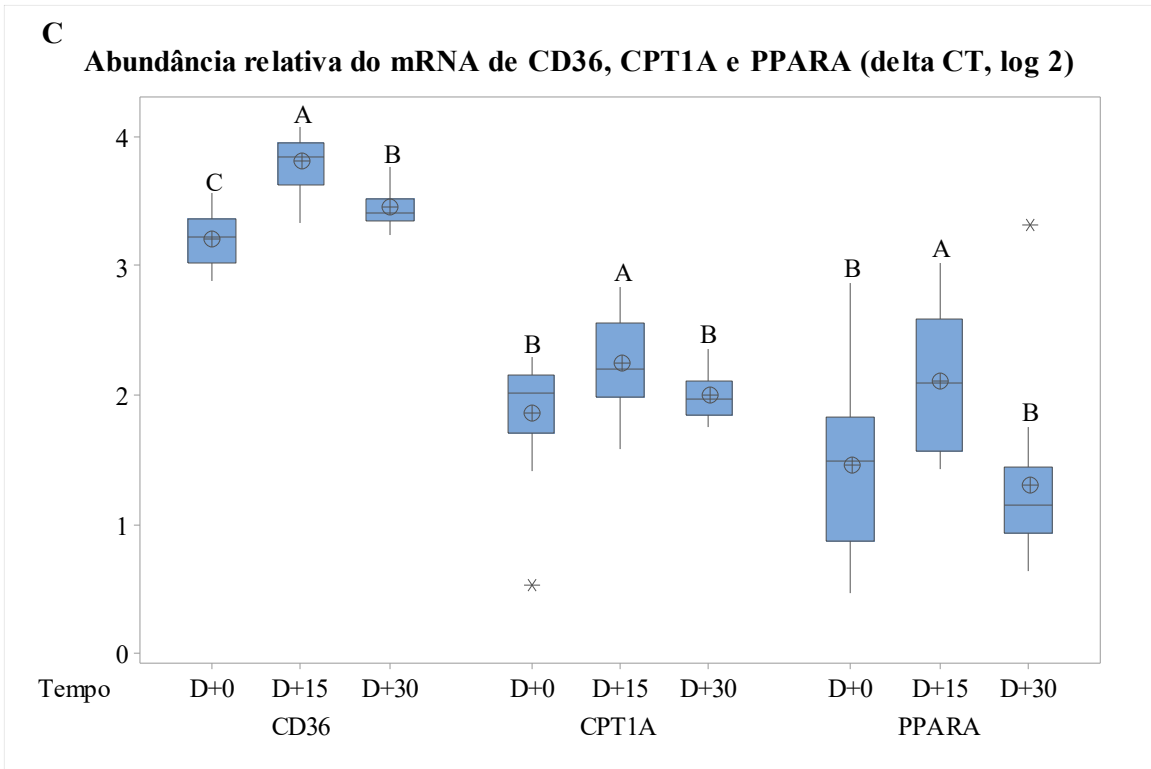
Para alcançar esse objetivo, foi avaliada a expressão diferencial de seis genes candidatos, descritos na literatura como susceptíveis à regulação pelo receptor PPAR- α em bovinos, em quatro grupos de novilhas: um alimentado com dieta basal e três alimentados com altos níveis de inclusão de diferentes óleos vegetais. Níveis próximos de 6% de lipídeos na matéria seca da dieta, como os utilizados neste trabalho, são considerados limites máximos para bovinos leiteiros (NRC, 2001).

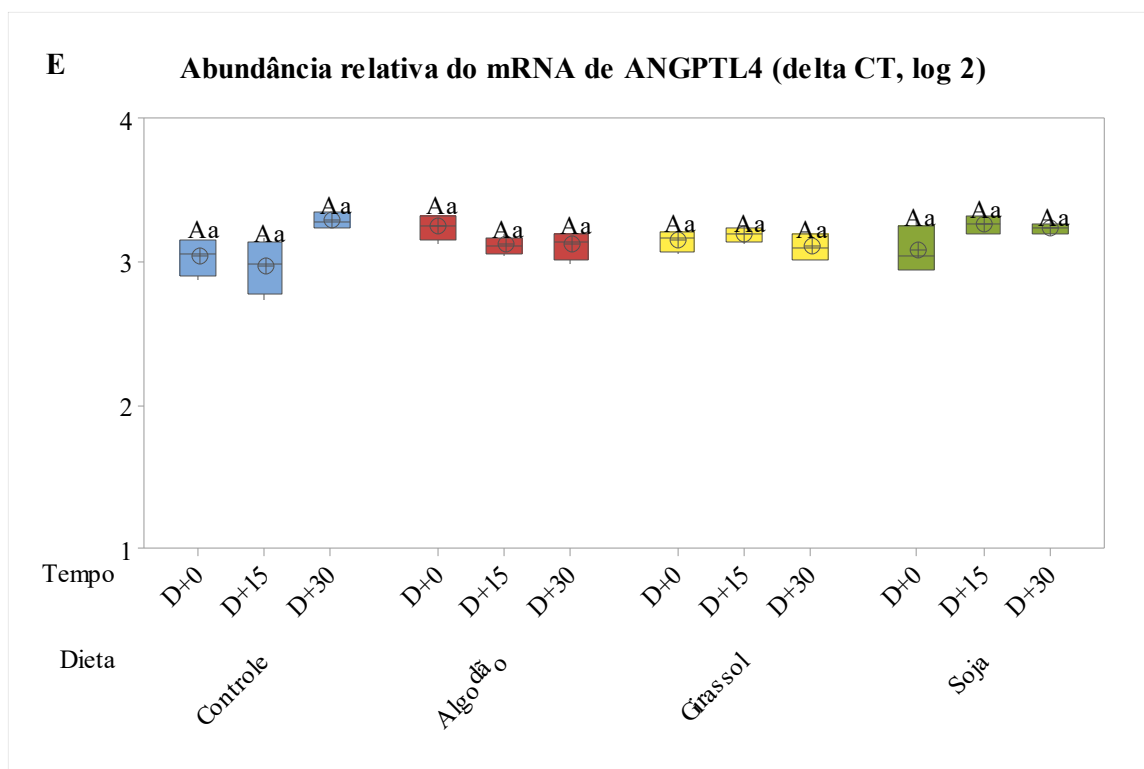
5.1. Expressão gênica hepática

Por meio da técnica de RT-qPCR, descrita anteriormente, foram obtidos, em duplicata, os valores de *cycle threshold* para os três genes de referência (ACTB, GAPDH e RPS9), e para os seis genes em estudo, nos quatro tratamentos e nos três tempos de coleta. Valores de ΔCT foram obtidos pela diferença entre a média dos valores de *cycle threshold* das duplicatas dos três genes de referência e a média da duplicata dos seis genes em estudo, obtidos nos tratamentos. Os resultados da análise estatística estão expressos na Figura 12.

Figura 12 – Abundância relativa de mRNA (Δ CT, log2) de genes associados ao metabolismo de lipídios em fígado de novilhas leiteiras suplementadas com óleos vegetais em comparação à dieta controle, em diferentes tempos de amostragem







Painel A: HMGCR (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase); interação dieta x tempo significativa ($P < 0,05$) determinada pelo teste F de Fisher; letras maiúsculas distintas acima das caixas indicam diferenças significativas entre as dietas em cada tempo de amostragem, e letras minúsculas distintas acima das caixas indicam diferenças significativas entre os tempos de amostragem dentro de cada dieta, determinadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). **Painel B:** CD36 (ácido graxo translocase); CPT1A (carnitina palmitoil transferase 1A); PPARA (receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa); interação dieta x tempo não significativa ($P > 0,05$) pelo teste F de Fisher; letras maiúsculas distintas acima das caixas, para comparações entre dietas, indicam diferenças pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). **Painel C:** Interação dieta x tempo não significativa ($P > 0,05$) pelo teste F de Fisher; letras maiúsculas distintas acima das caixas, para comparações entre tempos de amostragem, indicam diferenças pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). **Painel D:** OCTN2 (transportador de cátions orgânicos 2); interação dieta x tempo significativa pelo teste F de Fisher ($P < 0,05$); letras maiúsculas distintas acima das caixas indicam diferenças significativas entre as dietas em cada tempo de amostragem, determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$), com pós-teste de Dunn ($P < 0,05$); letras minúsculas distintas acima das caixas indicam diferenças significativas entre os tempos de amostragem dentro de cada dieta, determinadas pelo teste de Friedman ($P < 0,05$), com pós-teste de Dunn ($P < 0,05$). **Painel E:** ANGPTL4 (proteína 4 semelhante à angiopoietina); interação dieta x tempo significativa pelo teste F de Fisher ($P < 0,05$); medianas iguais entre as dietas em cada tempo de amostragem, determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis ($P > 0,05$), são representadas com letras maiúsculas iguais acima das caixas; medianas iguais entre os tempos de amostragem dentro de cada dieta, determinadas pelo teste de Friedman ($P > 0,05$), são representadas por letras minúsculas iguais acima das caixas. Para todos os painéis, *outliers* são representados como asteriscos e a média é representada como uma cruz dentro de um círculo.

Para animais suplementados com óleos de algodão, girassol e soja, foram observadas alterações de 1,56, 1,36 e 1,27-*fold-change* em log2, respectivamente, na expressão gênica de HMGCR, especialmente em D+15. Já em D+30, a expressão gênica do HMGCR permaneceu aumentada em 1,30 e 1,17-*fold-change* em log2 nos tratamentos com óleo de algodão e óleo de girassol, respectivamente, em comparação com D+0. Em relação ao grupo controle, não foi observada alteração na expressão do gene HMGCR no fígado ao longo do experimento (Figura 12A).

Em contraste com o gene HMGCR, não foi encontrada interação significativa entre dieta e tempo de amostragem para os níveis de expressão dos genes CD36, CPT1A e PPARA. Consequentemente, foram analisados os efeitos isolados da dieta (Figura 12B) e do tempo (Figura 12C) para esses genes. Entre eles, foi observado discreto efeito da dieta apenas para a expressão do gene CD36. A expressão desse gene nos grupos suplementados com óleos de girassol e soja diminuiu 1,06 vezes em log2, ou seja, 0,94-*fold-change* em log 2 (Figura 12B).

Ao comparar o efeito isolado do tempo sobre a expressão de CD36, CPT1A e PPARA, (Figura 12C), houve aumento na expressão gênica em D+15. No entanto, esta elevação não foi sustentada e os níveis de expressão em D+30 retornaram aos observados no início do experimento.

A Figura 12D apresenta os resultados referentes à expressão do gene OCTN2. Embora tenham sido observadas pequenas variações na expressão deste gene em diferentes tempos de amostragem na maioria dos grupos de animais, não observamos qualquer efeito da suplementação de óleo em comparação com o grupo controle.

Finalmente, o nível de expressão do gene ANGPTL4 permaneceu constante ao longo de todas as condições experimentais (Figura 12E).

5.2. Ganho de peso e consumo alimentar

Em relação ao GP das novilhas entre os dias D+0 e D+30, não foi encontrada diferença estatística entre as quatro dietas (Tabela 12).

Tabela 12 - Ganho de peso (GP) de novilhas alimentadas com diferentes dietas¹

Controle	Óleo de algodão	Óleo de girassol	Óleo de soja	<i>P</i> -valor
GP (kg)	GP (kg)	GP (kg)	GP (kg)	
26,75 (1,25) ^A	20,75 (4,27) ^A	26,25 (3,47) ^A	27,75 (2,10) ^A	0.390

¹GP em quilogramas (kg) de peso vivo (PV) aferido pela diferença entre os pesos obtidos em D+30 e D+0; médias seguidas por erros padrão; médias semelhantes seguidas de letras iguais pelo teste F de Fisher ($P > 0,05$).

Ao se considerar o CMS, observou-se um cenário diferente. Embora nenhuma diferença significativa tenha sido detectada na ingestão de alimentos para as dietas com óleo de girassol e de soja ao longo do tempo, foi observada uma diminuição notável de 14,5% no CMS para o tratamento com óleo de algodão (Tabela 13).

Tabela 13 – Consumo de Matéria Seca (CMS)¹ em novilhas suplementadas com óleos vegetais em comparação à dieta controle, em diferentes tempos de amostragem

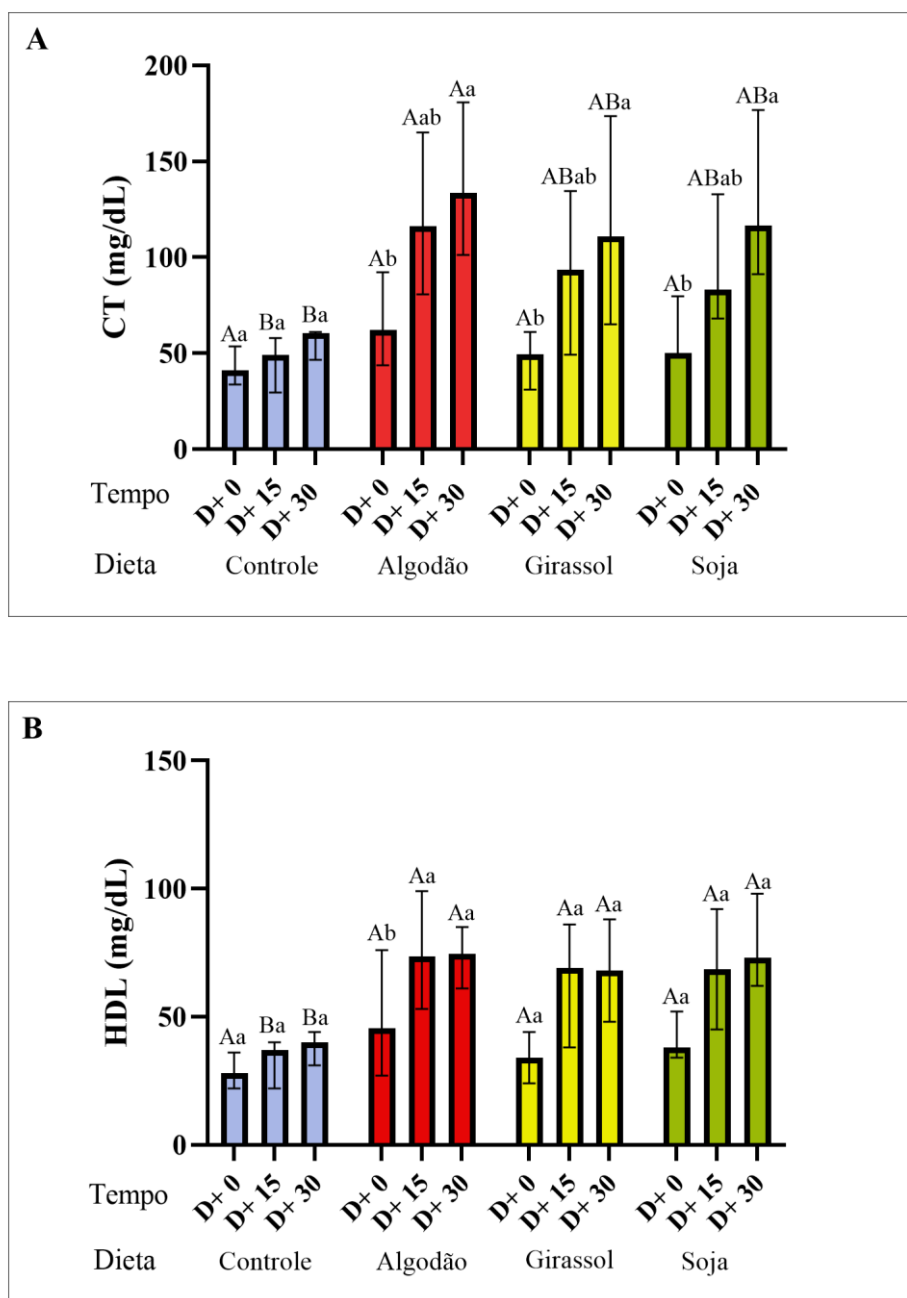
Tempo	Controle	Óleo de algodão	Óleo de girassol	Óleo de soja
	[% PV (EP)]	[% PV (EP)]	[% PV (EP)]	[% PV (EP)]
D+0	2,491 (0,208) ^{Ab}	2,581 (0,116) ^{Aa}	2,317 (0,243) ^{Aa}	2,601 (0,170) ^{Aa}
D+15	2,903 (0,114) ^{Aa}	2,244 (0,235) ^{Ab}	2,456 (0,108) ^{Aa}	2,399 (0,090) ^{Aa}
D+30	2,877 (0,141) ^{Aa}	2,207 (0,214) ^{Ab}	2,496 (0,087) ^{Aa}	2,374 (0,057) ^{Aa}

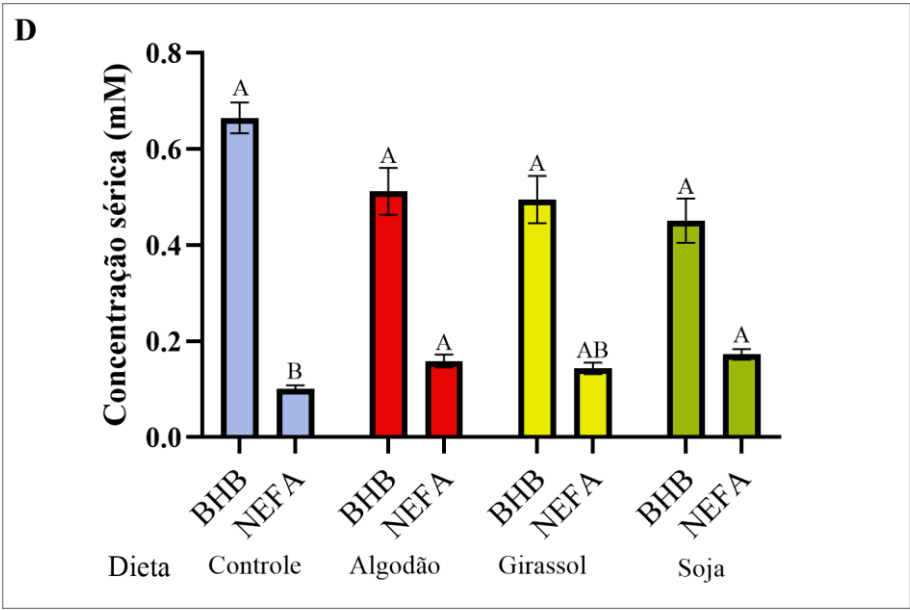
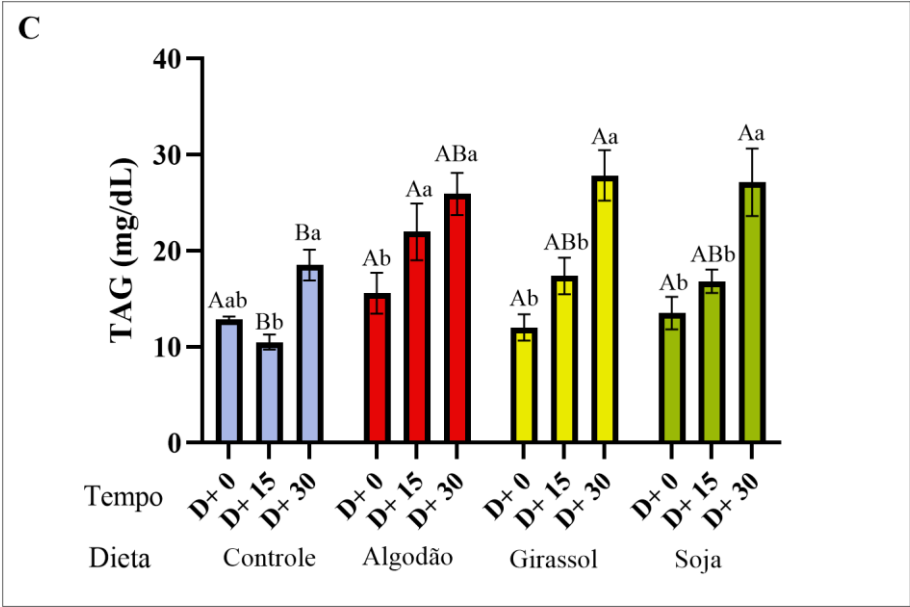
¹CMS como uma porcentagem do peso vivo (% PV) seguido de erro padrão (EP) foi calculado pela divisão do CMS da baia pelo PV combinado dos dois animais alojados nela. Médias seguidas de letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

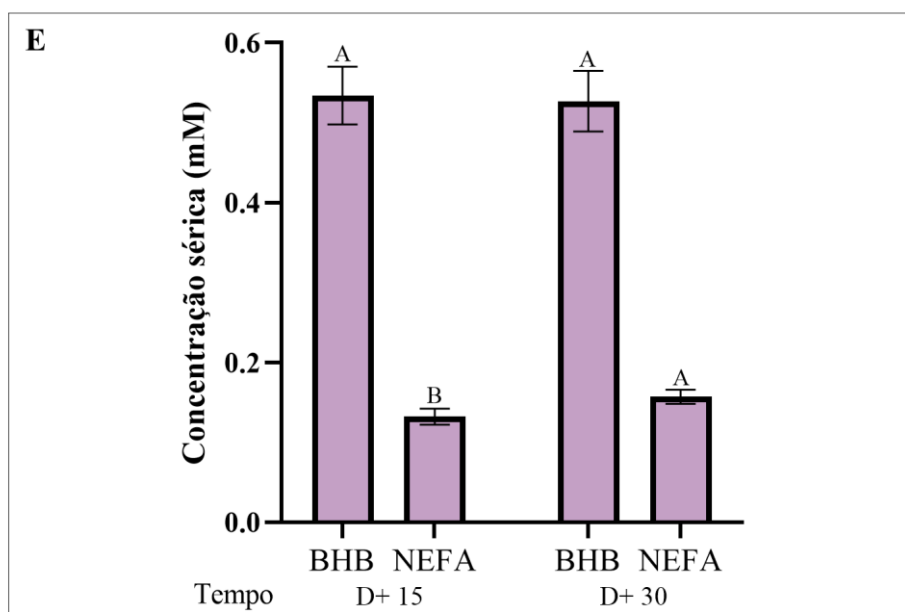
5.3. Lipídeos séricos e bioquímica clínica

A Figura 13, painéis A-E, expressa os resultados da quantificação e análise estatística dos lipídeos séricos: CT, HDL, TAG, BHB e NEFA.

Figura 13 - Níveis de lipídeos séricos em novilhas leiteiras suplementadas com óleos vegetais em comparação com a dieta controle, em diferentes tempos de amostragem







Painel A: medianas, valores mínimos e máximos para colesterol total (CT); interação dieta x tempo significativa ($P < 0,05$), determinada pelo teste F de Fisher; letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre as dietas em cada tempo de amostragem, determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$), com pós-teste de Dunn ($P < 0,05$); letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tempos de amostragem dentro de cada dieta, determinadas pelo teste de Friedman ($P < 0,05$), com pós-teste de Dunn ($P < 0,05$). **Painel B:** medianas, valores mínimos e máximos para lipoproteínas de alta densidade (HDL); interação dieta x tempo significativa ($P < 0,05$), determinada pelo teste F de Fisher; letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre as dietas em cada tempo de amostragem, determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$), com pós-teste de Dunn ($P < 0,05$); letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tempos de amostragem dentro de cada dieta, determinadas pelo teste de Friedman ($P < 0,05$), com pós-teste de Dunn ($P < 0,05$). **Painel C:** médias e erros-padrão para triacilgliceróis (TAG); interação dieta x tempo significativa ($P < 0,05$), determinada pelo teste F de Fisher; letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre as dietas em cada tempo de amostragem, e letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tempos de amostragem dentro de cada dieta, determinadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). **Painel D:** médias e erros padrão para β -hidroxibutirato (BHB) e ácidos graxos não esterificados (NEFA); interação dieta x tempo não significativa ($P > 0,05$), determinada pelo teste F de Fisher; letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre as dietas determinadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). **Painel E:** médias e erros padrão para BHB e NEFA; interação dieta x tempo não significativa ($P > 0,05$), determinada pelo teste F de Fisher; letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tempos de amostragem determinados pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Ao comparar os dados de CT (Figura 13A), fica evidente que em D+0, todas as dietas, inclusive a controle, promoveram níveis iguais de colesterol (medianas de CT variando de 41,2 a 62,6 mg/dL), e na dieta controle, os níveis de CT permaneceram estáveis ao longo do tempo. Nos grupos suplementados com óleo, contudo, foi notável que os níveis de CT aumentaram consistentemente durante os períodos experimentais. Os valores de CT foram muito maiores na dieta com óleo de algodão (116,3 mg/dL e 133,7 mg/dL), e intermediários nas dietas de girassol (93,6 mg/dL e 110,7 mg/dL) e soja (83,3 mg/dL e 116,4 mg/dL) em comparação com o controle (49,3 mg/dL e 60,35 mg/dL) em D+15 e D+30, respectivamente.

Resultados semelhantes foram observados para os níveis de HDL (Figura 13B). Nenhuma diferença foi observada entre os grupos de animais em D+0, enquanto em D+15 e D+30, os níveis de HDL foram maiores e estatisticamente equivalentes para todas as dietas que incluíam óleo em comparação ao grupo controle.

Ao comparar os níveis de TAG (Figura 13C), nenhuma diferença estatística foi encontrada entre todos os grupos em D+0. No entanto, os níveis de TAG aumentaram ao longo do período experimental para todos os grupos, particularmente para as dietas suplementadas com óleo. Esses níveis mais elevados de TAGs observados no soro dos animais suplementados com óleos, em comparação ao grupo controle, podem indicar absorção adequada pelo trato digestivo dos ácidos graxos contidos nos óleos utilizados nas dietas.

Além de CT, HDL e TAG, os níveis de BHB e NEFA também foram avaliados, mas apenas em D+15 e D+30 devido a restrições relacionadas ao volume de amostras de sangue coletadas durante os experimentos. Como nenhuma interação significativa foi encontrada entre a dieta e o tempo de amostragem para esses analitos, os efeitos da dieta (Figura 13D) e do tempo (Figura 13E) foram analisados separadamente.

Não foram observadas diferenças nos níveis de BHB ao longo do tempo ou entre diferentes dietas, indicando nenhum efeito cetogênico dos tratamentos. Em contraste, os níveis de NEFA foram influenciados positivamente tanto pela suplementação de óleo quanto pelo tempo de amostragem, reflexo do aumento dos lipídios circulantes nesses animais.

O impacto da inclusão dos óleos vegetais sobre o estado de saúde dos animais também foi investigado pela análise das concentrações séricas de AST, GGT, LDH, creatinina, glicose, lactato, PT e ureia (Tabela 14). Para efeito de comparação essas análises foram realizadas usando como valores de referência para bovinos aqueles determinados por Thrall et al. (2012).

Tabela 14 – Concentração sérica de analitos referentes à bioquímica clínica em novilhas leiteiras suplementadas com óleos vegetais em comparação à dieta controle em diferentes tempos de amostragem

Analitos	Tempo	Dietas			
		Controle	Óleo de algodão	Óleo de girassol	Óleo de soja
AST	D+0	59,2 (49,1-68,4) ^{Aa}	74,7 (64,7-222,2) ^{Aa}	62,6 (58,6-67,2) ^{Aa}	66,2(57,5-74,3) ^{Aa}
VR: 40 – 130	D+15	71,5 (54,4-97,0) ^{Aa}	77,3 (65,3-78,8) ^{Aa}	87,4 (49,6-104,6) ^{Aa}	53,6(48,5-124,7) ^{Aa}
U/L	D+30	74,5 (66,7-133,9) ^{Aa}	68,2 (54,9-78,1) ^{Aa}	68,6 (54,4-104,8) ^{Aa}	58,7(56,3-83,1) ^{Aa}
Creatinina	D+0	1,16 (1,02-1,21) ^{Aa}	1,47 (1,28-1,62) ^{Aa}	1,35 (1,21-1,41) ^{Aa}	1,37 (1,18-1,67) ^{Aa}
VR: 1,0 – 1,8	D+15	1,07 (0,94-1,19) ^{Aab}	1,42 (1,18-1,52) ^{Aab}	1,28 (1,24-1,29) ^{Aab}	1,06 (0,81-1,47) ^{Aa}
mg/dL	D+30	0,92 (0,81-1,13) ^{Ab}	1,10 (0,94-1,24) ^{Ab}	0,93 (0,81-0,95) ^{Ab}	0,95 (0,88-1,18) ^{Aa}
Glicose	D+0	94,9 (92,1-102,6) ^{Aa}	95,5 (93,6-98,4) ^{Aa}	96,1 (92,3-103,1) ^{Aa}	109,4 (100,0-114,4) ^{Aa}
VR: 55 – 95	D+15	167,8 (86,8-193,9) ^{Aa}	99,9 (92,9-116,0) ^{Aa}	92,2 (86,2-94,3) ^{Aab}	88,5 (072,5-104,0) ^{Aa}
mg/dL	D+30	89,4 (81,5-104,3) ^{Aa}	81,8 (73,7-087,5) ^{Aa}	85,1 (80,7-85,8) ^{Ab}	80,6 (077,4-087,2) ^{Aa}
GGT	D+0	22,0 (17,1-25,0) ^{Aa}	21,3 (19,1-40,7) ^{Aa}	19,0 (16,5-26,1) ^{Aa}	20,0 (17,3-25,2) ^{Aa}
VR: 10 – 26	D+15	21,2 (19,7-23,1) ^{Aa}	22,5 (18,7-34,1) ^{Aa}	19,1 (16,3-29,4) ^{Aa}	18,3 (14,7-30,0) ^{Aa}
U/L	D+30	16,8 (14,0-19,5) ^{Aa}	18,5 (13,7-19,2) ^{Aa}	18,3 (13,7-38,8) ^{Aa}	18,0 (16,1-29,6) ^{Aa}
Lactato	D+0	15,65 (2,03) ^{Aa}	16,68 (2,89) ^{Aa}	11,53 (1,99) ^{Aa}	22,25 (3,79) ^{Aa}
VR: 5 – 20	D+15	16,10 (5,77) ^{Aa}	26,20 (12,30) ^{Aa}	13,45 (2,51) ^{Aa}	11,88 (1,44) ^{Aa}
mg/dL	D+30	09,10 (0,65) ^{Aa}	19,35 (0,53) ^{Aa}	16,20 (3,69) ^{Aa}	13,48 (1,76) ^{Aa}
LDH	D+0	1.594,0 (122,0) ^{Aa}	2.062,0 (106,0) ^{Aa}	1.581,9 (68,0) ^{Aa}	1.630,4 (38,2) ^{Aa}
VR: 692 – 1445	D+15	1.653,7 (67,5) ^{Aa}	1.868,8 (30,2) ^{Aa}	1.927,0 (188,0) ^{Aa}	1.625,0 (106,0) ^{Aa}
U/L	D+30	1.727,0 (113,0) ^{Aa}	1.718,1 (26,0) ^{Aa}	1.532,0 (122,0) ^{Aa}	1.631,0 (138,0) ^{Aa}
PT	D+0	7,69 (0,24) ^{Aa}	7,92 (0,18) ^{Aa}	8,26 (0,24) ^{Aa}	7,36 (0,23) ^{Aa}
VR: 6,3 – 7,6	D+15	7,69 (0,21) ^{Aa}	8,10 (0,33) ^{Aa}	7,62 (0,33) ^{Aa}	6,32 (0,30) ^{Bb}
g/dL	D+30	6,19 (0,08) ^{Ab}	6,17 (0,19) ^{Ab}	6,24 (0,82) ^{Ab}	5,90 (0,27) ^{Ab}
Ureia	D+0	25,85 (2,92) ^{Ab}	32,39 (5,29) ^{Ab}	28,84(3,58) ^{Ab}	24,64 (3,24) ^{Ab}
VR: 23 – 58	D+15	27,15 (1,28) ^{Ab}	34,45 (3,45) ^{Ab}	30,91(4,17) ^{Ab}	31,73 (4,18) ^{Ab}
mg/dL	D+30	32,74 (0,94) ^{Aa}	47,46 (2,25) ^{Aa}	38,11(2,76) ^{Aa}	38,05 (3,66) ^{Aa}

Nota: para as concentrações de aspartato aminotransferase (AST), creatinina, glicose e γ -glutamilttransferase (GGT), medianas seguidas de valores mínimo e máximo; medianas iguais pelo teste de Kruskal-Wallis ($P > 0,05$) seguidas por letras minúsculas nas colunas, e medianas seguidas por letras maiúsculas distintas, nas linhas, diferem pelo teste de Friedman ($P < 0,05$), com pós-teste de Dunn ($P < 0,05$). Para as concentrações de lactato, lactato desidrogenase (LDH), proteína total (TP) e ureia, médias seguidas pelo erro padrão; letras maiúsculas distintas nas colunas e letras minúsculas distintas nas linhas diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). VR: valores de referência para bovinos segundo Thrall et al. (2012).

Para as enzimas AST, GGT e LDH, bem como para as concentrações séricas de lactato, não foram observados efeitos isolados ou combinados das dietas e do tempo de amostragem. São dignos de nota, no entanto, os valores obtidos para LDH, em média 18% acima do limite máximo da faixa de referência para todas as dietas e em todos os tempos de amostragem.

Foi observada uma ligeira diminuição dos níveis de creatinina ao longo do tempo para todas as dietas, exceto para aquela com adição de óleo de soja. Porém, em todos os casos, os níveis permaneceram dentro da faixa de referência para a espécie bovina.

Em relação à glicemia, observou-se valores um pouco acima do limite máximo da faixa de referência, em média 20% acima, independentemente da dieta, nos dois primeiros tempos de amostragem (D+0 e D+15). Observa-se, no entanto, uma tendência de queda para níveis dentro dos valores de referência em D+30 para todas as dietas, com efeito estatisticamente significativo para a dieta com adição de óleo de girassol.

Os valores de PT estiveram em média 3,7% acima do limite máximo da faixa de referência em D+0 e D+15 para todas as dietas. Em D+30, contrariamente, se observou queda nos níveis de PT, os quais ficaram, em média, 5,8% abaixo do limite mínimo dos valores de referência. Entretanto, esse comportamento não pode ser atribuído à inclusão de óleos, visto ter ocorrido em todas as dietas, incluindo na dieta controle.

Comportamento inverso ao dos níveis de PT pôde ser observado para os níveis séricos de ureia, ou seja, houve aumento em D+30 para todas as dietas, sem, no entanto, extrapolar a faixa de referência em nenhum dos casos. A análise de correlação de Pearson confirmou a correlação negativa entre uremia e PT ($P = 0,007$).

5.4. PFA

Outro aspecto importante, porém, usualmente pouco avaliado em ruminantes, é o estado inflamatório dos animais, determinado por meio da quantificação das PFAs. Para além de se caracterizar como mais um controle para a avaliação do estado geral de saúde, a avaliação das PFAs no presente trabalho objetivou verificar se o maior aporte de ácidos graxos, via dieta, altera o estado inflamatório, por uma possível interferência na formação de mediadores da inflamação, como por exemplo os eicosanoides.

A comparação estatística das médias obtidas para os níveis séricos de nove entre dez PFAs (albumina, transferrina, glicoproteína ácida, apolipoproteína A4, apolipoproteína A1, α -2-macroglobulina, IgG de cadeia leve, IgG de cadeia pesada e haptoglobina), dosadas no soro das novilhas leiteiras, nas quatro dietas experimentais e nos três tempos de amostragem, está expressa na Tabela 15.

Para todas as PFAs citadas a interação dieta x tempo não foi significativa pelo teste F de Fisher ($P > 0,05$). Exceção ocorreu para a PFA ceruloplasmina, cujos resultados estão expostos na Tabela 16. Para todas as PFAs, exceto ceruloplasmina, não houve interação dieta tempo ($P > 0,05$), logo os efeitos isolados das dietas e dos tempos foram analisados separadamente.

Em relação ao efeito isolado das dietas, nos tratamentos com os três óleos vegetais houve aumento de 27% a 34% nas concentrações de apolipoproteína A4 em comparação com a dieta controle. Todavia, nenhum efeito isolado das dietas foi observado para as demais PFAs (Tabela 15).

Em relação ao efeito isolado do tempo, observou-se uma diminuição nos níveis de albumina (3,3%), α -1-glicoproteína ácida (30,0%), haptoglobina (56,4 e 47,8%), IgG de cadeia leve (26,4%) e transferrina (47,8 e 56,4%), e um aumento nos níveis de apolipoproteína A1 (32%), a depender da data de amostragem (D+15 e/ou D+30) (Tabela 15).

Conforme mencionado anteriormente, apenas para a ceruloplasmina a interação dieta x tempo foi significativa (Tabela 16). Para essa proteína, nas dietas com inclusão dos óleos de girassol e soja, observou-se, respectivamente, um aumento na sua concentração em D+15 (68 e 16%) e redução em D+30 (78 e 80%) em relação a D+0.

Tabela 15 – Concentração sérica de proteínas de fase aguda (PFA) em novilhas leiteiras suplementadas com óleos vegetais em comparação à dieta controle em diferentes tempos de amostragem

	Dieta								Tempo						<i>P</i> -valor		
	Controle (mg/dL)		Algodão (mg/dL)		Girassol (mg/dL)		Soja (mg/dL)		D+0 (mg/dL)		D+15 (mg/dL)		D+30 (mg/dL)				
PFA	$\bar{x}$	EP	$\bar{x}$	EP	$\bar{x}$	EP	$\bar{x}$	EP	$\bar{x}$	EP	$\bar{x}$	EP	$\bar{x}$	EP	Dieta	Tempo	Interação
ALB	3.326,8 ^A	28,2	3.463,5 ^A	48,3	3.338,5 ^A	62,2	3.474,1 ^A	69,5	3.471,5 ^A	56,5	3.374,3 ^{AB}	56,9	3.356,3 ^B	39,9	P=0,5344	P=0,0147	P=0,075
A2M	212,83 ^A	16,7	215,23 ^A	8,4	192,12 ^A	23,2	200,60 ^A	44,3	219,98 ^A	16,3	217,11 ^A	7,0	178,50 ^A	29,0	P=0,8573	P=0,1061	P=0,0540
AA1	775,44 ^A	96,8	868,32 ^A	123,7	788,84 ^A	85,2	847,17 ^A	35,3	730,20 ^B	26,9	760,54 ^{AB}	54,6	969,08 ^A	55,8	P=0,6917	P=0,0203	P=0,6351
AA4	172,52 ^B	1,4	219,88 ^{AB}	10,0	232,55 ^A	3,8	228,55 ^A	24,6	223,45 ^A	17,5	213,00 ^A	17,7	203,69 ^A	15,9	P=0,0173	P=0,7350	P=0,8235
GAC	237,65 ^A	51,9	237,64 ^A	19,5	276,57 ^A	2,8	269,86 ^A	47,3	304,62 ^A	26,1	213,49 ^B	26,9	248,18 ^{AB}	12,8	P=0,4163	P=0,0357	P=0,3737
HAP	161,78 ^A	54,0	162,70 ^A	58,0	151,91 ^A	43,9	172,19 ^A	21,8	248,5 ^A	13,4	108,22 ^B	16,3	129,72 ^B	11,9	P=0,9523	P=0,0008	P=0,8362
IGL	1.656,8 ^A	189,9	1.758,8 ^A	177,0	1.910,5 ^A	243,0	1.410,5 ^A	123,0	1.991,0 ^A	157,3	1.464,6 ^B	32,7	1.596,8 ^{AB}	167,6	P=0,1779	P=0,0298	P=0,7533
IGP	1.276,8 ^A	45,9	1.225,3 ^A	64,5	1.356,7 ^A	97,1	1.200,2 ^A	143,3	1.393,5 ^A	62,3	1.259,5 ^A	51,5	1.141,2 ^A	67,04	P=0,7499	P=0,2252	P=0,8889
TRA	161,78 ^A	54,0	162,7 ^A	58,0	151,91 ^A	43,9	172,19 ^A	21,8	248,5 ^A	13,4	108,22 ^B	16,3	129,72 ^B	11,9	P=0,0329	P=0,0046	P=0,0612

Nota: Concentração média de PFA seguida do erro padrão (EP). Interação dieta x tempo não significativa pelo teste F de Fisher ($P > 0,05$). Médias seguidas de letras distintas, na linha, nas comparações entre dietas ou nas comparações entre tempos de coleta, diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$); ALB: albumina; A2M: alfa 2 macroglobulina; AA1: apolipoproteína A1; AA4: apolipoproteína A4; GAC: α -1-glicoproteína ácida; HAP: haptoglobina; IGL: IgG de cadeia leve; IGP: IgG de cadeia pesada; TRA: transferrina.

Tabela 16 - Concentração sérica de ceruloplasmina (CER) em novilhas leiteiras suplementadas com óleos em comparação à dieta controle em diferentes tempos de amostragem

PFA	Tempo	Dietas			
		Controle (mg/dL)	Óleo de algodão (mg/dL)	Óleo de girassol (mg/dL)	Óleo de soja (mg/dL)
CER	D+0	36,09 (10,20) ^{Aa}	54,80 (14,80) ^{Aa}	65,40 (23,90) ^{Aab}	89,20 (17,20) ^{Aa}
	D+15	72,00 (31,00) ^{Aa}	59,00 (15,90) ^{Aa}	109,6 (22,50) ^{Aa}	103,20 (22,80) ^{Aa}
	D+30	95,60 (21,60) ^{Aa}	41,34 (5,93) ^{ABa}	14,26 (2,64) ^{Bb}	17,56 (6,48) ^{Bb}

Nota: Concentração média de CER seguida por erro padrão (EP). Interação dieta x tempo significativa pelo teste F de Fisher ($P < 0,05$); CER: ceruloplasmina; médias seguidas de letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

5.5. Análise metagenômica

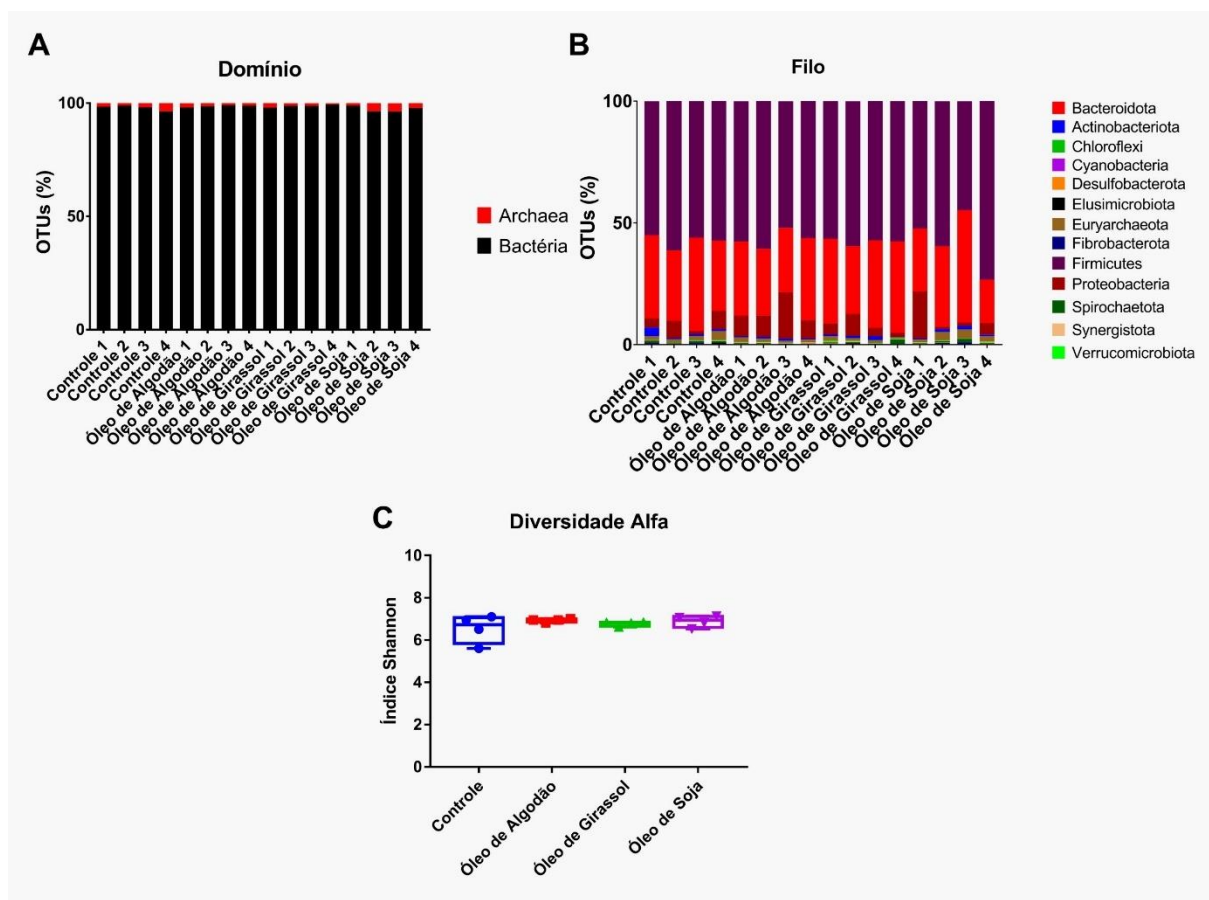
Com o intuito de se avaliar possíveis impactos da suplementação com lipídios sobre o perfil microbiano do trato gastrointestinal (TGI) das novilhas, realizou-se a análise metagenômica, pela técnica de sequenciamento de *amplicon* do gene 16S rRNA, em amostras de fluido ruminal e de fezes, colhidas no último dia de amostragens (D+30). Essa abordagem permitiu a obtenção de excelente resolução taxonômica até o nível de gênero e foi viabilizada por meio de cooperação com a Rede MIN.AS de Microbiomas.

5.5.1. Metagenômica ruminal

Os resultados das análises do fluido ruminal referentes ao perfil microbiano, obtidos para cada um dos 16 animais em D+30, foram divididos em dois segmentos: perfil microbiano no nível taxonômico de domínio (Figura 14A) e no nível taxonômico de filo (Figura 14B). O perfil no nível de domínio mostra uma prevalência de bactérias sobre arqueais em todas as amostras. Observou-se uma predominância dos filos Firmicutes (57% em média) e Bacteroidota (32% em média). Apesar disso, o filo Euryarchaeota, pertencente ao domínio Archaea, teve relativo destaque entre os demais filos (2% em média). A análise estatística dos dados de diversidade alfa (Figura 14C), definida pelo índice de Shannon, indicou não haver diferença significativa entre os grupos, ou seja, de forma geral, nenhum dos tratamentos alterou o microbioma ruminal a ponto de modificar a diversidade de OTUs ali presentes.

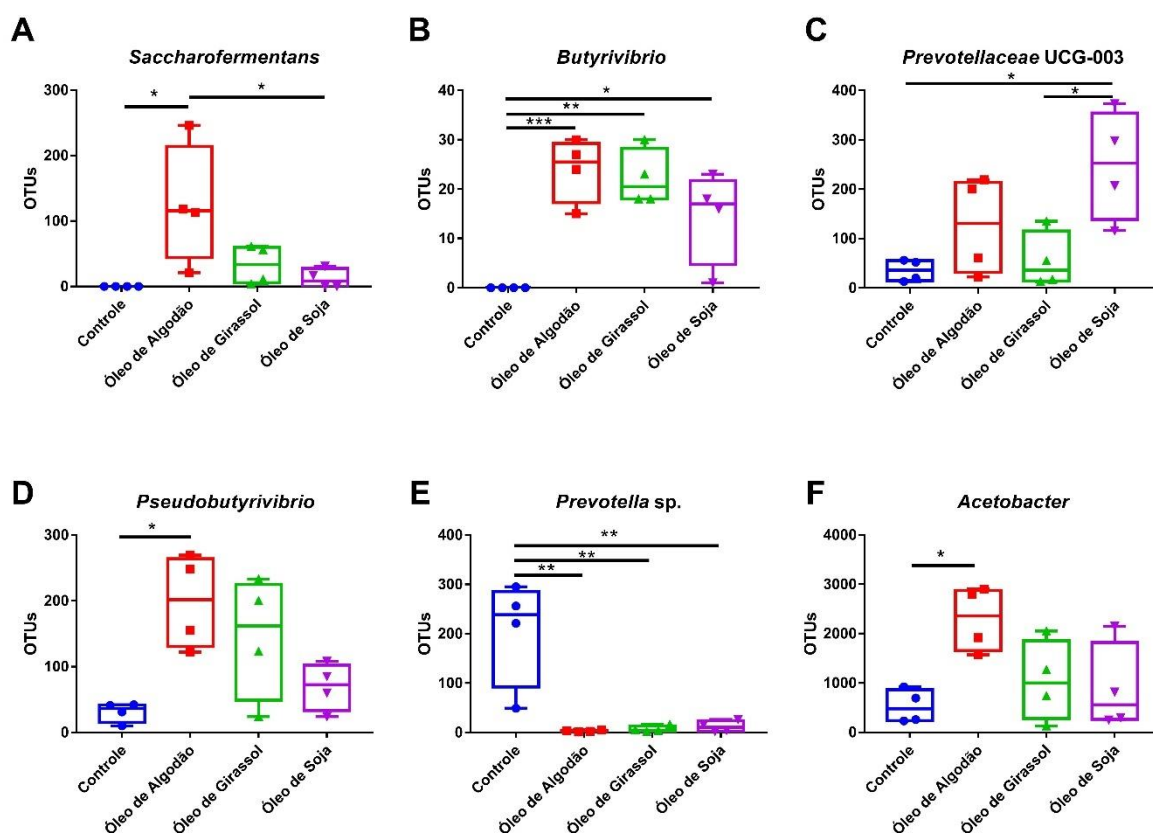
A ausência de diferença significativa em termos de diversidade alfa, no entanto, não significou ausências de variações pontuais na proporção de determinadas OTUs induzidas pelos tratamentos. Vale destacar a variação no número de OTUs devido à suplementação com óleos vegetais observada em seis gêneros microbianos (Figura 15). A administração de óleo de algodão, por exemplo, foi capaz de aumentar a presença de *Saccharofermentans* (Figura 15 A), *Pseudobutyrvibrio* (Figura 15 D) e *Acetobacter* (Figura 15 F), enquanto a administração do óleo de soja promoveu o aumento de *Prevotellaceae* UCG-003 (Figura 15 C). Dois gêneros foram modulados pela administração de todos os três óleos vegetais: houve modulação positiva para *Butyrvibrio* (Figura 15 B) e negativa para *Prevotella* (Figura 15 E).

Figura 14 - Perfil microbiano em diferentes níveis taxonômicos (domínio e filo) e diversidade alfa em amostras de fluido ruminal obtidas em D+30 em novilhas leiteiras suplementadas com óleos vegetais em comparação à dieta controle



Painel A – percentagem de OTUs em nível taxonômico de domínio; **Painel B** – percentagem de OTUs em nível taxonômico de filo; **Painel C** – diversidade alfa pelo índice de Shannon; médias iguais pelo teste F de Fisher ($p > 0,05$).

Figura 15 – Gêneros microbianos sensíveis à suplementação com óleos vegetais em amostras de fluido ruminal obtidas de novilhas leiteiras

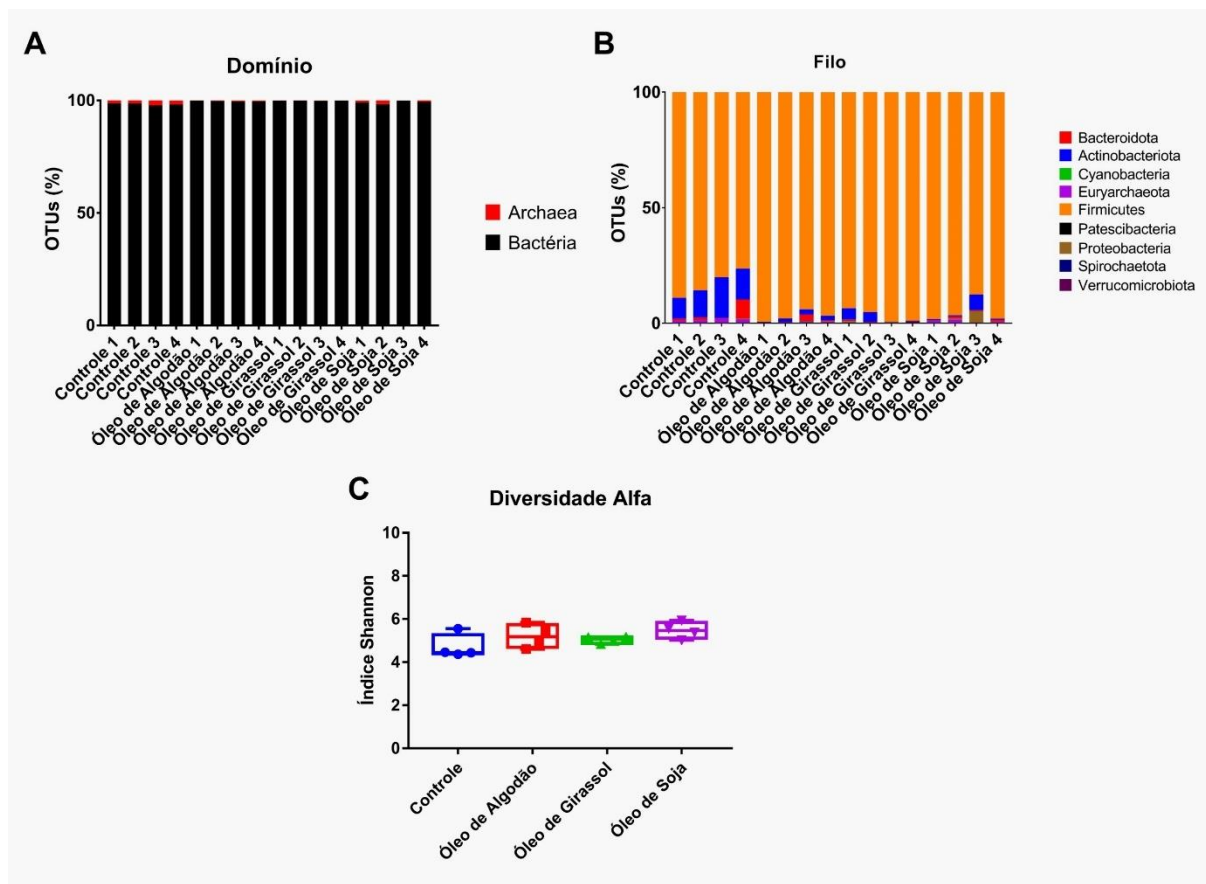


Painéis A-F: número de OTUs detectados para diferentes gêneros microbianos; asteriscos indicam diferença estatística pelo teste F de Fisher, com pós teste de Bonferroni: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$.

5.5.2. Metagenômica fecal

Os resultados da análise metagenômica do material fecal se assemelham, em parte, com aqueles apresentados para metagenômica ruminal. Ao se observar o perfil das amostras em nível de domínio foi possível verificar maior prevalência de bactérias sobre arqueais (Figura 16 A), com uma proporção desses últimos ainda menor que nas amostras ruminais. Em nível de filo (Figura 16 B), foi possível observar uma prevalência, quase que absoluta, de Firmicutes (93% em média). Ademais, assim como para as amostras de rúmen, não foi possível encontrar diferenças entre os grupos experimentais na diversidade alfa, aqui representada pelo índice de Shannon (Figura 16 C).

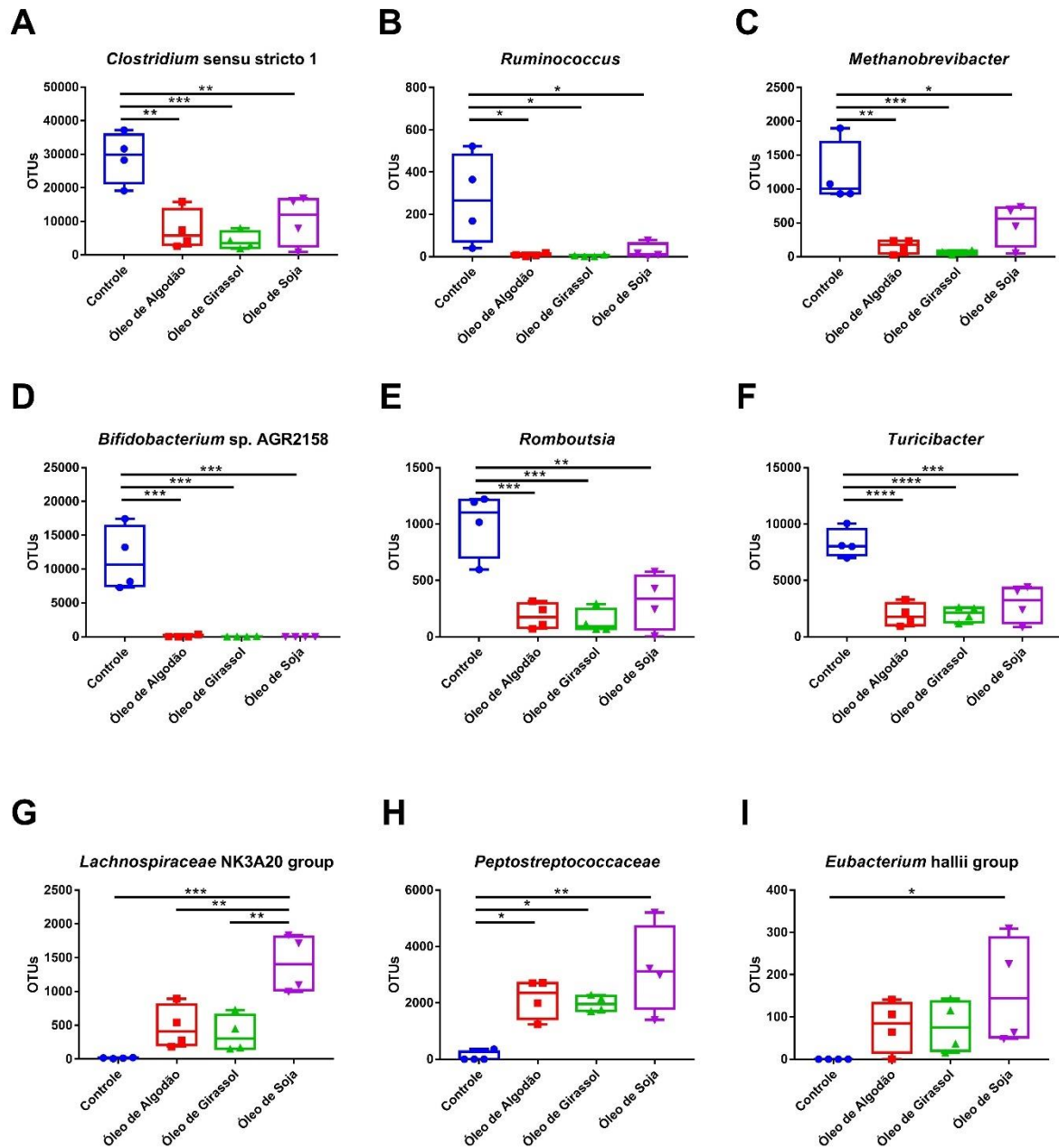
Figura 16 - Perfil microbiano em diferentes níveis taxonômicos (domínio e filo) e diversidade alfa em amostras fecais obtidas em D+30 em novilhas leiteiras suplementadas com óleos vegetais em comparação à dieta controle



Painel A – percentagem de OTUs em nível taxonômico de domínio; **Painel B** – percentagem de OTUs em nível taxonômico de filo; **Painel C** – diversidade alfa pelo índice de Shannon; médias iguais pelo teste F de Fisher ($p > 0,05$).

Todavia, assim como no material ruminal, análises individuais em nível de gênero nas amostras fecais demonstraram modulação, positiva ou negativa, de acordo com os tratamentos (Figura 17). As três dietas com adição de óleos vegetais foram capazes de reduzir a presença de seis gêneros: *Clostridium sensu stricto* 1 (Figura 17 A), *Ruminococcus* (Figura 17 B), *Methanobrevibacter* (Figura 17 C), *Bifidobacterium* sp. AGR2158 (Figura 17 D), *Romboutela* (Figura 17 E) e *Turicibacter* (Figura 17 F). A suplementação do óleo de soja foi capaz de modular positivamente os gêneros *Lachnospiraceae* NK3A20 (Figura 17 G) e *Eubacterium hallii* group (Figura 17 I). O único gênero modulado positivamente por todos os tratamentos com óleos vegetais foi o *Peptostreptococcaceae* (Figura 17 H).

Figura 17 - Gêneros microbianos sensíveis à suplementação com óleos vegetais em amostras fecais obtidas de novilhas leiteiras



Painéis A-I: número de OTUs detectados para diferentes gêneros microbianos; asteriscos indicam diferença estatística pelo teste F de Fisher, com pós teste de Bonferroni: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$.

6. Discussão

Vacas leiteiras estão particularmente susceptíveis ao BEN durante o período de transição. Uma questão que tem sido investigada por diferentes grupos de pesquisa, incluindo o nosso, é se a suplementação com fontes lipídicas ricas em PUFA's poderia constituir uma alternativa viável na prática pecuária para mitigar os efeitos deletérios do BEN. Para isso, é muito importante conhecer tanto os mecanismos moleculares de ação dessa suplementação, bem como os efeitos dela na saúde e bem-estar animal.

Nesse cenário, é importante ressaltar que a maioria dos estudos realizados até então utilizou modelos *in vitro*, ácidos graxos isolados ou lipídeos de origem animal como estratégias de intervenção. Assim, o presente trabalho buscou adotar uma abordagem nutrigenômica mais abrangente, investigando simultaneamente os efeitos da suplementação com diferentes óleos vegetais sobre a expressão de genes relacionados ao receptor PPAR- α , sobre o metabolismo lipídico hepático, e sobre parâmetros de saúde e produtividade em novilhas leiteiras. Este estudo também integrou análises *in vivo* de perfis lipídicos séricos, parâmetros de bioquímica clínica, PFAs e microbiomas ruminal e fecal, proporcionando uma compreensão multifacetada dos impactos das dietas utilizadas.

As implicações da suplementação com ácidos graxos em dietas de bovinos leiteiros sobre a expressão de genes hepáticos associados ao metabolismo lipídico não são totalmente compreendidas. Pesquisas anteriores, predominantemente conduzidas *in vitro*, lançaram luz sobre um papel central dos AGCL como agonistas do PPAR- α na modulação da expressão gênica no fígado (Bionaz, Thering e Loo, 2012; Weld, Erb e White, 2019; Zhou *et al.*, 2014).

Notadamente, apenas um estudo *in vivo* foi conduzido até agora em vacas leiteiras, o qual avaliou os efeitos sobre o PPAR- α , por meio da inclusão de uma mistura de gordura hidrolisada de origem vegetal e animal (Energy Booster100™) e do óleo de peixe em suas dietas (Akbar *et al.*, 2013). Isso ressalta a importância da presente análise, que examina especificamente o impacto epigenético da incorporação exclusiva de óleos vegetais na nutrição de bovinos.

O principal critério para a seleção dos óleos utilizados neste trabalho foi a sua diversidade em relação aos perfis de ácidos graxos, mas também seu preço e disponibilidade no mercado. Entre os três óleos escolhidos, o óleo de algodão se diferencia pelos maiores teores de ácidos graxos saturados (26,0 %), o óleo de soja se destaca pelos maiores teores de ácido α -

linoleico, n-3 (6,8 %), enquanto o óleo de girassol é caracterizado por uma maior percentagem de ácido linoleico, n-6 (68,0%) (Raymon *et al.*, 2016).

Além do próprio PPARA, cinco dos oito genes candidatos relacionados ao metabolismo lipídico hepático, cujo efeito regulatório do PPAR- α já havia sido comprovado por estudos *in vitro* (Bionaz, Thering e Loor, 2012; Weld, Erb e White, 2019; Zhou *et al.*, 2014), foram selecionados para análise no presente estudo.

A inclusão de diferentes óleos na dieta das novilhas resultou em alterações no perfil de expressão de parte dos genes candidatos selecionados. Os achados mais notáveis foram relacionados aos genes HMGCR e CD36.

O aumento na expressão do gene HMGCR, observado nos grupos de animais suplementados com os três óleos diferentes, é digno de nota e consistente com achados anteriores *in vitro*, observados com culturas de células bovinas (Bionaz, Thering e Loor, 2012).

A enzima codificada pelo gene HMGCR desempenha um papel direto na capacidade do fígado de utilizar acetil-CoA para a produção de colesterol. Assim, o aumento da expressão deste gene nos grupos suplementados com óleos pode ser interpretado como um mecanismo compensatório para aumentar o *clearance* (depuração) hepático de acetil-CoA, potencialmente prevenindo o acúmulo de TAG no fígado bovino.

Além disso, os hepatócitos de ruminantes são reconhecidos pela sua capacidade limitada de secretar VLDL (Kleppe *et al.*, 1988; Pullen, Liesman e Emery, 1990), particularmente em baixas concentrações de colesterol (Kessler *et al.*, 2014). Portanto, além de aliviar a maquinaria de oxidação de ácidos graxos (β -oxidação), o aumento da síntese de colesterol no fígado poderia desempenhar um papel crucial na prevenção do acúmulo de TAG dentro dos hepatócitos bovinos durante o BEN.

Poder-se-ia questionar se a hipoinsulinemia, esperada para bovinos durante o BEN, poderia neutralizar o potencial efeito benéfico do aumento da expressão de HMGCR induzida pela inclusão dietética de óleos. De fato, estudos com animais monogástricos, como os murinos, tanto *in vitro* (Bhasker e Friedmann, 2008) como *in vivo* (Ness, Zhao e Wiggins, 1994), já mostraram a importância da insulina no aumento da expressão do gene HMGCR. No entanto, outros estudos demonstraram, em vacas leiteiras, uma regulação positiva significativa de HMGCR após o parto, coincidindo com a diminuição das concentrações plasmáticas de insulina

(Dorland, van *et al.*, 2009; Gross *et al.*, 2011; Viturro *et al.*, 2009). Assim, é possível depreender que em bovinos a expressão de HMGCR pode ser aumentada pela inclusão de óleos, mesmo se os níveis plasmáticos de insulina estiverem baixos.

Estes resultados contrastantes entre murinos e ruminantes são significativos não apenas porque apoiam a hipótese deste presente trabalho, de que a inclusão de óleos vegetais na dieta de vacas leiteiras pode prevenir a esteatose hepática durante o BEN, mas também porque enfatizam a importância da realização de pesquisas *in vivo* e adaptadas especificamente ao gado leiteiro. Os resultados de estudos com animais monogástricos nem sempre são diretamente aplicáveis aos ruminantes.

Em relação aos resultados do CD36, observamos uma diminuição na expressão desse gene nos grupos suplementados com óleos, principalmente com óleos de girassol e soja. Esses resultados corroboram os achados de Akbar *et al.* (2013). A proteína CD36, entre suas diversas funções, facilita o transporte de AGCL para os hepatócitos (Silverstein e Febbraio, 2009). Portanto, a menor expressão observada do gene CD36 em animais suplementados com óleos pode ser interpretada como uma estratégia evolutiva adaptativa para mitigar o acúmulo de gordura no fígado.

Curiosamente, os resultados de redução da expressão de CD36, observados em nosso trabalho e por Akbar *et al.* (2013), contrastam com os achados de Bionaz, Thering e Loor (2012), que observaram uma regulação positiva da expressão do gene CD36 em culturas de células MDBK expostas a ácidos graxos e WY-14643. No entanto, as diferenças entre os estudos podem ser atribuídas aos padrões distintos de expressão do gene CD36, dependendo do tipo de tecido avaliado, reflexo de suas múltiplas funções celulares (Busato e Bionaz, 2020; Silverstein e Febbraio, 2009).

Adicionalmente, em contraste com pesquisas anteriores (Bionaz, Thering e Loor, 2012; Weld, Erb e White, 2019; Zhou *et al.*, 2014), o presente estudo não encontrou mudança significativa na expressão de PPARA, CPT1A, OCTN2 e ANGPTL4. Tais diferenças podem ser devidas à natureza do modelo *in vivo*, utilizado no presente estudo em comparação com as configurações *in vitro*, ou ainda relativo às diferentes fontes lipídicas nos diversos trabalhos. É importante ainda considerar que a expressão dos genes analisados pode estar sujeita a outros mecanismos regulatórios além daqueles que envolvem o PPAR- α , o que seria mais bem detectado em sistemas *in vivo* de análises. Nesse contexto, nossos resultados enfatizam a

importância de se conduzir pesquisas em nutrigenômica em condições mais próximas o possível das condições naturais da pecuária.

Além disso, o momento da suplementação com óleo também deve ser levado em consideração. Os resultados aqui observados demonstram que os efeitos mais significativos na expressão dos genes alvo do PPAR- α ocorreram em D+15.

Uma possível explicação para este efeito dependente do tempo da inclusão de óleo na dieta sobre a expressão gênica hepática poderia ser a adaptação do microbioma ruminal à maior ingestão de ácidos graxos pelos animais. Esta ideia está alinhada com estudos anteriores que investigaram a relação entre a dieta e o microbioma ruminal (Lillis *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2019) e justificam a nossa preocupação de avaliarmos também o efeito potencial da dieta nos animais, suplementados ou não com óleos vegetais, sobre os microbiomas do TGI.

Os resultados referentes ao CMS e ao GP, bem como os resultados referentes a diversos parâmetros de bioquímica clínica, incluindo lipídeos e enzimas séricas, bem como PFAs, sugerem que a inclusão de óleos na dieta não teve impacto negativo nos parâmetros relacionados à saúde geral e ao desempenho das novilhas.

Apesar da notável redução no CMS observada no grupo alimentado com óleo de algodão (14,5% menor), o GP dos animais não foi significativamente afetado. Este achado é particularmente interessante e valioso do ponto de vista prático, pois sugere que a inclusão de óleo de algodão na dieta das vacas leiteiras pode ser feita sem comprometer o desempenho produtivo dos animais, mesmo com uma redução na ingestão de matéria seca.

A redução no CMS no grupo alimentado com óleo de algodão pode estar relacionada ao maior teor calórico dos óleos, visto que lipídeos fornecem cerca de 2,25 vezes mais energia por unidade de peso em comparação a carboidratos e proteínas, o que permite que os animais satisfaçam suas necessidades energéticas com uma menor ingestão de alimento volumoso. Este efeito já foi documentado em alguns outros estudos.

Por exemplo, Jenkins e Harvatine (2014) observaram que a adição de lipídios à dieta pode reduzir o CMS devido ao aumento da densidade energética, permitindo que os animais mantenham o GP mesmo com menor ingestão total de matéria seca. Além disso, os ácidos graxos presentes nos lipídios podem melhorar a eficiência metabólica e a digestibilidade dos nutrientes, o chamado “efeito extracalórico” dos lipídeos, os quais resultam em melhor

aproveitamento dos alimentos consumidos e maior GP, sem comprometer a saúde dos animais (Glasser, Ferlay e Chilliard, 2008; Jenkins e Harvatine, 2014; Tatum *et al.*, 1988).

Para além do GP e do CMS, um outro aspecto investigado no presente trabalho foi o efeito da suplementação de óleos sobre a composição lipídica no soro dos animais.

Nossos resultados indicam que a suplementação com os três óleos vegetais utilizados (algodão, girassol e soja) promoveu um aumento significativo nos níveis de CT e HDL ao longo dos períodos experimentais. O aumento nos níveis séricos de CT e HDL pode ser explicado pelo alto teor de ácidos graxos presentes nos óleos vegetais, os quais são conhecidos por influenciar positivamente o perfil lipídico dos ruminantes (Altenhofer *et al.*, 2014; Yousef *et al.*, 2022). Particularmente, os níveis de CT foram significativamente maiores nos grupos suplementados, com valores ainda mais altos observados na dieta com óleo de algodão, seguido pelas dietas com óleo de girassol e óleo de soja.

O estudo de Altenhofer *et al.* (2014) corrobora os nossos achados e indica que a suplementação com óleos vegetais pode aumentar os níveis séricos de CT devido à maior ingestão de ácidos graxos insaturados, os quais são eficazes na modulação do metabolismo lipídico. Ainda segundo esses autores, a inclusão de óleos vegetais na dieta aumenta a densidade energética, o que pode levar a uma maior produção de lipoproteínas no fígado e se refletir nos níveis elevados de CT no sangue. De fato, na presente pesquisa, a inclusão de óleos vegetais esteve relacionada ao aumento da expressão do gene codificador da enzima HMGCR no fígado, fator chave para maior produção de colesterol pelo organismo, bem como ao aumento nos níveis de HDL e de Apolipoproteína-A4.

Neste trabalho não foram utilizadas vacas em lactação e, portanto, a composição lipídica do leite não foi investigada. Todavia, curiosamente, no estudo de Altenhofer *et al.* (2014), a inclusão de óleo de colza e de soja na dieta das vacas no pós-parto, apesar de aumentar os níveis séricos de CT, diminuiu os níveis de colesterol no leite, algo positivo do ponto de vista da qualidade do produto para a saúde humana. Esse mesmo efeito, de diminuição do CT no leite das vacas, também foi observado no estudo de Salles *et al.* (2019), com a inclusão de óleo de girassol na dieta. Esses achados reforçam a expectativa de que a suplementação com óleos vegetais, utilizada no presente trabalho, também não levaria a um aumento indesejável nos níveis de colesterol no leite das vacas.

Ademais, como mencionado, no presente trabalho foram observados aumentos nos níveis séricos de HDL nos grupos suplementados com óleo em comparação ao controle. Glasser, Ferlay e Chilliard (2008), em sua metanálise sobre os efeitos da inclusão de oleaginosas na dieta de vacas, demonstraram que a inclusão de ácidos graxos insaturados, particularmente os presentes em óleos como o de soja e girassol, está associada a aumentos nos níveis de HDL, fator benéfico para a saúde cardiovascular dos animais. Yousef et al. (2022), os quais estudaram a inclusão de óleo de milho na dieta de cabras leiteiras, também encontraram que a inclusão de óleo vegetal, rico em ácidos graxos monoinsaturados e polinsaturados, aumenta os níveis séricos de HDL e é indicativo de um perfil lipídico sérico mais saudável, pois o HDL desempenha um papel crucial no transporte reverso de colesterol, o que contribui para a remoção dessa molécula das células e transporte ao fígado para a excreção biliar.

Em relação aos TAGs, embora não tenha sido observada diferença nos níveis séricos entre os grupos em D+0, os níveis aumentaram ao longo do período experimental para todos os grupos, especialmente nas dietas suplementadas com óleo. Esse aumento sugere uma absorção eficiente dos ácidos graxos fornecidos pelos óleos vegetais, uma vez que TAGs presentes nas fontes lipídicas sofrem hidrólise no TGI, seus componentes são absorvidos e, no interior do enterócito, antes de ocorrer a formação dos quilomícrons, são reesterificados (Bionaz, Vargas-Bello-Pérez e Busato, 2020).

Quanto aos níveis de BHB, não houve variações significativas ao longo do tempo ou entre as dietas, indicativo de que a suplementação com óleos vegetais não promoveu efeito cetogênico nos animais. Em contraste, os níveis de NEFA aumentaram tanto com a suplementação de óleo quanto com o tempo, refletindo um aumento nos lipídios circulantes. Esses resultados são intrigantes e podem decorrer da maior mobilização de ácidos graxos dos tecidos adiposos, promovida pela suplementação lipídica.

Segundo Imhasly et al. (2015), a inclusão de óleos vegetais aumenta a densidade energética da dieta, o que pode reduzir o CMS, aumentar a mobilização de reservas de gordura corporal e se refletir em níveis sanguíneos aumentados de NEFA. De fato, no presente estudo, a inclusão de óleos vegetais reduziu o CMS, o que poderia explicar o aumento nos níveis séricos de NEFA, porém, se verdadeiramente houve mobilização de tecido adiposo nos animais suplementados com fonte lipídica, isso não se refletiu em perda de peso corporal. Pelo contrário, o GP, como já mencionado, foi o mesmo para todos os grupos experimentais, incluindo o grupo controle, sem adição de óleo.

Esses achados ressaltam a importância de se avaliar a composição do GP, ou seja, se há predomínio de ganho de massa magra ou de tecido adiposo nas vacas suplementadas com óleos vegetais. No entanto, esse tipo de análise geralmente envolve o abate e avaliação da carcaça dos animais, algo impraticável no contexto do presente estudo uma vez que envolveu novilhas de reposição. Uma alternativa seria o uso da bioimpedância, porém trata-se de uma metodologia ainda em validação para sua aplicação em bovinos (Schumacher *et al.*, 2021).

Por outro lado, uma hipótese que não pode ser descartada é que o aumento dos NEFAs circulantes seja decorrente da menor internalização de ácidos graxos pelos hepatócitos, como consequência da observada redução da expressão de CD36 nos animais suplementados com óleos vegetais.

Em síntese, as análises de lipídeos séricos indicaram que a suplementação com óleos vegetais melhorou o perfil lipídico das novilhas leiteiras, aumentando os níveis de CT e HDL e, ao mesmo tempo, aumentou os níveis de NEFAs na circulação. Isso sugere uma adaptação metabólica à ingestão de ácidos graxos sem efeitos cetogênicos ou comprometimento do GP.

Com o objetivo adicional de se monitorar a saúde dos animais ao longo dos experimentos, neste trabalho, foram ainda investigados oito parâmetros de bioquímica clínica – AST, GGT, LDH, lactato, glicose, PT, ureia e creatinina. Nossos resultados demonstram que a adição dos óleos de algodão, girassol e soja também não impactou negativamente as funções hepática e renal, nem o metabolismo da glicose e do lactato.

Os níveis séricos das enzimas AST e GGT mantiveram-se dentro da faixa de referência para a espécie bovina e não sofreram influência das dietas e nem do tempo de amostragem, indicativo de adequada função hepática.

Já os níveis da enzima LDH, glicemia e proteinemia estiveram levemente fora da faixa de referência (em média 18%, 20% e 3,7% acima do limite máximo, respectivamente) em todos os grupos.

A enzima LDH desempenha um papel importante no campo médico, como biomarcador para afecções em diferentes tecidos animais, tanto as de natureza infecciosa, como metabólica ou tumoral (Zhou, Qi e Yang, 2022). Entretanto, as razões para o pequeno aumento detectado de LDH em nosso estudo não foram evidentes já que não houve diferença entre dietas e tempos

de amostragem e que a maior parte dos demais parâmetros de saúde permaneceram dentro da faixa esperada.

Já em relação à glicemia, embora estivesse ligeiramente aumentada nas amostragens iniciais em todos os grupos, houve uma tendência de redução ao longo do tempo, em especial para o grupo tratado com óleo de girassol. Em D+30 foi possível observar que todos os grupos estão na faixa considerada normal para a espécie.

Comportamento semelhante ao da glicemia foi observado para a proteinemia. Em D+30 foi possível observar valores de PT dentro da faixa de normalidade ou até mesmo ligeiramente abaixo do limite mínimo da faixa de referência (em média 5,8% abaixo).

Essa ligeira e transitória alta da glicemia e da proteinemia nos primeiros tempos de amostragem, seguida de uma normalização, pode indicar uma resposta adaptativa metabólica à dieta basal a que todos os animais foram expostos a partir de D-15, porém, aparentemente sem risco de hiperglicemia ou hiperproteinemia persistentes. De fato, em um estudo recente, autores evidenciaram uma variedade de fatores que poderiam influenciar os níveis séricos de glicose, proteínas e outros metabólitos em bovinos leiteiros, incluindo adaptações fisiológicas à introdução de novas dietas e manejo alimentar (Fazio *et al.*, 2022).

Outra explicação que não pode ser descartada é o fato de o sangue ter sido coletado no período pós-prandial e não com os animais em jejum, visto haver importantes flutuações nos níveis de diferentes metabólitos, especialmente da glicemia, a depender do período do dia em que se faz a amostragem (Hussein, Thurmann e Staufenbiel, 2020).

É interessante observar que a queda nos níveis de proteínas circulantes ao longo do tempo coincidiu com a elevação nos níveis sanguíneos de ureia. Esse comportamento é esperado em um cenário em que o excesso de proteínas circulantes é catabolizado, com consequente maior atividade do ciclo da ureia pelo fígado. Ademais, a análise de Pearson comprovou a existência de correlação negativa significativa entre ureia e PT ($P < 0,05$).

Todavia, em relação aos níveis de ureia, mas também em relação aos níveis de creatinina no soro dos animais, todos os grupos, e em todos os tempos de amostragem, apresentaram valores dentro da faixa de referência para a espécie, algo consistente com uma função renal normal dos animais, segundo Thrall *et al.* (2012).

Para monitorar eventuais efeitos no estado inflamatório dos animais suplementados com óleos, foram ainda analisadas cinco PFAs positivas, cujo aumento em seus níveis séricos pode indicar a ocorrência de reação de fase aguda (haptoglobina, glicoproteína ácida, ceruloplasmina e apolipoproteínas A1 e A4) e cinco PFAs negativas, cuja diminuição em seus níveis séricos pode indicar a ocorrência de reação de fase aguda (albumina, α -2-macroglobulina, IgG de cadeia pesada, IgG de cadeia leve e transferrina).

A literatura aponta que, para se estabelecer o diagnóstico de uma reação de fase aguda, são necessárias alterações nos níveis séricos das PFAs de no mínimo 25%, para mais ou para menos (Davidson, 2013). No presente estudo, foram observadas alterações significativas, aumento ou diminuição, em sete PFAs, variando entre 26,4 e 80%, em relação ao tempo zero e/ou controle. Todavia, dessas sete PFAs, apenas ceruloplasmina e apolipoproteína A4, apresentaram efeitos relacionados às dietas. Para as demais observou-se apenas o efeito isolado do tempo.

Nos casos em que se observou apenas o efeito isolado do tempo (cinco das sete PFAs variantes), muito provavelmente, o fator causador das alterações foi algo a que todos os animais, independentemente da dieta, estavam sujeitos. Uma possibilidade que não pode ser descartada é um efeito resultante do estresse cirúrgico das biópsias. Todavia, não foram observados processos infecciosos, nem inflamatórios, ou falhas cicatriciais, na avaliação clínica médico veterinária do sítio cirúrgico dos animais. Ademais, a avaliação clínica geral e a avaliação de diversos outros parâmetros, como o GP e parâmetros de bioquímica clínica, permitem concluir que os animais não foram submetidos a processos patológicos ou a outro tipo de estresse que pudesse desencadear uma resposta de fase aguda significativa.

Em relação à ceruloplasmina, que é considerada uma PFA positiva, houve redução em D+30 nos tratamentos com os óleos de girassol e soja (interação dieta x tempo significativa); ou seja, indicativo de um hipotético efeito anti-inflamatório.

Em relação à apolipoproteína A4, também considerada uma PFA positiva, observou-se aumento, de 27% a 34%, em todos os grupos suplementados com óleos vegetais, independentemente do tempo. Esse achado poderia ser indicativo da ocorrência de algum processo inflamatório relacionado à inclusão de óleos. Entretanto, há que se considerar também a possibilidade do aumento das apolipoproteínas ser oriundo da dieta rica em lipídeos e não de um eventual processo inflamatório.

De fato, o aumento de apolipoproteína A4 pode ser atribuído ao maior aporte de PUFA na dieta dos animais, os quais são conhecidos por modularem a expressão de proteínas envolvidas no transporte de lipídios. Estudos com humanos evidenciam que dietas ricas em PUFA aumentam a expressão de apolipoproteínas, pela modulação da expressão gênica mediada pelo receptor PPAR- α (Schmidt *et al.*, 2012; Zhou e Luo, 2020).

Obviamente, que uma observação sistemática de aumento de PFAs positivas ou redução de PFAs negativas, em especial nos grupos suplementados com os óleos, seria um forte indicativo de processo inflamatório induzido pelas dietas. Todavia, com isso não foi observado em nossos grupos experimentais, é possível, com razoável segurança, afirmar que não há indicativo de processos inflamatórios nestes animais.

Finalmente, o último objetivo do presente trabalho foi o de avaliar possíveis efeitos das dietas ricas em PUFA, provenientes dos óleos vegetais, sobre os microbiomas ruminal e fecal das novilhas.

Conforme já exposto, há um razoável consenso na literatura que dietas ricas em lipídeos podem influenciar o crescimento e a sobrevivência de microrganismos no TGI, especialmente em animais ruminantes. Esses efeitos, em geral, implicam em impactos deletérios sistêmicos, uma vez que a atividade microbiana nos pré-estômagos em especial, mas também no intestino grosso, é fundamental para que o ruminante possa obter da dieta nutrientes vitais, como AGCC, proteínas e vitaminas. Assim, qualquer proposta de inclusão de óleos nas dietas de bovinos suscita a necessidade de se realizar a análise do efeito sobre o microbioma desses animais.

A abordagem eleita para o estudo dos impactos das dietas sobre os microbiomas foi a análise metagenômica de fluido ruminal e de fezes de bovinos pela técnica de sequenciamento de *amplicon* do gene 16S rRNA. Essa abordagem permite identificar e classificar os microrganismos com alta precisão taxonômica, visto que ela se baseia na amplificação sensível de regiões conservadas do gene 16S rRNA, seguida da discriminação entre diferentes domínios, filos e gêneros microbianos pelo sequenciamento de suas regiões hipervariáveis (Datta *et al.*, 2020; Navgire *et al.*, 2022).

A escolha do sequenciamento de *amplicon* foi ainda influenciada pela sua eficiência e custo-benefício em comparação com outras técnicas, como o sequenciamento metagenômico *shotgun*. Embora esse último forneça maior resolução e informação funcional, o sequenciamento de *amplicon* é amplamente utilizado para estudos de larga escala, devido à sua

capacidade de gerar dados taxonômicos robustos com menos requisitos de recursos (Liu et al., 2021).

As análises realizadas no presente trabalho, relativas aos impactos globais da suplementação com óleos vegetais sobre os perfis microbianos obtidos para as amostras de fluido ruminal e de fezes, foram estruturadas em três eixos: (i) composição dos microbiomas (níveis taxonômicos de domínio, filo e gênero), (ii) função metabólica e (iii) correlação com saúde e produção.

No geral, foi observada uma grande prevalência de bactérias em relação às arqueias em todas as amostras de fluido ruminal, o que confirma um padrão já descrito na literatura. A maior parte do microbioma ruminal consiste em microrganismos bacterianos relacionados à fermentação e à degradação de nutrientes (Lin *et al.*, 2023; Loor, Elolimy e McCann, 2016; Malmuthuge e Guan, 2017).

Dentro do domínio bacteriano, houve predomínio dos filos Firmicutes e Bacteroidota corroborando investigações anteriores que identificaram esses grupos como a base estrutural do microbioma ruminal e fecal (Cancino-Padilla *et al.*, 2021; Henderson *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2023; Lin *et al.*, 2023; Xie *et al.*, 2023). Em geral, Firmicutes incluem micro-organismos produtores de enzimas celulolíticas e de AGCC, enquanto Bacteroidota abrigam espécies envolvidas na degradação de polissacarídeos complexos e proteínas (Ge *et al.*, 2023; Hu *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2023). A estabilidade desse ecossistema, ligada ao balanço entre Firmicutes e Bacteroidota, reflete o bom aproveitamento de nutrientes no rúmen dos animais (Cancino-Padilla *et al.*, 2023; Huang *et al.*, 2021; Loor, Elolimy e McCann, 2016).

Apesar do indiscutível predomínio de bactérias, foi observada a presença considerável de representantes de arqueais do filo Euryarchaeota, composto principalmente por metanogênicos do gênero *Methanobrevibacter*. Esse último gênero correspondeu, em média, a 81% da composição do filo para as amostras de rúmen, o que corrobora a ideia da relevância da ocorrência de metanogênicos no TGI de ruminantes (Darabighane *et al.*, 2021; Yu *et al.*, 2024). Estudos recentes mostram que esses microrganismos influenciam diretamente a eficiência alimentar e a produção de metano, com implicações na sustentabilidade de sistemas pecuários (Khurana *et al.*, 2023; Martin, Morgavi e Doreau, 2010; Morgavi *et al.*, 2013; Winders *et al.*, 2023).

É importante ressaltar que, embora a redução de arqueais metanogênicos pela incorporação de lipídeos na dieta vem sendo alvo de estudos por seu potencial de mitigação das emissões de gases de efeito estufa (Darabighane *et al.*, 2021; Winders *et al.*, 2023), no presente trabalho, esse comportamento não foi observado para as amostras de rúmen. Em todo caso, a manutenção de pequenas percentagens de arqueais nos pré-estômagos reflete o necessário equilíbrio entre a fermentação bacteriana e a produção de metano por arqueais (Khurana *et al.*, 2023; Martin, Morgavi e Doreau, 2010).

Em relação à composição do microbioma ruminal, a análise do índice de Shannon não indicou diferenças na diversidade alfa entre os grupos, sugerindo que a inclusão de óleos vegetais não modificou de forma significativa a riqueza global de espécies no rúmen desses animais em comparação ao controle. Esse resultado coincide com alguns estudos prévios, nos quais a adição de lipídeos em níveis similares aos utilizados neste trabalho não causou impactos expressivos na diversidade microbiana ruminal (Cancino-Padilla *et al.*, 2023; Darabighane *et al.*, 2021; Khurana *et al.*, 2023; Lillis *et al.*, 2011). Todavia, ainda que não tenha havido mudança significativa na alfa-diversidade, foram observadas variações pontuais em gêneros bacterianos específicos, o que sugere adaptações funcionais sutis, possivelmente mascaradas no índice de Shannon pela resiliência do microbioma (Malmuthuge e Guan, 2017; You *et al.*, 2025).

Conforme proposto por Doreau e Ferlay (1994) e corroborado por Li *et al.* (2023) e Zhou *et al.* (2022), a homeostase do rúmen envolve mecanismos de compensação entre microrganismos, de modo que mudanças na dieta podem impactar grupos específicos sem necessariamente alterar a diversidade global. Em nosso trabalho, observou-se modulação positiva de gêneros intimamente ligados à biohidrogenação de ácidos graxos, como *Butyrivibrio* e *Pseudobutyrvibrio*, consistentes com achados prévios (Cancino-Padilla *et al.*, 2021; Huang *et al.*, 2023; Jenkins *et al.*, 2008; Maia *et al.*, 2010). Espécies de *Butyrivibrio* realizam etapas essenciais na hidrogenação de ácidos linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3), o que determina a produção de ácidos graxos mais saturados e de isômeros do CLA (Paillard *et al.*, 2007; Shingfield, Bonnet e Scollan, 2013). De maneira similar, *Pseudobutyrvibrio* pode assumir papel complementar nessa via, particularmente em condições de maior oferta de lipídeos vegetais (Abdelrahman *et al.*, 2023). O aumento observado nesses gêneros indica uma adaptação interessante, quer do ponto de vista da saúde animal quer do ponto de vista dos produtos deles obtidos (leite e carne, por exemplo), visto que tais gêneros microbianos têm sido

apontados como fundamentais para o ajuste do perfil lipídico em ruminantes (Huang *et al.*, 2021; Sato *et al.*, 2021; Torres Manno *et al.*, 2023).

Adicionalmente, houve redução no número de OTUs do gênero *Prevotella* com a inclusão de óleos vegetais, um achado que pode ser vantajoso dependendo de alguns fatores. Por um lado, *Prevotella* é amplamente reconhecida por sua participação na fermentação de carboidratos e produção de AGCC, especialmente propionato, estando associada à eficiência de aproveitamento dos alimentos (Betancur-Murillo, Aguilar-Marín e Jovel, 2022; Kou *et al.*, 2024). Assim, uma queda excessiva em sua abundância poderia, em teoria, comprometer parte do metabolismo ruminal e o ganho de performance. Por outro lado, certas espécies de *Prevotella* podem atuar em sinergia com outros micro-organismos favorecendo a produção de metano (Shinkai *et al.*, 2024). Desse modo, sua redução, dependendo das espécies afetadas, pode contribuir para um redirecionamento do fluxo de hidrogênio a vias menos metanogênicas (Cancino-Padilla *et al.*, 2021). Em suma, como ocorreu em nosso trabalho, a diminuição de *Prevotella*, decorrente da adição de óleos vegetais, pode ter benefícios tanto ambientais (menor metanogênese) como metabólicos (maior redirecionamento de hidrogênio para outras rotas, como a produção de propionato), sem perdas no desempenho produtivo.

Resultados semelhantes foram observados em relação à metagenômica fecal. Em nível de Filo, foi observada, como no rúmen, dominância de Firmicutes no conteúdo fecal dos bovinos. Esses resultados reforçam achados anteriores e demonstram o papel crucial dessas bactérias na degradação de compostos alimentares residuais e produção de AGCC no final do trato digestório (Cancino-Padilla *et al.*, 2023; Jami, White e Mizrahi, 2014). Todavia, a proporção de arqueais em relação às bactérias foi ainda menor no material fecal comparado com o rúmen. De fato, estudos anteriores demonstram que a proporção de arqueias tende a diminuir ao longo do trato digestório (Lin *et al.*, 2023; Xie *et al.*, 2023).

Assim como no rúmen, também a alfa-diversidade não sofreu alteração significativa no conteúdo fecal. Todavia, algumas mudanças pontuais ocorreram em resposta à suplementação com os óleos. A diminuição de *Clostridium sensu stricto* 1 e *Ruminococcus* pode indicar menor disponibilidade ou utilização de substratos fibrosos (Hu *et al.*, 2023; Koike e Kobayashi, 2009). O declínio de *Methanobrevibacter* é relevante, pois pode sinalizar menor produção de metano no intestino grosso, nesse caso, corroborando a hipótese de que certos ácidos graxos podem exercer efeito inibitório sobre arqueias metanogênicas (Abdelrahman *et al.*, 2023; Maia *et al.*, 2010).

A ausência de diferenças sobre o gênero *Methanobrevibacter* no rúmen, contrapondo-se à redução observada nas amostras fecais dos animais suplementados com óleos, sugere que a resposta à suplementação lipídica pode variar ao longo do TGI (Thacharodi *et al.*, 2024). Estudos que analisaram populações microbianas ao longo de todo TGI confirmam que o perfil microbiano na porção final do intestino pode responder de maneira distinta aos aditivos ou alterações dietéticas, sem necessariamente repercutir no rúmen (Lourenco *et al.*, 2020). Esse comportamento pode estar relacionado a diferenças locais de pH, disponibilidade de substrato e tempo de retenção, que modulam seletivamente o crescimento arqueano (Winders *et al.*, 2023).

Dessa forma, o efeito inibidor observado, no presente trabalho, sobre *Methanobrevibacter* apenas no intestino grosso — e não no rúmen — reforça a ideia de que a amostragem fecal, embora mais prática do ponto de vista técnico, não pode ser considerada como representativa do metabolismo ruminal. Adicionalmente, apesar de interessante do ponto de vista ecológico e potencialmente benéfico para reduzir a metanogênese distal, a redução de *Methanobrevibacter* apenas no cólon pode não ser significativa do ponto de vista da redução desejada na geração de metano pelos ruminantes (Martin, Morgavi e Doreau, 2010).

Outros micro-organismos fecais que se mostraram sensíveis à adição de óleos vegetais na dieta foram *Lachnospiraceae*, *Eubacterium* e *Peptostreptococcaceae*. O aumento de *Lachnospiraceae* NK3A20 e *Eubacterium hallii* group (no grupo suplementado com óleo de soja, por exemplo) sugere possíveis vantagens fermentativas e energéticas, pois esses microrganismos são capazes de produzir AGCC, consumir metabólitos intermediários gerados por outras bactérias e otimizar a fermentação de compostos complexos, resultando em maior disponibilidade de energia para o hospedeiro (Enjalbert *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2012). Ademais, o incremento de *Peptostreptococcaceae* em todos os grupos suplementados com óleos indica possível envolvimento desses micro-organismos em rotas fermentativas que lidam com diferentes substratos, inclusive lipídios (Huang *et al.*, 2023; Scicutella *et al.*, 2023).

Em síntese, a suplementação com diferentes óleos vegetais não alterou a diversidade alfa nem modificou a proporção de bactérias e arqueais no rúmen e nas fezes, mas promoveu mudanças pontuais em gêneros-chave. Esses achados contradizem a ideia prevalente de que o uso de lipídeos em altas concentrações poderia resultar em mudanças significativas nos microbiomas do TGI de ruminantes (Bionaz, Vargas-Bello-Pérez e Busato, 2020; Lopreiato *et al.*, 2020; Maia *et al.*, 2010). Por outro lado, esses resultados corroboram alguns outros

trabalhos, os quais demonstraram uma estabilidade mais alta desses microbiomas do que previamente imaginada, a qual seria sustentada por mecanismos de interação e compensação microbiana (Cancino-Padilla *et al.*, 2023; Ge *et al.*, 2023; Lourenco *et al.*, 2020; Malmuthuge e Guan, 2017; Vadroňová *et al.*, 2024). Assim, nossos resultados sugerem que percentagens de lipídeos superiores às indicadas como limites máximos pelo NRC poderiam ser investigadas.

Tomados em conjunto, os resultados obtidos neste trabalho mostraram que aumentar o fornecimento de ácidos graxos insaturados na dieta por 15 dias pode ter um efeito agonista no PPAR- α no fígado de vacas leiteiras, com potencial redução de esteatose hepática e cetose e aumento de síntese de colesterol e de HDL. Esses efeitos positivos, embora efêmeros, se somam a uma redução no CMS com manutenção da saúde, do GP e da diversidade global dos microbiomas ruminal e fecal. Isto implica que a incorporação de óleos na ração pode representar uma abordagem estratégica para mitigar, ou mesmo prevenir, os efeitos adversos do BEN em vacas no período periparto. Além disso, tem o potencial de sustentar parâmetros de produtividade e de bem-estar animal, com economicidade para os criadores.

7. Conclusões

Considerando o exposto, destacamos a seguir algumas das principais conclusões deste trabalho relativas à suplementação dietética de óleos vegetais em novilhas leiteiras.

- Foi observada a modulação de genes alvo do PPAR- α , com diminuição da expressão do gene codificador da translocase de ácidos graxos CD36 e o aumento da expressão do gene da enzima HMGCR.
- Esses achados potencialmente sugerem que a suplementação com óleos vegetais pode resultar em uma menor internalização de ácidos graxos, uma maior depuração de Acetil-CoA e um aumento da síntese de colesterol pelo fígado das novilhas.
- A suplementação com óleos vegetais promoveu GP mesmo em animais com redução no CMS, indicando melhora na eficiência alimentar.
- A inclusão de óleos na dieta resultou em aumento nos níveis séricos de NEFAs sem, no entanto, promover cetose nos animais.
- A suplementação lipídica, nos limites utilizados no presente trabalho, não causou efeitos indesejados sobre o estado de saúde global dos animais.
- Houve manutenção da diversidade e da composição globais dos microbiomas ruminal e fecal nos animais suplementados com óleos vegetais.
- Observou-se, todavia, aumento de gêneros bacterianos relacionadas à biohidrogenação ruminal, com potencial impacto positivo sobre o perfil lipídico da carne e do leite dos bovinos.
- Tomados em conjunto, nossos achados sugerem que a suplementação com óleos vegetais pode resultar em ganhos de produtividade e de eficiência alimentar, bem como resultar na manutenção da saúde e na prevenção de efeitos deletérios do BEN em vacas leiteiras.

8. Referências bibliográficas

- ABDELRAHMAN, M. *et al.* 16S rRNA Sequencing Reveals the Antibacterial Effect of Omega-3 (Fish Oil) against Fibrolytic Bacteria, Altering Fermentation and Volatile Fatty Acids Profile In Vitro. **Fermentation**, v. 9, n. 7, p. 596, 26 jun. 2023.
- AKBAR, H. *et al.* Dietary lipid during late-pregnancy and early-lactation to manipulate metabolic and inflammatory gene network expression in dairy cattle liver with a focus on PPARs. **Gene Regulation and Systems Biology**, v. 2013, n. 7, p. 103–123, 2013.
- AKBAR, H. *et al.* Body condition score at calving affects systemic and hepatic transcriptome indicators of inflammation and nutrient metabolism in grazing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 2, p. 1019–1032, fev. 2015.
- ALTENHOFER, C. *et al.* Effects of rapeseed and soybean oil dietary supplementation on bovine fat metabolism, fatty acid composition and cholesterol levels in milk. **Journal of Dairy Research**, v. 81, n. 1, p. 120–128, 19 fev. 2014.
- ANGELI, E. *et al.* Protein and gene expression of relevant enzymes and nuclear receptor of hepatic lipid metabolism in grazing dairy cattle during the transition period. **Research in Veterinary Science**, v. 123, p. 223–231, 1 abr. 2019.
- ANTONACCI, L. E. *et al.* Effects of Feeding Combinations of Soybean and Linseed Oils on Productive Performance and Milk Fatty Acid Profile in Grazing Dairy Cows. **Agricultural Sciences**, v. 08, n. 09, p. 984–1002, 2017.
- APRIANITA, A. *et al.* Effects of dietary cottonseed oil and tannin supplements on protein and fatty acid composition of bovine milk. **Journal of Dairy Research**, v. 81, n. 2, p. 183–192, 2014.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis of AOAC International. **Aoac**, v. 19th ed, n. February, 2012.
- BAKER, L. Y. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* responds to exogenous polyunsaturated fatty acids (PUFAs) by modifying phospholipid composition, membrane permeability, and phenotypes associated with virulence. **BMC Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 117, 14 dez. 2018.
- BERTONI, G. *et al.* Effects of Inflammatory Conditions on Liver Activity in Puerperium Period and Consequences for Performance in Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 9, p. 3300–3310, set. 2008.
- BETANCUR-MURILLO, C. L.; AGUILAR-MARÍN, S. B.; JOVEL, J. Prevotella: A Key Player in Ruminal Metabolism. **Microorganisms**, v. 11, n. 1, p. 1, 20 dez. 2022.
- BHASKER, C. R.; FRIEDMANN, T. Insulin-like growth factor-1 coordinately induces the expression of fatty acid and cholesterol biosynthetic genes in murine C2C12 myoblasts. **BMC Genomics**, v. 9, n. 1, p. 535, 2008.

BIONAZ, M.; THERING, B. J.; LOOR, J. J. Fine metabolic regulation in ruminants via nutrient-gene interactions: Saturated long-chain fatty acids increase expression of genes involved in lipid metabolism and immune response partly through PPAR- α activation. **British Journal of Nutrition**, v. 107, n. 2, p. 179–191, 28 jan. 2012.

BIONAZ, M.; VARGAS-BELLO-PÉREZ, E.; BUSATO, S. Advances in fatty acids nutrition in dairy cows: from gut to cells and effects on performance. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 110, 16 dez. 2020.

BOLAND, T. M. *et al.* Feed Intake, Methane Emissions, Milk Production and Rumen Methanogen Populations of Grazing Dairy Cows Supplemented with Various C 18 Fatty Acid Sources. **Animals**, v. 10, n. 12, p. 2380, 11 dez. 2020.

BOLYEN, E. *et al.* Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 852–857, 24 ago. 2019.

BRAGT, M. C. E.; POPEIJUS, H. E. Peroxisome proliferator-activated receptors and the metabolic syndrome. **Physiology & Behavior**, v. 94, n. 2, p. 187–197, 23 maio 2008.

BUSATO, S.; BIONAZ, M. The interplay between non-esterified fatty acids and bovine peroxisome proliferator-activated receptors: Results of an in vitro hybrid approach. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 11, n. 1, 11 ago. 2020.

CANCINO-PADILLA, N. *et al.* Long-Term Effects of Dietary Supplementation with Olive Oil and Hydrogenated Vegetable Oil on the Rumen Microbiome of Dairy Cows. **Microorganisms**, v. 9, n. 6, p. 1121, 22 maio 2021.

_____. Influence of dietary oils rich in omega-6 or omega-3 fatty acids on rumen microbiome of dairy cows. **Translational Animal Science**, v. 7, n. 1, 1 jan. 2023.

CECILIANI, F. *et al.* Acute phase proteins in ruminants. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 14, p. 4207–4231, jul. 2012.

CECILIANI, F.; GIORDANO, A.; SPAGNOLO, V. The Systemic Reaction During Inflammation: The Acute-Phase Proteins. **Protein & Peptide Letters**, v. 9, n. 3, p. 211–223, 1 jun. 2002.

CHEN, Y. *et al.* Effects of Bile Acid Supplementation on Lactation Performance, Nutrient Intake, Antioxidative Status, and Serum Biochemistry in Mid-Lactation Dairy Cows. **Animals**, v. 14, n. 2, p. 290, 17 jan. 2024.

CLARKE, S. D.; JUMP, D. B. Regulation of gene transcription by polyunsaturated fatty acids. **Progress in Lipid Research**, v. 32, n. 2, p. 139–149, jan. 1993.

DARABIGHANE, B. *et al.* Effects of Starch Level and a Mixture of Sunflower and Fish Oils on Nutrient Intake and Digestibility, Rumen Fermentation, and Ruminal Methane Emissions in Dairy Cows. **Animals**, v. 11, n. 5, p. 1310, 2 maio 2021.

DATTA, S. *et al.* Metagenomic applications in microbial diversity, bioremediation, pollution monitoring, enzyme and drug discovery. A review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 18, n. 4, p. 1229–1241, 22 jul. 2020.

DAVIDSON, S. J. Inflammation and Acute Phase Proteins in Haemostasis. *Em: Acute Phase Proteins*. [s.l.] InTech, 2013. .

DESJARDINS, P.; CONKLIN, D. NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. **Journal of Visualized Experiments**, n. 1, 22 nov. 2010.

DESVERGNE, B.; MICHALIK, L.; WAHLI, W. Transcriptional Regulation of Metabolism. **Physiological Reviews**, v. 86, n. 2, p. 465–514, abr. 2006.

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, fev. 1994.

DORLAND, H. A. VAN *et al.* Variation in hepatic regulation of metabolism during the dry period and in early lactation in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 5, p. 1924–1940, maio 2009.

DRACKLEY, J. K. Biology of Dairy Cows During the Transition Period: the Final Frontier? **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 11, p. 2259–2273, nov. 1999.

DU, X. *et al.* Adaptations of hepatic lipid metabolism and mitochondria in dairy cows with mild fatty liver. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 10, p. 9544–9558, out. 2018.

DUNN, O. J. Multiple Comparisons among Means. **Journal of the American Statistical Association**, v. 56, n. 293, p. 52–64, mar. 1961.

DUNN, O. J. Multiple Comparisons Using Rank Sums. **Technometrics**, v. 6, n. 3, p. 241–252, 1964.

EBRAHIMI, M. *et al.* Diet high in α -linolenic acid up-regulate PPAR- α gene expression in the liver of goats. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 210–214, 2015.

ECKERSALL, P. D.; BELL, R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **The Veterinary Journal**, v. 185, n. 1, p. 23–27, jul. 2010.

ELBAZ, S. *et al.* Impact of dietary eicosapentaenoic and docosahexaenoic fatty acids supplementation on inflammatory response of post calving cows during transition to lactation. **Slovenian Veterinary Research**, v. 56, n. 22- Suppl, 15 mar. 2019.

ENJALBERT, F. *et al.* Rumen microbiota and dietary fat: a mutual shaping. **Journal of Applied Microbiology**, v. 123, n. 4, p. 782–797, out. 2017.

FAZIO, E. *et al.* Changes of acute-phase proteins, glucose, and lipid metabolism during pregnancy in lactating dairy cows. **Archives Animal Breeding**, v. 65, n. 3, p. 329–339, 19 set. 2022.

FRIEDMAN, M. The Use of Ranks to Avoid the Assumption of Normality Implicit in the Analysis of Variance. **Journal of the American Statistical Association**, v. 32, n. 200, p. 675–701, 1937.

GABAY, C.; KUSHNER, I. Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. **New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 6, p. 448–454, 11 fev. 1999.

GE, T. *et al.* High-energy diet modify rumen microbial composition and microbial energy metabolism pattern in fattening sheep. **BMC Veterinary Research**, v. 19, n. 1, p. 32, 2 fev. 2023.

GLASSER, F.; FERLAY, A.; CHILLIARD, Y. Oilseed Lipid Supplements and Fatty Acid Composition of Cow Milk: A Meta-Analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 12, p. 4687–4703, dez. 2008.

GONZÁLEZ, F. D. *et al.* Relationship among blood indicators of lipomobilization and hepatic function during early lactation in high-yielding dairy cows. **Journal of Veterinary Science**, v. 12, n. 3, p. 251, 2011.

GRABER, M. *et al.* A field study on characteristics and diversity of gene expression in the liver of dairy cows during the transition period. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 11, p. 5200–5215, nov. 2010.

GRANJA-SALCEDO, Y. T. *et al.* Diet containing glycerine and soybean oil can reduce ruminal biohydrogenation in Nellore steers. **Animal Feed Science and Technology**, v. 225, p. 195–204, 1 mar. 2017.

GROSS, J. *et al.* Endocrine changes and liver mRNA abundance of somatotrophic axis and insulin system constituents during negative energy balance at different stages of lactation in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 7, p. 3484–3494, jul. 2011.

HAMMON, H. M. *et al.* Dexamethasone and colostrum feeding affect hepatic gluconeogenic enzymes differently in neonatal calves^{1,2,3}. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 12, p. 3095–3106, 1 dez. 2003.

HENDERSON, G. *et al.* Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 14567, 9 out. 2015.

HERMANSEN, J. E. Food intake, milk yield and live-weight gain of dairy cows given increased amounts of calcium-saponified fatty acids of palm acid oil. **Animal Science**, v. 50, n. 1, p. 11–18, 2 fev. 1990.

HORTON, J. D.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. **Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 9, p. 1125–1131, 1 maio 2002.

HU, F. *et al.* Effects of Coconut Oil and Palm Oil on Growth, Rumen Microbiota, and Fatty Acid Profile of Suckling Calves. **Microorganisms**, v. 11, n. 3, p. 655, 3 mar. 2023.

HUANG, G. *et al.* Effect of Whole or Ground Flaxseed Supplementation on Fatty Acid Profile, Fermentation, and Bacterial Composition in Rumen of Dairy Cows. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 12 nov. 2021.

HUANG, Q. *et al.* Effects of Phlorotannins from Sargassum on In Vitro Rumen Fermentation, Microbiota and Fatty Acid Profile. **Animals**, v. 13, n. 18, p. 2854, 8 set. 2023.

HUSSEIN, H. A.; THURMANN, J.-P.; STAUFENBIEL, R. 24-h variations of blood serum metabolites in high yielding dairy cows and calves. **BMC Veterinary Research**, v. 16, n. 1, p. 327, 7 dez. 2020.

IBEAGHA-AWEMU, E. M. *et al.* Transcriptome adaptation of the bovine mammary gland to diets rich in unsaturated fatty acids shows greater impact of linseed oil over safflower oil on gene expression and metabolic pathways. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, 9 fev. 2016.

_____. Transcriptome analysis of long non-coding RNA in the bovine mammary gland following dietary supplementation with linseed oil and safflower oil. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, 15 nov. 2018.

IMHASLY, S. *et al.* Blood plasma lipidome profile of dairy cows during the transition period. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, p. 252, 7 dez. 2015.

JAMI, E.; WHITE, B. A.; MIZRAHI, I. Potential Role of the Bovine Rumen Microbiome in Modulating Milk Composition and Feed Efficiency. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e85423, 22 jan. 2014.

JENKINS, T. C. *et al.* BOARD-INVITED REVIEW: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem¹. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 2, p. 397–412, 1 fev. 2008.

JENKINS, T. C.; HARVATINE, K. J. Lipid Feeding and Milk Fat Depression. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 30, n. 3, p. 623–642, nov. 2014.

JL, P. *et al.* Overfeeding energy upregulates peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ -controlled adipogenic and lipolytic gene networks but does not affect proinflammatory markers in visceral and subcutaneous adipose depots of Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 6, p. 3431–3440, 2014.

JOST, L. *Entropy and diversity*. **Oikos**, v. 113, n. 2, p. 363–375, 18 maio 2006.

JUDY, J. V. *et al.* Reducing methane production with corn oil and calcium sulfate: Responses on whole-animal energy and nitrogen balance in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 3, p. 2054–2067, 1 mar. 2019.

- JUMP, D. B.; CLARKE, S. D. Regulation of gene expression by dietary fat. **Annual Review of Nutrition**, v. 19, n. 1, p. 63–90, jul. 1999.
- KAEPILA, C.; SOMMART, K.; MITSUMORI, M. Dietary fat sources affect feed intake, digestibility, rumen microbial populations, energy partition and methane emissions in different beef cattle genotypes. **Animal**, v. 12, n. 12, p. 2529–2538, 2018.
- KERSTEN, S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. **EMBO reports**, v. 2, n. 4, p. 282–286, abr. 2001.
- KESSLER, E. C. *et al.* Cholesterol metabolism, transport, and hepatic regulation in dairy cows during transition and early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 9, p. 5481–5490, 2014.
- KHURANA, R. *et al.* Effect of a garlic and citrus extract supplement on performance, rumen fermentation, methane production, and rumen microbiome of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 106, n. 7, p. 4608–4621, jul. 2023.
- KLEPPE, B. B. *et al.* Triglyceride Accumulation and Very Low Density Lipoprotein Secretion by Rat and Goat Hepatocytes In Vitro. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 7, p. 1813–1822, 1988.
- KOIKE, S.; KOBAYASHI, Y. Fibrolytic Rumen Bacteria: Their Ecology and Functions. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 22, n. 1, p. 131–138, 6 jan. 2009.
- KOU, X. *et al.* Exploring the Effect of Gastrointestinal Prevotella on Growth Performance Traits in Livestock Animals. **Animals**, v. 14, n. 13, p. 1965, 2 jul. 2024.
- KRUSKAL, W. H.; WALLIS, W. A. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. **Journal of the American Statistical Association**, v. 47, n. 260, p. 583, dez. 1952.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, ago. 1970.
- LAGUNA, J. G. *et al.* Expression of hepatic genes related to energy metabolism during the transition period of Holstein and F1 Holstein-Gir cows. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 9861–9870, 1 dez. 2017.
- LEE, H. J. *et al.* Comparative Survey of Rumen Microbial Communities and Metabolites across One Caprine and Three Bovine Groups, Using Bar-Coded Pyrosequencing and ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 17, p. 5983–5993, set. 2012.
- LEROUX, C. *et al.* Bovine Mammary Nutrigenomics and Changes in the Milk Composition due to Rapeseed or Sunflower Oil Supplementation of High-Forage or High-Concentrate Diets. **Lifestyle Genomics**, v. 9, n. 2–4, p. 65–82, 1 nov. 2016.

LEVENE, H. Robust Tests for the equality of variance. *Em*: OLKIN, I. (Ed.). . **Contributions to Probability and Statistics**. Palo Alto, California: Stanford University Press, 1960. p. 278–292.

LI, Y. *et al.* Replacing soybean meal with high-oil pumpkin seed cake in the diet of lactating Holstein dairy cows modulated rumen bacteria and milk fatty acid profile. **Journal of Dairy Science**, v. 106, n. 3, p. 1803–1814, mar. 2023.

LILLIS, L. *et al.* The effect of dietary concentrate and soya oil inclusion on microbial diversity in the rumen of cattle. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 6, p. 1426–1435, dez. 2011.

LIN, L. *et al.* The gastrointestinal microbiome in dairy cattle is constrained by the deterministic driver of the region and the modified effect of diet. **Microbiome**, v. 11, n. 1, p. 10, 20 jan. 2023.

LIU, Y.-X. *et al.* A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data. **Protein & Cell**, v. 12, n. 5, p. 315–330, 11 maio 2021.

LOCK, A. L.; SOUZA, J. **Impact of individual and combinations of supplemental fatty acids on 584 dairy cow performance and metabolism** Proceedings of the Four-state dairy nutrition and management 585 conference, Dubuque, Iowa. **Anais...** Dubuque, Iowa: 2018

LOOR, J. J.; ELOLIMY, A. A.; MCCANN, J. C. Dietary impacts on rumen microbiota in beef and dairy production. **Animal Frontiers**, v. 6, n. 3, p. 22–29, 1 jul. 2016.

LOPREIATO, V. *et al.* Role of nutraceuticals during the transition period of dairy cows: a review. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 96, 27 dez. 2020.

LOURENCO, J. M. *et al.* Comparison of the ruminal and fecal microbiotas in beef calves supplemented or not with concentrate. **PLOS ONE**, v. 15, n. 4, p. e0231533, 13 abr. 2020.

MAIA, M. R. *et al.* Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 52, 18 dez. 2010.

MALMUTHUGE, N.; GUAN, L. L. Understanding the gut microbiome of dairy calves: Opportunities to improve early-life gut health. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 7, p. 5996–6005, jul. 2017.

MARTIN, C.; MORGAVI, D. P.; DOREAU, M. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. **Animal**, v. 4, n. 3, p. 351–365, 2010.

MASSEY, F. J. The Kolmogorov-Smirnov Test for Goodness of Fit. **Journal of the American Statistical Association**, v. 46, n. 253, p. 68, mar. 1951.

MICEK, P. *et al.* An energy-protein feed additive containing different sources of fat improves feed intake and milk performance of dairy cows in mid-lactation. **Journal of Dairy Research**, v. 86, n. 1, p. 55–62, 7 fev. 2019.

- MOBUCHON, L. *et al.* Sunflower oil supplementation affects the expression of miR-20a-5p and miR-142-5p in the lactating bovine mammary gland. **PLoS ONE**, v. 12, n. 12, 1 dez. 2017.
- MONTAGNER, P. *et al.* Relationship between pre-partum body condition score changes, acute phase proteins and energy metabolism markers during the peripartum period in dairy cows. **Italian Journal of Animal Science**, v. 16, n. 2, p. 329–336, 3 abr. 2017.
- MORGAVI, D. P. *et al.* Rumen microbial (meta)genomics and its application to ruminant production. **Animal**, v. 7, p. 184–201, 2013.
- MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **The Veterinary Journal**, v. 168, n. 1, p. 28–40, jul. 2004.
- NAVGIRE, G. S. *et al.* Analysis and Interpretation of metagenomics data: an approach. **Biological Procedures Online**, v. 24, n. 1, p. 18, 19 nov. 2022.
- NESS, G. C.; ZHAO, Z.; WIGGINS, L. Insulin and glucagon modulate hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase activity by affecting immunoreactive protein levels. **The Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 46, p. 29168–72, 18 nov. 1994.
- NIWA, M. V. G. *et al.* Ruminant responses, digestibility, and blood parameters of beef cattle fed diets with different oilseeds. **Tropical Animal Health and Production**, v. 55, n. 4, p. 254, 1 ago. 2023.
- Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. Washington, D.C.: National Academies Press, 2001.
- OSORIO, J. S. *et al.* **Application of nutrigenomics in small ruminants: Lactation, growth, and beyond** **Small Ruminant Research** Elsevier B.V., , 1 set. 2017.
- PAILLARD, D. *et al.* Relation between phylogenetic position, lipid metabolism and butyrate production by different *Butyrivibrio*-like bacteria from the rumen. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 91, n. 4, p. 417–422, 1 maio 2007.
- PETERSEN, H. H.; NIELSEN, J. P.; HEEGAARD, P. M. H. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary Research**, v. 35, n. 2, p. 163–187, mar. 2004.
- PRIETO-MANRIQUE, E. *et al.* The effect of sunflower seed oil supplementation on the milk fatty acid contents of cows fed leucaena in an intensive silvopastoral system. **Animal Feed Science and Technology**, v. 239, p. 55–65, 1 maio 2018.
- PULLEN, D. L.; LIESMAN, J. S.; EMERY, R. S. A species comparison of liver slice synthesis and secretion of triacylglycerol from nonesterified fatty acids in media. **Journal of Animal Science**, v. 68, n. 5, p. 1395, 1990.
- QU, J. *et al.* Apolipoprotein A-IV: A Multifunctional Protein Involved in Protection against Atherosclerosis and Diabetes. **Cells**, v. 8, n. 4, p. 319, 5 abr. 2019.

RAYMON, A. *et al.* Enhancement and comparison of nano-ester insulating fluids. **IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation**, v. 23, n. 2, p. 892–900, 1 abr. 2016.

RIBEIRO, C. G. S. *et al.* Desempenho produtivo e perfil de ácidos graxos do leite de vacas que receberam níveis crescentes de óleo de girassol em dietas à base de capim-elefante. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 5, p. 1513–1521, out. 2014.

SALLES, MÁRCIA S.V. *et al.* Inclusion of sunflower oil in the bovine diet improves milk nutritional profile. **Nutrients**, v. 11, n. 2, 1 fev. 2019.

_____. Inclusion of Sunflower Oil in the Bovine Diet Improves Milk Nutritional Profile. **Nutrients**, v. 11, n. 2, p. 481, 25 fev. 2019.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 3. ed. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil: Fundação de Estudo e Pesquisa Veterinária e Zootecnia, 2010.

SATO, Y. *et al.* Taxonomic and functional characterization of the rumen microbiome of Japanese Black cattle revealed by 16S rRNA gene amplicon and metagenome shotgun sequencing. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 97, n. 12, 4 dez. 2021.

SCHMIDT, S. *et al.* Regulation of lipid metabolism-related gene expression in whole blood cells of normo- and dyslipidemic men after fish oil supplementation. **Lipids in Health and Disease**, v. 11, n. 1, p. 172, 14 dez. 2012.

SCHUMACHER, L. L. *et al.* Análisis de impedancia bioeléctrica (AIB) en la producción animal. Revisión. **Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias**, v. 12, n. 2, p. 553–572, 15 set. 2021.

SCICUTELLA, F. *et al.* Rumen microbial community and milk quality in Holstein lactating cows fed olive oil pomace as part in a sustainable feeding strategy. **animal**, v. 17, n. 6, p. 100815, jun. 2023.

SHINGFIELD, K. J.; BONNET, M.; SCOLLAN, N. D. Recent developments in altering the fatty acid composition of ruminant-derived foods. **Animal**, v. 7, p. 132–162, 2013.

SHINKAI, T. *et al.* Characteristics of rumen microbiota and Prevotella isolates found in high propionate and low methane-producing dairy cows. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, 3 jun. 2024.

SILVA, S. DA *et al.* Evaluation of a fibrate, specific stimulant of PPAR α , as a therapeutic alternative to the treatment of clinical ovine pregnancy toxemia. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 39, n. 5, p. 497–503, 2016.

SILVERSTEIN, R. L.; FEBBRAIO, M. CD36, a Scavenger Receptor Involved in Immunity, Metabolism, Angiogenesis, and Behavior. **Science Signaling**, v. 2, n. 72, 26 maio 2009.

SINGH, S. *et al.* Buffalo liver transcriptome analysis suggests immune tolerance as its key adaptive mechanism during early postpartum negative energy balance. **Functional and Integrative Genomics**, v. 19, n. 5, p. 759–773, 1 set. 2019.

SOUZA, J. DE; LOCK, A. L. Effects of timing of palmitic acid supplementation on production responses of early-lactation dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 1, p. 260–273, 1 jan. 2019.

SUN, Y.; ALLEN, M. S.; LOCK, A. L. Culture pH interacts with corn oil concentration to affect biohydrogenation of unsaturated fatty acids and disappearance of neutral detergent fiber in batch culture. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 11, p. 9870–9882, 1 nov. 2019.

TATUM, J. D. *et al.* Influence of Diet on Growth Rate and Carcass Composition of Steers Differing in Frame Size and Muscle Thickness. **Journal of Animal Science**, v. 66, n. 8, p. 1942, 1988.

THACHARODI, A. *et al.* The ruminant gut microbiome vs enteric methane emission: The essential microbes may help to mitigate the global methane crisis. **Environmental Research**, v. 261, p. 119661, nov. 2024.

THRALL, M. A. *et al.* **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. 2nd. ed. Ames, Iowa, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2012.

TORRES MANNO, M. A. *et al.* Metagenomic approach to infer rumen microbiome derived traits of cattle. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 9, p. 250, 13 set. 2023.

VADROŇOVÁ, M. *et al.* Insights into Effects of Combined Capric and Lauric Acid on Rumen Bacterial Composition. **Microorganisms**, v. 12, n. 6, p. 1085, 27 maio 2024.

VITURRO, E. *et al.* Cholesterol synthesis in the lactating cow: Induced expression of candidate genes. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 115, n. 1–2, p. 62–67, maio 2009.

WANG, L. *et al.* Metagenomic analyses of microbial and carbohydrate-active enzymes in the rumen of holstein cows fed different forage-to-concentrate ratios. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. MAR, 2019.

WELD, K. A.; ERB, S. J.; WHITE, H. M. Short communication: Effect of manipulating fatty acid profile on gluconeogenic gene expression in bovine primary hepatocytes. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 8, p. 7576–7582, 1 ago. 2019.

WINDERS, T. M. *et al.* Feeding hempseed cake alters the bovine gut, respiratory and reproductive microbiota. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 8121, 19 maio 2023.

XIE, H. *et al.* Effect of Tea Seed Oil on In Vitro Rumen Fermentation, Nutrient Degradability, and Microbial Profile in Water Buffalo. **Microorganisms**, v. 11, n. 8, p. 1981, 1 ago. 2023.

YOU, W. *et al.* Capsaicin Modulates Ruminal Fermentation and Bacterial Communities in Beef Cattle with High-Grain Diet-Induced Subacute Ruminal Acidosis. **Microorganisms**, v. 13, n. 1, p. 84, 4 jan. 2025.

YOUSEF, M. A. *et al.* Feeding Corn Oil in a Nanoemulsified Form Alters the Unsaturated Fatty Acids in the Milk of Zaraibi Dairy Goats. **Animals**, v. 12, n. 19, p. 2559, 25 set. 2022.

YU, Y. *et al.* Effects of dietary energy levels on microorganisms and short-chain fatty acids of rumen and tight junction proteins in Honghe Yellow cattle. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, 2 abr. 2024.

ZENED, A. *et al.* Starch plus sunflower oil addition to the diet of dry dairy cows results in a trans-11 to trans-10 shift of biohydrogenation. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 1, p. 451–459, jan. 2013.

ZHOU, X. *et al.* Short communication: The pharmacological peroxisome proliferator-activated receptor α agonist WY-14,643 increases expression of novel organic cation transporter 2 and carnitine uptake in bovine kidney cells. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 1, p. 345–349, jan. 2014.

ZHOU, X. *et al.* Microbiome and fermentation parameters in the rumen of dairy buffalo in response to ingestion associated with a diet supplemented with cysteamine and hemp seed oil. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 106, n. 3, p. 471–484, 15 maio 2022.

ZHOU, Y.; LUO, G. Apolipoproteins, as the carrier proteins for lipids, are involved in the development of breast cancer. **Clinical and Translational Oncology**, v. 22, n. 11, p. 1952–1962, 18 nov. 2020.

ZHOU, Y.; QI, M.; YANG, M. Current Status and Future Perspectives of Lactate Dehydrogenase Detection and Medical Implications: A Review. **Biosensors**, v. 12, n. 12, p. 1145, 7 dez. 2022.

ZHU, Y. *et al.* Expression patterns of hepatic genes involved in lipid metabolism in cows with subclinical or clinical ketosis. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 2, p. 1725–1735, 1 fev. 2019.

9. Anexo: artigo completo submetido em 2024 ao periódico *Livestock Science*

Livestock Science

Dietary oil supplementation modulates PPAR- α target genes expression, potentially preventing hepatic fat accumulation in dairy cattle

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Paper
Section/Category:	Ruminant Nutrition
Keywords:	Dairy cattle; Dietary oil supplementation; Liver steatosis; Livestock nutrigenomic; Negative energy balance; PPAR- α target genes
Corresponding Author:	Andréa Mara Macedo, Ph.D Universidade Federal de Minas Gerais Instituto de Ciencias Biologicas Belo Horizonte, Minas Gerais BRAZIL
First Author:	Nélio Cunha Gonçalves, MS
Order of Authors:	Nélio Cunha Gonçalves, MS
	Juliana Guimarães Laguna, PhD
	Guilherme Rocha Moreira, PhD
	Tiago Facury Moreira, PhD
	Rodrigo Melo Meneses, PhD
	Paulo Henrique Puphal Küster, DVM
	Tales Fernando da Silva, PhD
	Eloísa de Oliveira Simões Saliba, PhD
	Geraldo Sérgio Senra Carneiro Barbosa, PhD
	Clarindo Inácio de Aparecida Queiroz, PhD
	Gabriela Ponath Peruzzo, BVM
	Vasco Azevedo, PhD
	Andréa Mara Macedo, Ph.D
Abstract:	In vitro studies have shown that specific fatty acids added to culture media modulate the bovine peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR- α), a crucial regulator of hepatic lipid metabolism. These studies provide a potential strategy for preventing hepatic steatosis in dairy cows experiencing negative energy balance (NEB). However, there is a lack of in vivo experiments demonstrating the effective modulation of this receptor in these animals through the supplementation of vegetable oils as a source of fatty acids. Herein, we investigated the expression of five PPAR- α target genes and the receptor itself in heifers supplemented with three different commercial oils. After 15 days of supplementation, we observed an increase in the expression of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR) gene associated with increasing hepatic clearance of acetyl-CoA and triacylglycerol (TAG) exportation, particularly with cottonseed oil supplementation. These findings were corroborated by an increase in cholesterol concentration in the serum of animals supplemented with all three vegetable oils. Additionally, supplementation with sunflower and soyabean oils reduced the expression of the fatty acid translocase (CD36) gene involved in the internalization of fatty acids by hepatocytes, potentially preventing excessive accumulation of liver fat. Cottonseed also reduced dry matter intake (DMI) without compromising weight gain. Importantly, the inclusion of these oils did not negatively affect the clinical biochemical parameters investigated, nor did it result in liver damage, indicating stable hepatic function and health. Our findings provide valuable insights into the use of oils in dairy cattle nutrition, extending their conventional role of increasing energy density in feed.
Suggested Reviewers:	Bertram Brenig, PhD

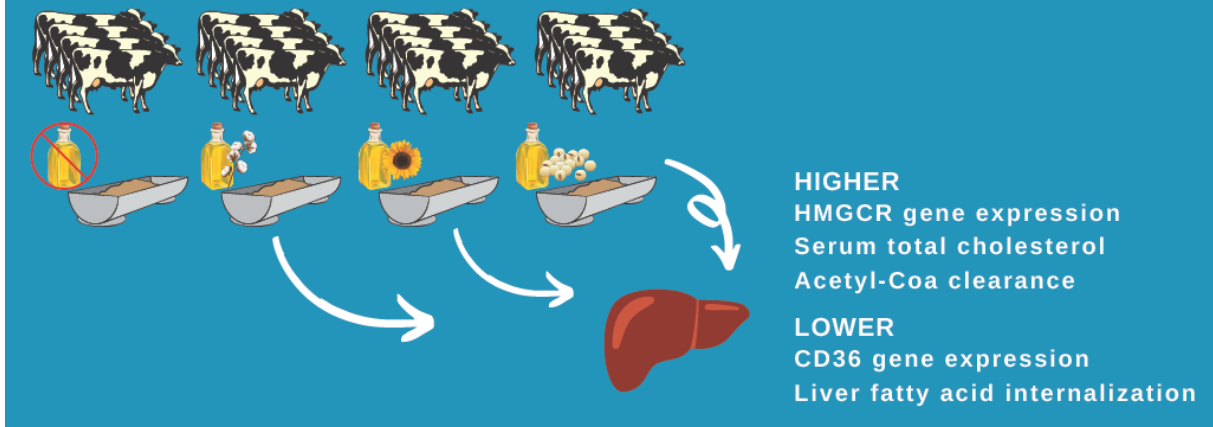
	Full Professor, Georg-August-Universität Göttingen bbrenig@gwdg.de Dr. Bertram is the director of the Institute of Veterinary Medicine at the prestigious University of Göttingen. He specializes in molecular aspects associated with the health and well-being of livestock.
	Alessandro de Sá Guimarães, PhD Senior Researcher, Embrapa Dairy Cattle alessandro.guimaraes@embrapa.br Dr. Guimarães is a senior researcher at the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa Gado de Leite). He specializes in genetic aspects associated with the health, behavior, and well-being of dairy cattle.

Highlights

Highlights

- Dietary vegetable oil can modulate the expression of liver PPAR- α target genes.
- Oil supplementation upregulates liver HMGCR gene and increases serum TC levels.
- Dietary oil can enhance acetyl-CoA clearance and prevent liver TAG accumulation.
- Cottonseed oil reduces DMI while maintaining the weight gain of dairy heifers.
- Vegetable oil supplementation has no negative impact on bovine health.

Graphical Abstract



1 Full Title

2 Dietary oil supplementation modulates PPAR- α target genes expression, potentially
3 preventing hepatic fat accumulation in dairy cattle

4

5 Author names and affiliations

6 Nélcio Cunha Gonçalves^a, Juliana Guimarães Laguna^b, Guilherme Rocha Moreira^c,
7 Tiago Facury Moreira^d, Rodrigo Melo Meneses^d, Paulo Henrique Puphal Küster^d, Tales
8 Fernando da Silva^b, Eloísa de Oliveira Simões Saliba^e, Geraldo Sérgio Senra Carneiro
9 Barbosa^f, Clarindo Inácio de Aparecida Queiroz^f, Gabriela Ponath Peruzzo^g, Vasco
10 Azevedo^h, and Andréa Mara Macedo^{a,*}

12 ^aBiochemical Genetics Laboratory, Department of Biochemistry and Immunology,
13 Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte,
14 MG, 31270-901, Brazil

15 ^bl'Institut Agro Rennes-Angers, National Agricultural Research Institute, Rennes,
16 Bretagne, 35042, France

17 ^cDepartment of Statistics and Informatics, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
18 Recife, PE, 52171-900, Brazil

19 ^dDepartment of Clinic and Surgery, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo
20 Horizonte, MG, 31270-901, Brazil

21 ^eDepartment of Animal Science, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo
22 Horizonte, MG, 31270-901, Brazil

23 ^fDairy Cattle Livestock Sector, Universidade Federal de Viçosa, Florestal, MG, 35690-
24 000, Brazil

25 ^eDepartment of Animal Science, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES,

26 29500-000, Brazil

27 ^hCellular and Molecular Genetics Laboratory, Department of Genetics, Ecology, and

28 Evolution, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo

29 Horizonte, MG, 31270-901, Brazil

30

31 *Corresponding author.

32 *E-mail address:* andrea.mara.macedo@gmail.com; andrea@icb.ufmg.br (AM Macedo)

33 *Full postal address:* Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências

34 Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, 6627, Belo

35 Horizonte, MG, Brazil. CEP 31.270-901

Abstract

In vitro studies have shown that specific fatty acids added to culture media modulate the bovine peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR- α), a crucial regulator of hepatic lipid metabolism. These studies provide a potential strategy for preventing hepatic steatosis in dairy cows experiencing negative energy balance (NEB). However, there is a lack of *in vivo* experiments demonstrating the effective modulation of this receptor in these animals through the supplementation of vegetable oils as a source of fatty acids. Herein, we investigated the expression of five PPAR- α target genes and the receptor itself in heifers supplemented with three different commercial oils. After 15 days of supplementation, we observed an increase in the expression of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR) gene associated with increasing hepatic clearance of acetyl-CoA and triacylglycerol (TAG) exportation, particularly with cottonseed oil supplementation. These findings were corroborated by an increase in cholesterol concentration in the serum of animals supplemented with all three vegetable oils. Additionally, supplementation with sunflower and soyabean oils reduced the expression of the fatty acid translocase (CD36) gene involved in the internalization of fatty acids by hepatocytes, potentially preventing excessive accumulation of liver fat. Cottonseed also reduced dry matter intake (DMI) without compromising weight gain. Importantly, the inclusion of these oils did not negatively affect the clinical biochemical parameters investigated, nor did it result in liver damage, indicating stable hepatic function and health. Our findings provide valuable insights into the use of oils in dairy cattle nutrition, extending their conventional role of increasing energy density in feed.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61 **Keywords**
62 Dairy cattle, Dietary oil supplementation, Liver steatosis, Livestock nutrigenomic,
63 Negative energy balance, PPAR- α target genes
64
65

1. Introduction

During the immediate postpartum period, cows often experience negative energy balance (NEB) due to increased energy requirements for lactation combined with reduced feed intake (Singh et al., 2019). This imbalance leads to metabolic consequences, including elevated serum levels of non-esterified fatty acids (NEFAs), as cows mobilize adipose tissue to meet the energy demands for milk production. Consequently, cows may develop ketosis and hepatic steatosis due to inadequate adaptation of hepatic metabolism to lipids and carbohydrates (Laguna et al., 2017).

To mitigate NEB, the inclusion of supplemental oils in the diet of dairy cows has been a prevalent practice to increase the energy density of feed and sustain milk production. However, different lipid sources yield different metabolic and productive responses based on their fatty acid profile (Lock and Souza, 2018). Consequently, recent research has focused on examining the impacts of different vegetable oils on the nutritional profile of milk (Antonacci et al., 2017; Aprianita et al., 2014; Leroux et al., 2016; Prieto-Manrique et al., 2018; Ribeiro et al., 2014; Salles et al., 2019), mammary gland metabolism (Ibeagha-Awemu et al., 2018, 2016; Mobuchon et al., 2017), and ruminal parameters, including methane production (Granja-Salcedo et al., 2017; Judy et al., 2019; Sun et al., 2019; Zened et al., 2013).

While the physiopathological effects of NEB and the supplementation of vegetable oil in cows are well-known, the underlying molecular mechanisms are not fully understood (Ji et al., 2014). A comprehensive understanding of the metabolic adaptations and gene expression related to energy metabolism, particularly in the liver, is essential for devising more effective intervention strategies to minimize the adverse effects of NEB in dairy cattle.

Previous studies have emphasized the influence of genetic factors (Laguna et al., 2017) and the physiological state (Angeli et al., 2019; Graber et al., 2010; Laguna et al., 2017; Singh et al., 2019; Zhu et al., 2019) on the expression of genes related to energy metabolism in cattle. These studies suggest that variations in gene expression associated with energy metabolism play an essential role in liver function, especially during the transition period. Some transcription factors, including the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha - PPAR- α , have been identified as regulators of this response (Ebrahimi et al., 2015).

PPARs are activated by fatty acids and regulate the expression of various genes involved in lipid metabolism pathways (Atrice Desvergne et al., 2006). Among PPAR isoforms, PPAR- α activation plays a central role in promoting the oxidation of long-chain fatty acids (LCFA), particularly in the liver, in both non-ruminants and ruminant animals (Bionaz et al., 2012).

Studies using cell cultures of bovine kidneys (Bionaz et al., 2012; Zhou et al., 2014) or primary hepatocytes obtained from newborn calves (Weld et al., 2019), as well as *in vivo* studies with small ruminants (Da Silva et al., 2016; Ebrahimi et al., 2015), and a single study with dairy cows (Akbar et al., 2013), have provided evidence of the agonistic effect of different molecules, specially LCFA, on PPAR- α and its impact on the modulation of gene expression associated with lipid metabolism. These studies highlight the potential role of PPAR- α in modulating hepatic energy metabolism and suggest it as a possible target for preventing metabolic disorders associated with lipid metabolism (Bragt and Popeijus, 2008). However, to date, there have been no *in vivo* studies involving the role of PPAR- α in cattle supplemented with different commercial vegetable oils.

Therefore, the present study aims to evaluate the *in vivo* effects of the dietary inclusion of different vegetable oils on the expression of the PPAR- α encoding gene and five of its target genes in the liver of dairy heifers. Additionally, the study examines the effects of diet on food intake, weight gain, and clinical parameters.

116

2. Material and Methods

2.1. Ethical approval

The study protocol was approved by the Animal Research Ethics Committee (CEUA) of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), with the approval number 294/2019. All animal experiments complied with the ARRIVE guidelines and were carried out following the Brazilian National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986, and associated guidelines, as well as EU Directive 2010/63/EU for animal experiments.

125

2.2. Location

The animals were housed, fed, and sampled at the Dairy Cattle Livestock Sector, Universidade Federal de Viçosa, located in Florestal (MG), Brazil. Laboratory analyses were conducted at four laboratories in the Universidade Federal de Minas Gerais, situated in Belo Horizonte (MG), Brazil. These laboratories comprise the Biochemical Genetics Laboratory (LGB) and the Laboratory of Cellular and Molecular Genetics (LGCM), both at the Institute of Biological Sciences (ICB), as well as the Laboratory of Animal Clinical Pathology and the Laboratory of Animal Nutrition at the Veterinary School.

135

2.3. Animals, facilities, and diet

137 Sixteen crossbred Holstein-Zebu heifers were used. They were all weaned at 60
 138 days of age. At the beginning of the experimental phase, the heifers had an average
 139 weight of 250.67 ± 26.44 kg and an average age of 7.3 ± 2.1 months. The animals were
 140 housed in pairs in pens with an area of 44.2 square meters each. The dimensions of the
 141 pens were as follows: the covered area measured 6.0m in length, 3.3m in width, and
 142 4.0m in height at the highest point, while the solarium measured 7.4m in length and
 143 3.3m in width. Each stall provided the animals with free access to diets and water, both
 144 of them offered *ad libitum*.

145 The basal diet consisted of maize silage, ground corn, soyabean meal, and a
 146 mineral and vitamin premix (NC Bovilac 50, Master Alimentos™). The nutritional
 147 composition of the diet ingredients is shown in Table 1.

148

149 2.4. Experimental design and statistical analyses

150 A completely randomized design with a split-plot arrangement was used. The
 151 main plots comprised four diets, while the sub-plots represented the three sampling
 152 times (0, +15, and +30 d). Each treatment group consisted of four animals, with each
 153 animal serving as the experimental unit for all parameters analyzed, except for Dry
 154 Matter Intake (DMI). For DMI the pen was defined as the experimental unit, housing
 155 two animals each.

156 Before commencing the experimental phase, a 15-day adaptation period was
 157 conducted to acclimatize all sixteen heifers to the facilities and the basal diet, which did
 158 not include any oil (-15 to 0 d). Subsequently, the animals were randomly assigned to
 159 one of four groups by drawing lots: (i) control, (ii) cottonseed oil, (iii) sunflower oil,
 160 and (iv) soyabean oil. The feeding regimen with the respective oil inclusion lasted from
 161 day 0 to day +30 (0 to +30 d). Oils were incorporated at a rate of 4% dry matter, and the

162 diets were formulated to be isoenergetic and isoproteic, following the standards of the
 163 National Research Council (NRC, 2001) using the Spartan Ration Evaluator/Balancer
 164 for Dairy Cattle™ software, from Michigan State University.

165 The number of repetitions per treatment was calculated following the approach
 166 outlined by Sampaio (2010), considering the confidence interval of the mean based on
 167 the response with the highest coefficient of variation observed in previous studies. In
 168 this context, coefficients of variations from the studies by Laguna et al. (2017) were
 169 used as a reference for the present study.

170 Statistical analysis was conducted to evaluate the normality of the data and the
 171 homoscedasticity of the variances using Komogorov-Smirnov's test (Massey, 1951) and
 172 Levene's test (Levene, 1960)., respectively, for each of the analyzed responses. Once
 173 the assumptions for parametric statistics were met, precisely normal distribution and
 174 homoscedastic variances, the means were compared using Fisher's F test with Tukey's
 175 post-test (Sampaio, 2010) at a significance level of 5%.

176 In cases where the assumptions for parametric statistics were not satisfied,
 177 nonparametric tests were used, maintaining the same significance level of 5%. The
 178 Friedman test (Friedman, 1937) was applied for dependent variables, specifically
 179 comparing sampling times within each diet. The Kruskal-Wallis test (Kruskal and
 180 Wallis, 1952) was employed for independent variables, comparing different diets within
 181 each period. Dunn's post-test (Dunn, 1964) was applied to determine specific group
 182 differences if significant differences were found.

183 Pearson's correlation analysis was also performed according to Sampaio (2010).
 184 All statistical calculations were performed using the Real Statistics™ supplement for
 185 Excel™ - Microsoft 365™, version 2206 (Zaiontz, 2020).

186

187

188 *2.5. Food intake and weight gain measurements*

189 Food intake was determined daily (-7 to +30 d), by weighing the food offered
 190 and leftovers. Composite samples were collected from both offered food and leftover
 191 feed, and their dry matter (DM) content was determined following the recommendations
 192 of AOAC International (Association of Official Analytical Chemists, 2012).

193 Animal weight gain for each treatment was determined by weighing the heifers
 194 using a containment trunk / electronic scale (Coimma™, conventional model) at two
 195 time points: 0+d and +30 d. DMI as a percentage of body weight was obtained by
 196 dividing the DMI of the pen by the combined body weight of the two animals housed
 197 therein.

198

199 *2.6. Liver biopsies and blood sampling*

200 Liver biopsies and blood samples were collected from each animal on three
 201 occasions: +0, +15, and +30 d. The procedure for obtaining liver biopsies followed the
 202 method outlined by Angeli et al. (2019) and was conducted in compliance with stringent
 203 animal welfare and hygiene standards. After initial cleaning and antiseptic preparation,
 204 anesthesia was administered via subcutaneous infiltration of 5mL of 2% lidocaine
 205 hydrochloride solution (Dorfin™, Ceva™, lot 001/19). A 1 cm incision was made in the
 206 11th intercostal space on the right side of the animal, guided by ultrasound scan using a
 207 Mindray™ DP-2200Vet device to ensure precise positioning. Approximately 200 mg of
 208 liver tissue was collected through successive entries of a semi-automatic soft tissue
 209 biopsy cannula (14G x 15 cm, Biomedical Srl™). Liver tissue samples were then
 210 distributed into microtubes containing 50 mg of tissue and 500 µL of RNA stabilizer
 211 solution (RNAlater™, Ambion™) and stored at -80°C until analysis.

212 Blood samples were collected for clinical evaluation and metabolic profiling.
 213 Following cleaning and aseptic preparation, approximately 10 mL of blood was drawn
 214 from the coccygeal vein into three vacuum blood collection tubes containing sodium
 215 fluoride, EDTA, or without anticoagulant. Subsequently, tubes with sodium fluoride
 216 and those without anticoagulants were centrifuged for 15 minutes at 2,000 g. Serum
 217 samples were then transferred to microtubes and stored at -20°C until biochemical
 218 analyses.

219

220 2.7. Genes selected for analysis of differential expression in liver tissue

221 In this study, we evaluated the expression of five PPAR- α target genes
 222 associated with lipid metabolism. These genes were chosen from a pool of eight
 223 previously identified PPAR- α target genes, as reported in previous *in vitro* studies
 224 conducted with bovine tissues (Bionaz et al., 2012; Kessler et al., 2014; Weld et al.,
 225 2019; Zhou et al., 2014). Additionally, we assessed the expression of the gene encoding
 226 the PPAR- α itself along with three housekeeping genes: β -actin (ACTB),
 227 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), and ribosomal protein S9
 228 (RPS9). Table 2 provides a detailed list of the genes analyzed and their descriptions,
 229 locations, and functions of the proteins encoded.

230 GenBank accession numbers (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), primer
 231 sequences, literature source, and product size for the bovine species (*Bos taurus*) are
 232 presented in Table 3. For the CPT1A gene, primers were designed using the Primer-
 233 Blast tool available on the NCBI website ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)
 234 [blast/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)). The primers were provided by Sintese Biotecnologia™, an exclusive distributor
 235 of Integrated DNA Technologies (IDT™) in Brazil.

236

237 *2.8. Quantitative real-time PCR*

238 Liver tissue samples preserved at -80°C in RNeasy Lysis Buffer™ were transferred to

239 microtubes containing TRIzol™ reagent and steel beads and were homogenized in a

240 Precellys 24 Tissue Homogenizer™ being immediately frozen in liquid nitrogen right

241 after homogenization. RNA extraction was then carried out following the TRIzol™

242 protocol, followed by purification using the RNeasy Mini Kit™ and DNase I

243 (Qiagen™) digestion according to the manufacturer's instructions. The quality and

244 quantity of the isolated RNA were evaluated using a NanoDrop™ Spectrometer at

245 260/280 nm and confirmed by denaturing agarose gel electrophoresis with ethidium

246 bromide staining.

247 The synthesis of the complementary DNA (cDNA) from RNA samples obtained

248 from bovine liver biopsies was performed using the commercial High-Capacity cDNA

249 Reverse Transcription Kit™ (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific™),

250 according to the manufacturer's instructions. Real-time PCR (RT-qPCR) reactions were

251 carried out using the Rotor-Gene Q equipment (serial number R0716146, Qiagen,

252 Venlo, Netherlands). We used 200 ng of cDNA for RT-qPCR analyses and a primer

253 mix with a final concentration of 5 μM . The reactions were performed using the

254 PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher

255 Scientific™) diluted in ultrapure water for molecular biology (Phoneutria™), according

256 to the manufacturer's instructions. The amplifications were conducted using the

257 following time-temperature parameters: a denaturation step at 95°C for 20 seconds, an

258 annealing step at 60°C for 20 seconds, and an extension step at 72°C for 20 seconds. A

259 total of 40 amplification cycles were conducted. Temperature variation was applied

260 from 55°C to 95°C , with an increase of 1°C per minute to determine the dissociation

261 curve (melting).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

262 The cycle threshold (CT) values were obtained in duplicate for the three
263 housekeeping genes (ATCB, GAPDH, and RPS9), the PPARA gene, and the five
264 candidate genes under study (ANGPTL4, CD36, CPT1A, HMGCR, and OCTN2).
265 These measurements were conducted for the four diets and for the three sampling times.
266 Δ CT values were calculated to determine the relative abundance of specific mRNA of a
267 gene under study, enabling comparisons across diets and sampling times.

268

269 2.9. Serological analysis

270 Colorimetric assays were used to determine serum concentrations of five lipid
271 metabolism-related analytes, namely total cholesterol (TC), high-density lipoproteins
272 (HDL), triacylglycerol (TAG), β -hydroxybutyrate (BHB), and non-esterified fatty acids
273 (NEFA).

274 Before analyses, the serum samples of the heifers were heated in a dry bath
275 device (model K80-S02, Kasvi™) until they reached the temperature of 37°C. The
276 analyses were conducted using the Cobas Mira Plus™ biochemical analyzer (Roche
277 Diagnostic Systems™, Switzerland) in conjunction with commercial enzymatic
278 colorimetric analysis kits from BioTécnica™. The device was manually programmed
279 using the Autocal H™ calibrator (BioTécnica™) to ensure accurate measurements and
280 validated with Quantinorm™ control serum (BioTécnica™).

281 To assess the health condition of the heifers, additional serum biochemistry
282 analyses were conducted through the same colorimetric methodology described earlier.
283 The serum concentrations of three hepato-specific enzymes - aspartate aminotransferase
284 (AST), gamma-glutamyl transferase (GGT), and lactate dehydrogenase (LDH) - were
285 measured, along with levels of albumin, creatinine, glucose, lactate, urea, and total
286 protein (TP).

287

288 **3. Results**289 *3.1. Dietary oil supplementation potentially prevents hepatic fat accumulation*

290 The statistical analysis results on the relative abundance of the mRNA (Δ CT) of
 291 five PPAR- α target genes, along with the PPAR- α receptor itself, in the bovine liver
 292 tissue harvested by biopsy, are shown in Figure 1.

293 For animals supplemented with cottonseed, sunflower, and soyabean oils, we
 294 observed a 1.56-, 1.36-, and 1.27-fold change in log2, respectively, in the gene
 295 expression of HMGCR, especially at +15 d. At +30 d, the gene expression of HMGCR
 296 remained increased by 1.30- and 1.17-fold change in log2 in the treatments with
 297 cottonseed oil and sunflower oil, respectively, compared with +0 d. In relation to the
 298 control group, no change in the HMGCR gene expression in the liver was observed
 299 throughout the experiment (Figure 1A).

300 Contrasting with the HMGCR gene, we did not find a significant interaction
 301 between diet and sampling time for the expression levels of the CD36, CPT1A, and
 302 PPARA genes. Consequently, we analyzed the isolated effects of diet (Figure 1B) and
 303 time (Figure 1C) for these genes. Among them, a discreet diet effect was observed for
 304 only the CD36 gene expression. The expression of the CD36 gene in the groups
 305 supplemented with sunflower and soyabean oils decreased by 1.06-fold change in log2
 306 (Figure 1B).

307 When comparing the isolated effect of the time over the expression of CD36,
 308 CPT1A, and PPARA, (Figure 1C), there was an increase in gene expression at +15 d.
 309 However, this elevation was not sustained, and the expression levels at +30 d returned
 310 to a baseline observed at the start of the experiment.

311 Figure 1D displays the results regarding the expression of the OCTN2 gene.

312 Although slight differences were observed in the expression of this gene across different
313 sampling times within most of the animal groups, we did not observe any effect of the
314 oil supplementation compared to the control group.

315 Finally, the expression level of the ANGPTL4 gene remained constant
316 throughout all experimental conditions (Figure 1E).

317

318 3.2. Serum lipid metabolites increase with oil supplementation

319 Figure 2 shows the results of the serum quantification of lipid metabolites,
320 including TC, HDL, TAG, BHB and NEFA.

321 When comparing the TC data, it was evident that at +0 d, all diets, including the
322 control one, promoted equal cholesterol levels (TC medians ranging from 41.2-62.6
323 mg/dL), and in the control diet, TC levels remained stable across the time. In the oil-
324 supplemented groups, however, it was noticeable that TC levels increased consistently
325 during the experimental periods. TC values were much higher in the cottonseed oil diet
326 (116.3 mg/dL and 133.7 mg/dL), and intermediate in the sunflower (93.6 mg/dL and
327 110.7 mg/dL) and soyabean diets (83.3 mg/dL and 116.4 mg/dL) compared with the
328 control (49.3 mg/dL and 60.35 mg/dL) for +15 d and +30 d, respectively.

329 Similar results were observed for HDL levels (Figure 2B). No difference was
330 observed among the animal groups at +0 d, while at +15 d and +30 d, HDL levels were
331 higher and statistically equivalent for all oil-inclusive diets compared to control group.

332 When comparing the TAG levels (Figure 2C), no statistical difference was found
333 among all groups at +0 d. However, the TAG levels increased across the experimental
334 period for all groups, particularly for the oil-supplemented diets. These higher levels of
335 TAGs observed in the serum of animals supplemented with oils, compared to the

control group, can indicate adequate absorption by the digestive tract of the fatty acids contained in the oils used in the diets.

In addition to TC, HDL, and TAG, BHB and NEFA levels were also assessed, but only at +15 d and +30 d due to constraints related to the volume of blood samples collected during the experiments. Since no significant interaction was found between diet and sampling time for these analytes, we separately examined the effects of diet (Figure 2D) and time (Figure 2E) on them.

No differences were observed for BHB levels over time or across different diets, indicating no ketogenic effects of the treatments. Contrasting, NEFA levels were positively influenced by both oil supplementation and the sampling time, reflecting increased circulating lipids in these animals.

347

3.3. Dietary oil supplementation maintains weight gain despite reducing DMI

In terms of weight gain in heifers from +0 d to +30 d, no statistical difference was found among the four diets, showing that the animals maintained similar weight gain throughout the experiment (Table 4). When considering DMI, a different scenario was observed. While no significant difference was detected in the food intake for both sunflower and soyabean oil diets along the time, a notable 14.5 % decrease in the food intake was observed for the cottonseed oil treatment (Table 5).

355

3.4. Dietary oil supplementation has no adverse effect on clinical biochemical parameters

The impact of oil supplementation on animal health was further investigated by analyzing the serum concentrations of AST, GGT, LDH, TP, creatinine, glucose, lactate, and urea (Table 6).

1 361 For the hepato-specific enzymes AST, GGT, and LDH, as well as lactate serum
2 362 concentrations, no isolated or combined effects of the diets and sampling time were
3
4 363 observed.

5
6
7 364 Similar results were detected regarding the concentrations of creatinine, glucose,
8
9 365 TP, and urea. No combined or isolated effects of the diets were observed for these
10
11 366 parameters, except for a slight decrease in glycemia detected at +30 d in the group of
12
13 367 animals supplemented with sunflower oil.

14
15
16 368 However, an isolated effect of time was observed concerning the concentration
17
18 369 of creatinine, TP, and urea. Although a slight reduction in concentration at time +30 d
19
20 370 was observed for the first two parameters, an increase was noted in serum urea
21
22 371 concentration. Pearson's correlation analysis confirmed the negative correlation between
23
24 372 uremia and TP ($P = 0.007$).

25
26
27 373

28 374 4. Discussion

29
30 375 Lipid supplementation in dairy cattle diets has been a practice to mitigate the
31
32 376 consequences of NEB, but the implications of this strategy on the expression of hepatic
33
34 377 genes associated with lipid metabolism are not fully understood. Previous research,
35
36 378 predominantly conducted *in vitro*, has shed light on the central role of LCFA as PPAR-
37
38 379 α agonists in modulating gene expression in the liver (Bionaz et al., 2012; Weld et al.,
39
40 380 2019; Zhou et al., 2014).

41
42
43 381 Notably, only one *in vivo* study has been conducted thus far in dairy cows,
44
45 382 evaluating the effects on PPAR- α by including a mixture of vegetable and animal
46
47 383 hydrolyzed fat (Energy Booster100™) or fish oil in their diets (Akbar et al., 2013). This
48
49 384 underscores the significance of the current analysis, which specifically examines the
50
51 385 impact of incorporating exclusively vegetable oils into cattle nutrition.

1 386 The primary criterion for selecting the oils used in our study was their diversity
 2 387 regarding fatty acid profiles, but we also considered their price and market availability.
 3
 4 388 Among the three oils chosen, cottonseed oil differs due to its higher levels of saturated
 5
 6 389 fatty acids (26.0 %), soyabean oil stands out for its higher levels of α -Linoleic Acid (ω -
 7
 8 390 3) (6.8 %), while sunflower oil is characterized by a higher percentage of Linoleic Acid
 9
 10
 11 391 (ω -6) (68.0 %) (Raymon et al., 2016).

12 392 In addition to PPARA itself, five out of the eight candidate genes related to liver
 13
 14 393 lipid metabolism, whose regulatory effect of PPAR- α had already been proven by *in*
 15
 16 394 *vitro* studies (Bionaz et al., 2012; Weld et al., 2019; Zhou et al., 2014), were selected for
 17
 18 395 analysis in the present study.

19 396 The inclusion of different oils in the diet of the heifers resulted in changes in the
 20
 21 397 expression profile of part of the selected candidate genes. The most notable findings
 22
 23 398 were related to the HMGCR and CD36 genes.

24 399 The increase in HMGCR gene expression observed in the groups of animals
 25
 26 400 supplemented with all three different oils is noteworthy and consistent with prior *in*
 27
 28 401 *vitro* findings observed with bovine cell cultures (Bionaz et al., 2012).

29 402 The enzyme encoded by HMGCR gene plays a direct role in the liver's ability to
 30
 31 403 utilize acetyl-CoA for cholesterol production. This increase can be interpreted as a
 32
 33 404 mechanism to enhance liver acetyl-CoA clearance, potentially preventing fat
 34
 35 405 accumulation in this organ.

36 406 Furthermore, ruminant hepatocytes are recognized for their limited capacity to
 37
 38 407 secrete VLDL (Kleppe et al., 1988; Pullen et al., 1990), particularly in low cholesterol
 39
 40 408 concentrations (Kessler et al., 2014). Therefore, in addition to alleviating the fat
 41
 42 409 oxidation machinery, the upregulation of cholesterol synthesis in the liver could play a

410 crucial role in preventing TAG accumulation inside the bovine hepatocytes during
 411 NEB.
 412 One might question whether insulin, known for stimulating lipogenesis and
 413 sterol synthesis, could counteract the potential beneficial effect of increased HMGCR
 414 expression in preventing liver TAG accumulation during NEB. Studies in murine
 415 models, both *in vitro* (Bhasker and Friedmann, 2008) and *in vivo* (Ness et al., 1994),
 416 have shown that insulin upregulates HMGCR gene expression. However, other studies
 417 suggest that these findings may not apply to dairy cows (Gross et al., 2011, van Dorland
 418 et al., 2009; Viturro et al., 2009). These authors observed significant HMGCR
 419 upregulation after parturition, coinciding with decreased insulin plasma concentrations.
 420 These results are significant not only because they support our hypothesis that
 421 including vegetable oils in the diet of dairy cows may prevent hepatic steatosis during
 422 NEB, but also because they emphasize the importance of conducting research *in vivo*
 423 and tailored specifically to dairy cattle. Findings from studies with monogastric animals
 424 may not always be directly applicable to ruminants.
 425 In relation to CD36 results, we observed a decrease in the expression of this
 426 gene in groups supplemented with oils, particularly with sunflower and soyabean oils.
 427 The CD36 protein, among its various functions, facilitates the transport of LCFAs into
 428 hepatocytes (Silverstein and Febbraio, 2009). Therefore, the observed lower expression
 429 of the CD36 gene in animals supplemented with oils could be interpreted as an adaptive
 430 evolutionary strategy to mitigate fat accumulation in the liver.
 431 Interestingly, our CD36 results contrast with those of (Bionaz et al., 2012), who
 432 observed an upregulation of CD36 gene expression in Madin–Darby Bovine Kidney
 433 (MDBK) cell cultures exposed to fatty acids and WY-14,643, a commercial agonist of
 434 PPAR- α . However, the differences between the studies may be attributed to the

1 435 previously reported distinct CD36 gene expression patterns depending on the cell types,
 2 436 reflecting its multiple cellular functions (Busato and Bionaz, 2020; Silverstein and
 3
 4 437 Febbraio, 2009).
 5
 6

7 438 In contrast to previous research (Bionaz et al., 2012; Weld et al., 2019; Zhou et
 8
 9 439 al., 2014), the present study did not find a significant change in the expression of the
 10
 11 440 PPARA, CPT1A, OCTN2, and ANGPTL4. These differences could be due to the
 12
 13 441 nature of the *in vivo* model used in our study compared to the *in vitro* settings.
 14
 15 442 Additionally, it is important to consider that these genes' expression may be subject to
 16
 17 443 other regulatory mechanisms beyond those involving PPAR- α . These findings
 18
 19 444 emphasize the importance of conducting nutrigenomic research as close as possible to
 20
 21 445 natural livestock conditions.
 22
 23
 24
 25

26 446 Furthermore, the timing of oil supplementation must also be taken into account.
 27
 28 447 In our study, the most significant effects on the expression of PPAR- α target genes were
 29
 30 448 observed at +15 d of supplementation.
 31
 32

33 449 One possible explanation for this time-dependent effect of dietary oil inclusion
 34
 35 450 on hepatic gene expression could be an adaptation of the ruminal microbiome to higher
 36
 37 451 intake of fatty acids. This idea aligns with previous studies that have investigated the
 38
 39 452 relationship between the diet and the rumen microbiome (Lillis et al., 2011; Wang et al.,
 40
 41 453 2019).
 42
 43
 44
 45

46 454 The results regarding serum biochemistry and weight gain suggest that the
 47
 48 455 dietary inclusion of oils did not have a negative impact on parameters related to the
 49
 50 456 general health and performance of the heifers. Despite a notable reduction in feed intake
 51
 52 457 observed in the group fed with cottonseed oil (14.5% lower intake), the weight gain of
 53
 54 458 the animals was not significantly affected. These findings are reassuring from a
 55
 56
 57
 58
 59
 60
 61
 62
 63
 64
 65

459 practical standpoint, as it would not be desirable to prevent hepatic steatosis by
460 including oils in the cows' diet at the expense of the animals' health and performance.

461 Our research has shown that increasing the dietary supply of fatty acids can have
462 an agonist effect on PPAR- α in the liver. This implies that incorporating oils into the
463 feed may represent a strategic approach to mitigate, or even prevent, the adverse effects
464 of NEB in peripartum cows. Moreover, it has the potential to enhance their productivity
465 and overall well-being.

467 5. Conclusions

468 In conclusion, the present study suggests that including cottonseed, sunflower,
469 and soyabean oils in the diet of dairy cattle may increase hepatic acetyl-CoA clearance
470 and reduce liver fatty acid internalization, thereby potentially preventing liver steatosis,
471 particularly during periods of NEB. Furthermore, our results indicate no adverse effects
472 on the health and performance parameters of the cattle. These findings offer a new
473 perspective on the dietary use of these oils in dairy cattle nutrition, extending their
474 utility beyond the conventional application of increasing energy density in feed.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

475 **6. Declaration of interest**

476 None.

477 7. Acknowledgements

478 The authors extend their gratitude to all individuals and institutions who
479 contributed to this study, including their time, dedication, and infrastructure. Financial
480 support for this research was provided by the Brazilian government through the
481 Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES –
482 88887.364528/2019-00) and the National Council for Scientific and Technological
483 Development (CNPq - 308440/2022-6). The financial sponsors had no role in the study
484 design, data collection, analysis, interpretation, writing of the report, or decision to
485 submit the article for publication.

486 **8. CRediT authorship contribution statement**

487 **Nélio Cunha Gonçalves**: Conceptualization, Formal analysis, Methodology,
 488 Supervision, Visualization, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Juliana**
 489 **Guimarães Laguna**: Conceptualization, Formal analysis, Methodology, Writing -
 490 original draft. **Guilherme Rocha Moreira**: Conceptualization, Formal analysis,
 491 Methodology, Visualization. **Tiago Facury Moreira**: Conceptualization, Formal
 492 analysis, Methodology, Writing - original draft. **Rodrigo Melo Meneses**: Methodology.
 493 **Paulo Henrique Puphal Küster**: Methodology. **Tales Fernando da Silva**:
 494 Methodology. **Eloísa de Oliveira Simões Saliba**: Methodology. **Geraldo Sérgio Senra**
 495 **Carneiro Barbosa**: Methodology. **Clarindo Inácio de Aparecida Queiroz**:
 496 Methodology. **Gabriela Ponath Peruzzog**: Methodology, Writing - review & editing.
 497 **Vasco Azevedo**: Writing - review & editing. **Andréa Mara Macedo**:
 498 Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Project administration,
 499 Supervision, Writing - original draft, Writing - review & editing.

9. References

- Akbar, H., Schmitt, E., Ballou, M.A., Corrêa, M.N., DePeters, E.J., Loor, J.J., 2013. Dietary lipid during late-pregnancy and early-lactation to manipulate metabolic and inflammatory gene network expression in dairy cattle liver with a focus on PPARs. *Gene Regul Syst Bio* 2013, 103–123. <https://doi.org/10.4137/GRSB.S12005>
- Angeli, E., Trionfini, V., Gareis, N.C., Matiller, V., Huber, E., Rey, F., Salvetti, N.R., Ortega, H.H., Hein, G.J., 2019. Protein and gene expression of relevant enzymes and nuclear receptor of hepatic lipid metabolism in grazing dairy cattle during the transition period. *Res Vet Sci* 123, 223–231. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.01.020>
- Antonacci, L.E., Gagliostro, G.A., Virginia Cano, A., Adrián Bernal, C., 2017. Effects of Feeding Combinations of Soybean and Linseed Oils on Productive Performance and Milk Fatty Acid Profile in Grazing Dairy Cows. *Agricultural Sciences* 08, 984–1002. <https://doi.org/10.4236/as.2017.89072>
- Aprianita, A., Donkor, O.N., Moate, P.J., Williams, S.R.O., Auldist, M.J., Greenwood, J.S., Hannah, M.C., Wales, W.J., Vasiljevic, T., 2014. Effects of dietary cottonseed oil and tannin supplements on protein and fatty acid composition of bovine milk. *Journal of Dairy Research* 81, 183–192. <https://doi.org/10.1017/S0022029914000065>
- Association of Official Analytical Chemists, 2012. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. Aoac 19th ed.
- Atrice Desvergne, B., Michalik, L., Wahli, W., 2006. Transcriptional Regulation of Metabolism. <https://doi.org/10.1152/physrev.00025.2005>
- Bhasker, C.R., Friedmann, T., 2008. Insulin-like growth factor-1 coordinately induces the expression of fatty acid and cholesterol biosynthetic genes in murine C2C12 myoblasts. *BMC Genomics* 9, 535. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-535>
- Bionaz, M., Thering, B.J., Loor, J.J., 2012. Fine metabolic regulation in ruminants via nutrient-gene interactions: Saturated long-chain fatty acids increase expression of genes involved in lipid metabolism and immune response partly through PPAR- α activation. *British Journal of Nutrition* 107, 179–191. <https://doi.org/10.1017/S0007114511002777>
- Bragt, M.C.E., Popeijus, H.E., 2008. Peroxisome proliferator-activated receptors and the metabolic syndrome. *Physiol Behav.* <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.11.053>
- Busato, S., Bionaz, M., 2020. The interplay between non-esterified fatty acids and bovine peroxisome proliferator-activated receptors: Results of an in vitro hybrid approach. *J Anim Sci Biotechnol* 11. <https://doi.org/10.1186/s40104-020-00481-y>
- Da Silva, S., Cal-Pereyra, L.G., Benech, A., Acosta-Dibarrat, J., Martin, M.J., Abreu, M.C., Perini, S., González-Montaña, J.R., 2016. Evaluation of a fibrate, specific stimulant of PPAR α , as a therapeutic alternative to the treatment of clinical ovine pregnancy toxemia. *J Vet Pharmacol Ther* 39, 497–503. <https://doi.org/10.1111/jvp.12304>

- 538 Dunn, O.J., 1964. Multiple Comparisons Using Rank Sums. *Technometrics* 6, 241–252.
- 539 Ebrahimi, M., Rajion, M.A., Meng, G.Y., Farjam, A.S., Oskoueian, E., Jafari, S., 2015. Diet
540 high in α -linolenic acid up-regulate PPAR- α gene expression in the liver of goats.
541 *Electronic Journal of Biotechnology* 18, 210–214.
542 <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.03.009>
- 543 Friedman, M., 1937. The Use of Ranks to Avoid the Assumption of Normality Implicit in
544 the Analysis of Variance. *J Am Stat Assoc* 32, 675–701.
- 545 Graber, M., Kohler, S., Kaufmann, T., Doherr, M.G., Bruckmaier, R.M., van Dorland, H.A.,
546 2010. A field study on characteristics and diversity of gene expression in the liver of
547 dairy cows during the transition period. *J Dairy Sci* 93, 5200–5215.
548 <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3265>
- 549 Granja-Salcedo, Y.T., de Souza, V.C., Dias, A.V.L., Gomez-Insuasti, A.S., Messana, J.D.,
550 Berchielli, T.T., 2017. Diet containing glycerine and soybean oil can reduce ruminal
551 biohydrogenation in Nellore steers. *Anim Feed Sci Technol* 225, 195–204.
552 <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.01.021>
- 553 Hammon, H.M., Sauter, S.N., Reist, M., Zbinden, Y., Philipona, C., Morel, C., Blum, J.W.,
554 2003. Dexamethasone and colostrum feeding affect hepatic gluconeogenic enzymes
555 differently in neonatal calves 1,2,3. *J Anim Sci* 81, 3095–3106.
556 <https://doi.org/10.2527/2003.81123095x>
- 557 Ibeagha-Awemu, E.M., Li, R., Ammah, A.A., Dudemaine, P.L., Bissonnette, N., Benchaar,
558 C., Zhao, X., 2016. Transcriptome adaptation of the bovine mammary gland to diets
559 rich in unsaturated fatty acids shows greater impact of linseed oil over safflower oil
560 on gene expression and metabolic pathways. *BMC Genomics* 17.
561 <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2423-x>
- 562 Ibeagha-Awemu, E.M., Li, R., Dudemaine, P.L., Do, D.N., Bissonnette, N., 2018.
563 Transcriptome analysis of long non-coding RNA in the bovine mammary gland
564 following dietary supplementation with linseed oil and safflower oil. *Int J Mol Sci* 19.
565 <https://doi.org/10.3390/ijms19113610>
- 566 Ji, P., Drackley, J.K., Khan, M.J., Looor, J.J., 2014. Overfeeding energy upregulates
567 peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ -controlled adipogenic and
568 lipolytic gene networks but does not affect proinflammatory markers in visceral and
569 subcutaneous adipose depots of Holstein cows. *J Dairy Sci* 97, 3431–3440.
570 <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7295>
- 571 Judy, J. V., Bachman, G.C., Brown-Brandl, T.M., Fernando, S.C., Hales, K.E., Miller, P.S.,
572 Stowell, R.R., Kononoff, P.J., 2019. Reducing methane production with corn oil and
573 calcium sulfate: Responses on whole-animal energy and nitrogen balance in dairy
574 cattle. *J Dairy Sci* 102, 2054–2067. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14567>

- 575 Kessler, E.C., Gross, J.J., Bruckmaier, R.M., Albrecht, C., 2014. Cholesterol metabolism,
576 transport, and hepatic regulation in dairy cows during transition and early lactation.
577 J Dairy Sci 97, 5481–5490. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-7926>
- 578 Kleppe, B.B., Aiello, R.J., Grummer, R.R., Armentano, L.E., 1988. Triglyceride
579 Accumulation and Very Low Density Lipoprotein Secretion by Rat and Goat
580 Hepatocytes In Vitro. J Dairy Sci 71, 1813–1822. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79750-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79750-7)
- 581
- 582 Kruskal, W.H., Wallis, ; W Allen, 1952. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis,
583 Journal of the American Statistical Association.
- 584 Laguna, J.G., Cardoso, M.S., Lima, J.A., Reis, R.B., Carvalho, A.U., Saturnino, H.M.,
585 Teixeira, S.M.R., 2017. Expression of hepatic genes related to energy metabolism
586 during the transition period of Holstein and F1 Holstein-Gir cows. J Dairy Sci 100,
587 9861–9870. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12459>
- 588 Leroux, C., Bernard, L., Faulconnier, Y., Rouel, J., De La Foye, A., Domagalski, J., Chilliard,
589 Y., 2016. Bovine mammary nutrigenomics and changes in the milk composition due
590 to rapeseed or sunflower oil supplementation of high-forage or high-concentrate
591 diets. J Nutrigenet Nutrigenomics 9, 65–82. <https://doi.org/10.1159/000445996>
- 592 Levene, H., 1960. Robust Tests for the equality of variance, in: Olkin, I. (Ed.),
593 Contributions to Probability and Statistics. Stanford University Press, Palo Alto,
594 California, pp. 278–292.
- 595 Lillis, L., Boots, B., Kenny, D.A., Petrie, K., Boland, T.M., Clipson, N., Doyle, E.M., 2011. The
596 effect of dietary concentrate and soya oil inclusion on microbial diversity in the
597 rumen of cattle. J Appl Microbiol 111, 1426–1435. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05154.x>
- 598
- 599 Lock, A.L., Souza, J., 2018. Impact of individual and combinations of supplemental fatty
600 acids on dairy cow performance and metabolism, in: Proceedings of the Four-State
601 Dairy Nutrition and Management Conference, Dubuque, Iowa. Dubuque, Iowa, pp.
602 92–99.
- 603 Massey, F.J., 1951. The Kolmogorov-Smirnov Test for Goodness of Fit, Source: Journal of
604 the American Statistical Association.
- 605 Mobuchon, L., Le Guillou, S., Marthey, S., Laubier, J., Laloë, D., Bes, S., Le Provost, F.,
606 Leroux, C., 2017. Sunflower oil supplementation affects the expression of miR-20a-
607 5p and miR-142-5p in the lactating bovine mammary gland. PLoS One 12.
608 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185511>
- 609 Ness, G.C., Zhao, Z., Wiggins, L., 1994. Insulin and glucagon modulate hepatic 3-hydroxy-
610 3-methylglutaryl-coenzyme A reductase activity by affecting immunoreactive
611 protein levels. J Biol Chem 269, 29168–72.

- 612 Nutrient Requirements of Dairy Cattle, 2001. National Academies Press, Washington, D.C.
 613 <https://doi.org/10.17226/9825>
- 614 Prieto-Manrique, E., Mahecha-Ledesma, L., Vargas-Sánchez, J.E., Angulo-Arizala, J., 2018.
 615 The effect of sunflower seed oil supplementation on the milk fatty acid contents of
 616 cows fed leucaena in an intensive silvopastoral system. *Anim Feed Sci Technol* 239,
 617 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.03.003>
- 618 Pullen, D.L., Liesman, J.S., Emery, R.S., 1990. A species comparison of liver slice synthesis
 619 and secretion of triacylglycerol from nonesterified fatty acids in media. *J Anim Sci*
 620 68, 1395. <https://doi.org/10.2527/1990.6851395x>
- 621 Raymon, A., Sakthibalan, S., Cinthal, C., Subramaniraja, R., Yuvaraj, M., 2016.
 622 Enhancement and comparison of nano-ester insulating fluids. *IEEE Transactions on*
 623 *Dielectrics and Electrical Insulation* 23, 892–900.
 624 <https://doi.org/10.1109/TDEI.2015.005397>
- 625 Ribeiro, C.G.S., Lopes, F.C.F., Gama, M.A.S., Morenz, M.J.F., Rodriguez, N.M., 2014.
 626 Desempenho produtivo e perfil de ácidos graxos do leite de vacas que receberam
 627 níveis crescentes de óleo de girassol em dietas à base de capim-elefante. *Arq Bras*
 628 *Med Vet Zootec* 66, 1513–1521. <https://doi.org/10.1590/1678-6886>
- 629 Salles, M.S.V., D'abreu, L.F., Júnior, L.C.R., César, M.C., Guimarães, J.G.L., Segura, J.G.,
 630 Rodrigues, C., Zanetti, M.A., Pfrimer, K., Netto, A.S., 2019. Inclusion of sunflower oil
 631 in the bovine diet improves milk nutritional profile. *Nutrients* 11.
 632 <https://doi.org/10.3390/nu11020481>
- 633 Sampaio, I.B.M., 2010. Estatística aplicada à experimentação animal, 3rd ed. Fundação de
 634 Estudo e Pesquisa Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.
- 635 Silverstein, R.L., Febbraio, M., 2009. CD36, a scavenger receptor involved in immunity,
 636 metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci Signal*.
 637 <https://doi.org/10.1126/scisignal.272re3>
- 638 Singh, S., Golla, N., Sharma, D., Singh, D., Onteru, S.K., 2019. Buffalo liver transcriptome
 639 analysis suggests immune tolerance as its key adaptive mechanism during early
 640 postpartum negative energy balance. *Funct Integr Genomics* 19, 759–773.
 641 <https://doi.org/10.1007/s10142-019-00676-1>
- 642 Sun, Y., Allen, M.S., Lock, A.L., 2019. Culture pH interacts with corn oil concentration to
 643 affect biohydrogenation of unsaturated fatty acids and disappearance of neutral
 644 detergent fiber in batch culture. *J Dairy Sci* 102, 9870–9882.
 645 <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16581>
- 646 van Dorland, H.A., Richter, S., Morel, I., Doherr, M.G., Castro, N., Bruckmaier, R.M., 2009.
 647 Variation in hepatic regulation of metabolism during the dry period and in early
 648 lactation in dairy cows. *J Dairy Sci* 92, 1924–1940. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1454>

650 Viturro, E., Koenning, M., Kroemer, A., Schlamberger, G., Wiedemann, S., Kaske, M.,
651 Meyer, H.H.D., 2009. Cholesterol synthesis in the lactating cow: Induced expression
652 of candidate genes. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 115, 62–
653 67. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2009.02.011>

654 Wang, L., Zhang, G., Xu, H., Xin, H., Zhang, Y., 2019. Metagenomic analyses of microbial
655 and carbohydrate-active enzymes in the rumen of holstein cows fed different
656 forage-to-concentrate ratios. *Front Microbiol* 10.
657 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00649>

658 Weld, K.A., Erb, S.J., White, H.M., 2019. Short communication: Effect of manipulating
659 fatty acid profile on gluconeogenic gene expression in bovine primary hepatocytes. *J*
660 *Dairy Sci* 102, 7576–7582. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16150>

661 Zaiontz, C., 2020. Real Statistics Using Excel. <http://www.real-statistics.com/> (accessed 13
662 May 2020).

663 Zened, A., Enjalbert, F., Nicot, M.C., Troegeler-Meynadier, A., 2013. Starch plus sunflower
664 oil addition to the diet of dry dairy cows results in a trans-11 to trans-10 shift of
665 biohydrogenation. *J Dairy Sci* 96, 451–459. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5690>

666 Zhou, X., Wen, G., Ringseis, R., Eder, K., 2014. Short communication: The pharmacological
667 peroxisome proliferator-activated receptor α agonist WY-14,643 increases
668 expression of novel organic cation transporter 2 and carnitine uptake in bovine
669 kidney cells. *J Dairy Sci* 97, 345–349. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7161>

670 Zhu, Y., Liu, G., Du, X., Shi, Z., Jin, M., Sha, X., Li, Xiaobing, Wang, Z., Li, Xinwei, 2019.
671 Expression patterns of hepatic genes involved in lipid metabolism in cows with
672 subclinical or clinical ketosis. *J Dairy Sci* 102, 1725–1735.
673 <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14965>

674

10. Figure captions

676

677 **Fig. 1.** Relative mRNA abundance (ΔCT , log2) of six genes in the liver of dairy heifers
 678 fed a control diet and three diets with vegetable oils, at three sampling times (panels A-
 679 E). A: HMGCR (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase); significant diet x time
 680 interaction ($P < 0.05$) determined by Fisher's F test; distinct uppercase letters above the
 681 boxes indicate significant differences between diets at each sampling time, and distinct
 682 lowercase letters above the boxes indicate significant differences between sampling
 683 times within each diet, determined by Tukey's test ($P < 0.05$). B: CD36 (Fatty acid
 684 translocase); CPT1A (Carnitine palmitoyl transferase 1A); PPARA (Peroxisome
 685 proliferator-activated receptor alpha); nonsignificant diet x time interaction ($P > 0.05$)
 686 by Fisher's F test; distinct uppercase letters above the boxes, for comparisons between
 687 diets indicate differences by Tukey's test ($P < 0.05$). C: Nonsignificant diet x time
 688 interaction ($P > 0.05$) by Fisher's F test; distinct uppercase letters above the boxes, for
 689 comparisons between sampling times, indicate differences by Tukey's test ($P < 0.05$). D:
 690 OCTN2 (Organic cation transporter 2); significant diet x time interaction by Fisher's F
 691 test ($P < 0.05$); distinct uppercase letters above the boxes indicate significant differences
 692 between diets at each sampling time, determined by the Kruskal-Wallis test ($P > 0.05$),
 693 with Dunn's post-test ($P < 0.05$); distinct lowercase letters above the boxes indicate
 694 significant differences between sampling times within each diet, determined by
 695 Friedman's test ($P < 0.05$), with Dunn's post-test ($P < 0.05$). E: ANGPTL4
 696 (Angiopoietin-like protein 4); significant diet x time interaction by Fisher's F test ($P <$
 697 0.05); equal medians between diets at each sampling time, determined by the Kruskal-
 698 Wallis test ($P > 0.05$), are represented with equal uppercase letters above the boxes;
 699 equal medians between sampling times within each diet, determined by Friedman's test

1 700 ($P < 0.05$), are represented by equal lowercase letters above the boxes. For all panels,
 2 701 outliers are represented as asterisks and the average is represented as a cross inside a
 3
 4 702 circle.
 5
 6
 7 703
 8
 9
 10 704 **Fig. 2.** Serum levels of lipid metabolism-related analytes (panels A-E) of dairy heifers
 11
 12 705 fed a control diet and three diets with vegetable oils, at different sampling times. **A:**
 13
 14 706 medians, minimum and maximum values of total cholesterol (TC); significant diet x
 15
 16 707 time interaction ($P < 0.05$), determined by Fisher's F test; distinct uppercase letters
 17
 18 708 indicate significant differences between diets at each sampling time, and distinct
 19
 20
 21 709 lowercase letters indicate significant differences between sampling times within each
 22
 23 710 diet, determined by Tukey's test ($P < 0.05$). **B:** medians, minimum and maximum values
 24
 25
 26 711 of high-density lipoproteins (HDL); significant diet x time interaction ($P < 0.05$),
 27
 28 712 determined by Fisher's F test; distinct uppercase letters indicate significant differences
 29
 30 713 between diets at each sampling time, and distinct lowercase letters indicate significant
 31
 32 714 differences between sampling times within each diet, determined by Tukey's test ($P <$
 33
 34
 35 715 0.05). **C:** means and standard errors of triacylglycerol (TAG); significant diet x time
 36
 37
 38 716 interaction ($P < 0.05$), determined by Fisher's F test; distinct uppercase letters indicate
 39
 40 717 significant differences between diets at each sampling time, and distinct lowercase
 41
 42 718 letters indicate significant differences between sampling times within each diet,
 43
 44
 45 719 determined by Tukey's test ($P < 0.05$). **D:** means and standard errors of β -
 46
 47 720 hydroxybutyrate (BHB) and non-esterified fatty acids (NEFA); non-significant diet x
 48
 49
 50 721 time interaction ($P < 0.05$), determined by Fisher's F test; distinct uppercase letters
 51
 52 722 indicate significant differences between diets determined by Tukey's test ($P < 0.05$). **E:**
 53
 54
 55 723 means and standard errors of BHB and NEFA; non-significant diet x time interaction (P
 56
 57
 58
 59
 60
 61
 62
 63
 64
 65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

724 < 0.05), determined by Fisher's F test; distinct uppercase letters indicate significant
725 differences between sampling times determined by Tukey's test ($P < 0.05$).

726 **Table 1**

727 Percentage composition and nutritional levels of the experimental diets

Ingredients	Diets			
	Control (% of DM)	Cottonseed oil (% of DM)	Sunflower oil (% of DM)	Soyabean oil (% of DM)
Maize silage	49.5	65.5	65.5	65.5
Ground corn	32.3	9.2	9.2	9.2
Soyabean meal	16.4	18.7	18.7	18.7
Premix ^A	1.8	2.4	2.4	2.4
Cottonseed oil	-	4.2	-	-
Sunflower oil	-	-	4.2	-
Soyabean oil	-	-	-	4.2
CP	14.70	14.60	14.60	14.60
TDN	71.90	71.50	71.50	71.50
ADF	18.90	23.80	23.80	23.80
NDF	34.10	41.60	41.60	41.60
EE	2.80	6.30	6.30	6.30
MM	5.70	6.80	6.80	6.80
Ca	0.56	0.73	0.73	0.73
P	0.40	0.40	0.40	0.40

728 The total dry matter (DM) content was 45.8% for the control diet and 39.8% for the

729 diets incorporating oil. ^A NC Bovilac 50, Master Alimentos[™]; CP (Crude protein); TDN

730 (Total digestible nutrients); ADF (Acid detergent fiber); NDF (Neutral detergent fiber);

731 EE (Ether extract); MM (Mineral matter); Ca (Calcium); P (Phosphorus).

732 **Table 2**

733 Selected genes for the quantification of mRNA levels in bovine liver tissue

Gene	Description	Location	Function
ACTB	β -actin	CYTO	Structure and mobility
ANGPTL4	Angiopoietin 4-like protein	EC	Metabolic regulation ^A
CD36	Fatty acid translocase	PM	Fatty acid transport
CPT1A	Carnitine palmitoyl transferase 1A	MM	Fatty acid oxidation
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	CYTO	Glycolysis
HMGCR	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase	CYTO	Cholesterol and ketone body synthesis
OCTN2	Organic cation transporter 2	PM	Carnitine transport
PPARA	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha	N, CYTO	Gene transcription
RPS9	Ribosomal protein S9	CYTO	Ribosome structure

734 ^A Glucose and lipid metabolism; CYTO (Cytosol); EC (Extracellular); MM

735 (Mitochondrial membrane); PM (Plasma membrane); N (Nucleus).

736

737 **Table 3**

738 Gene information and primers sequences used for real-time PCR amplification

Gene	GenBank accession number		Primer sequence (5'-3')	Product size (bp)	Source
ACTB	NM_173979.3	F	CAGGATGCAGAAAGAG ATCACTGC	222	(Hammon et al., 2003)
		R	AGGGTGTAACGCAGCT AACAG		
ANGPT L4	NM_0010460 43	F	AGGAAGAGGCTAGCCC AAGAT	109	(Bionaz et al., 2012)
		R	CCCTCTCTCCCTCTTCA AACAG		
CD36	X91503	F	GTACAGATAGCAGCCT CATTTCC	81	(Bionaz et al., 2012)
		R	TAGGACCTAGCAAATA TCAGAGGA		
CPT1A	NM_0013049 89.2	F	CCAAATCATGCACTGTT GACCA	109	Designed by our team
		R	AAAACCTGAGAGACAA GCCCA		
GAPDH	U85042	F	GTCTTCACTACCATGGA GAAGG	197	(Hammon et al., 2003)
		R	TCATGGATGACCTTGGC CAG		
HMGC R	BC153262	F	ACCCATGAGCGAGGTG TATC	241	(Laguna et al., 2017)
		R	TAGTGCTGGCCACAAG ACAG		
OCTN2	BC105377	F	CACAGTGGTCAGGAAC ATGG	181	(Zhou et al., 2014)
		R	AATGGTGTCTGGGAGT GGAG		
PPARA	NM_0010340 36	F	AGGGCTGCAAGGGTTT CTTTAG	363	(Laguna et al., 2017)
		R	TGACGAAAGGCGGGTT GTTGTTG		
RPS9	NM_0011011 52	F	AAGCTGATCGGCGAGT ATG	140	(Graber et al., 2010)
		R	GCATTACCTTCGAACAG ACG		

739 F (Forward); R (Reverse)

740

741 **Table 4**
 742 Average body weight gain (from +0 d to +30 d) in dairy heifers fed control and oil-
 743 supplemented diets

	Control (kg)	Cotton seed oil (kg)	Sunflower oil (kg)	Soyabean oil (kg)	<i>P</i> -value
	26.75 (1.25) ^A	20.75 (4.27) ^A	26.25 (3.47) ^A	27.75 (2.10) ^A	0.390

744 Weight gain in kilograms of body weight; Means followed by standard errors; Similar
 745 means followed by uppercase letters by Fisher's F test ($p > 0.05$).

746
 747

748 **Table 5**

749 Average dry matter intake (DMI), in dairy heifers fed a control and oil-supplemented
 750 diets at different sampling times

Time	Control	Cottonseed oil	Sunflower oil	Soyabean oil
	(% BW)	(% BW)	(% BW)	(% BW)
+0 d	2.491 (0.208) ^{Ab}	2.581 (0.116) ^{Aa}	2.317 (0.243) ^{Aa}	2.601 (0.170) ^{Aa}
+15 d	2.903 (0.114) ^{Aa}	2.244 (0.235) ^{Ab}	2.456 (0.108) ^{Aa}	2.399 (0.090) ^{Aa}
+30 d	2.877 (0.141) ^{Aa}	2.207 (0.214) ^{Ab}	2.496 (0.087) ^{Aa}	2.374 (0.057) ^{Aa}

751 DMI as a percentage of body weight (% BW) was calculated by dividing the DMI of the
 752 pen by the combined BW of the two animals housed therein. Means followed by
 753 uppercase letters in rows and lowercase letters in columns differ by Tukey's test ($P <$
 754 0.05).

755

Table 6

Serum concentration of biochemical analytes in dairy heifers fed a control diet and oil-supplemented diets at different sampling times

Analyte	Time	Diets			
		Control	Cottonseed oil	Sunflower oil	Soyabean oil
AST (U/L)	+0d	59.2 (49.1-68.4) ^{Aa}	74.7 (64.7-222.2) ^{Aa}	62.6 (58.6-67.2) ^{Aa}	66.2(57.5-74.3) ^{Aa}
	+15d	71.5 (54.4-97.0) ^{Aa}	77.3 (65.3-78.8) ^{Aa}	87.4 (49.6-104.6) ^{Aa}	53.6(48.5-124.7) ^{Aa}
	+30d	74.5 (66.7-133.9) ^{Aa}	68.2 (54.9-78.1) ^{Aa}	68.6 (54.4-104.8) ^{Aa}	58.7(56.3-83.1) ^{Aa}
Creatinine (mg/dL)	+0d	1.16 (1.02-1.21) ^{Aa}	1.47 (1.28-1.62) ^{Aa}	1.35 (1.21-1.41) ^{Aa}	1.37(1.18-1.67) ^{Aa}
	+15d	1.07 (0.94-1.19) ^{Aab}	1.42 (1.18-1.52) ^{Aab}	1.28 (1.24-1.29) ^{Aab}	1.06(0.81-1.47) ^{Aa}
	+30d	0.92 (0.81-1.13) ^{Ab}	1.10 (0.94-1.24) ^{Ab}	0.93 (0.81-0.95) ^{Ab}	0.95(0.88-1.18) ^{Aa}
Glucose (mg/dL)	+0d	94.9 (92.1-102.6) ^{Aa}	95.5 (93.6-98.4) ^{Aa}	96.1 (92.3-103.1) ^{Aa}	109.4(100.0-114.4) ^{Aa}
	+15d	167.8 (86.8-193.9) ^{Aa}	99.9 (92.9-116.0) ^{Aa}	92.2 (86.2-94.3) ^{Aab}	88.5(072.5-104.0) ^{Aa}
	+30d	89.4 (81.5-104.3) ^{Aa}	81.8 (73.7-087.5) ^{Aa}	85.1 (80.7-85.8) ^{Ab}	80.6(077.4-087.2) ^{Aa}
GGT (U/L)	+0d	22.0 (17.1-25.0) ^{Aa}	21.3 (19.1-40.7) ^{Aa}	19.0 (16.5-26.1) ^{Aa}	20.0(17.3-25.2) ^{Aa}
	+15d	21.2 (19.7-23.1) ^{Aa}	22.5 (18.7-34.1) ^{Aa}	19.1 (16.3-29.4) ^{Aa}	18.3(14.7-30.0) ^{Aa}
	+30d	16.8 (14.0-19.5) ^{Aa}	18.5 (13.7-19.2) ^{Aa}	18.3 (13.7-38.8) ^{Aa}	18.0(16.1-29.6) ^{Aa}
Lactate (mg/dL)	+0d	15.65 (2.03) ^{Aa}	16.68 (2.89) ^{Aa}	11.53 (1.99) ^{Aa}	22.25(3.79) ^{Aa}
	+15d	16.10 (5.77) ^{Aa}	26.20 (12.30) ^{Aa}	13.45 (2.51) ^{Aa}	11.88(1.44) ^{Aa}
	+30d	09.10 (0.65) ^{Aa}	19.35 (0.53) ^{Aa}	16.20 (3.69) ^{Aa}	13.48(1.76) ^{Aa}
LDH (U/L)	+0d	1,594.0 (122.0) ^{Aa}	2,062.0 (106.0) ^{Aa}	1,581.9 (68.0) ^{Aa}	1,630.4(38.2) ^{Aa}
	+15d	1,653.7 (67.5) ^{Aa}	1,868.8 (30.2) ^{Aa}	1,927.0 (188.0) ^{Aa}	1,625.0(106.0) ^{Aa}
	+30d	1,727.0 (113.0) ^{Aa}	1,718.1 (26.0) ^{Aa}	1,532.0 (122.0) ^{Aa}	1,631.0(138.0) ^{Aa}
TP (g/dL)	+0d	7.69 (0.24) ^{Aa}	7.92 (0.18) ^{Aa}	8.26 (0.24) ^{Aa}	7.36 (0.23) ^{Aa}
	+15d	7.69 (0.21) ^{Aa}	8.10 (0.33) ^{Aa}	7.62 (0.33) ^{Aa}	6.32 (0.30) ^{Bb}
	+30d	6.19 (0.08) ^{Ab}	6.17 (0.19) ^{Ab}	6.24 (0.82) ^{Ab}	5.90 (0.27) ^{Ab}

38

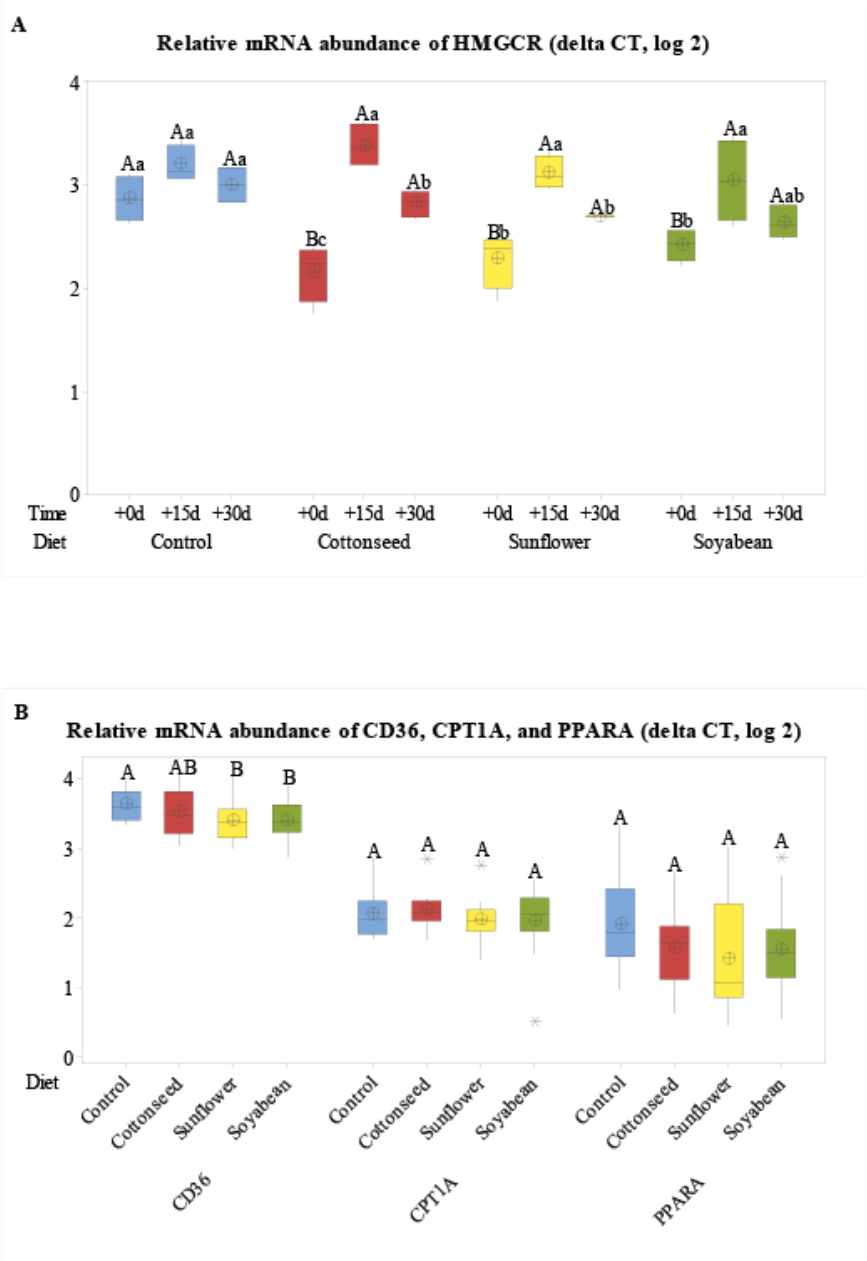
Urea (mg/dL)	+0d	25.85 (2.92) ^{Ab}	32.39 (5.29) ^{Ab}	28.84(3.58) ^{Ab}	24.64 (3.24) ^{Ab}
	+15d	27.15 (1.28) ^{Ab}	34.45 (3.45) ^{Ab}	30.91(4.17) ^{Ab}	31.73 (4.18) ^{Ab}
	+30d	32.74 (0.94) ^{Aa}	47.46 (2.25) ^{Aa}	38.11(2.76) ^{Aa}	38.05 (3.66) ^{Aa}

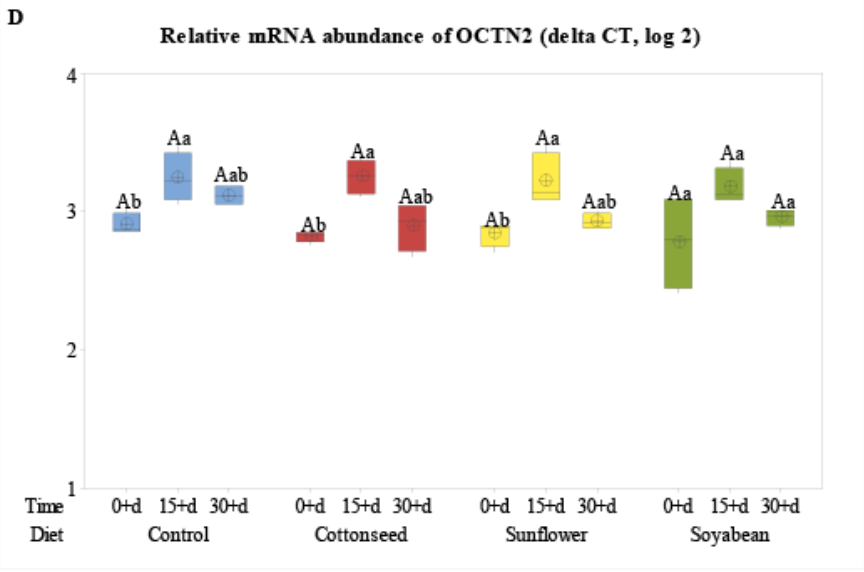
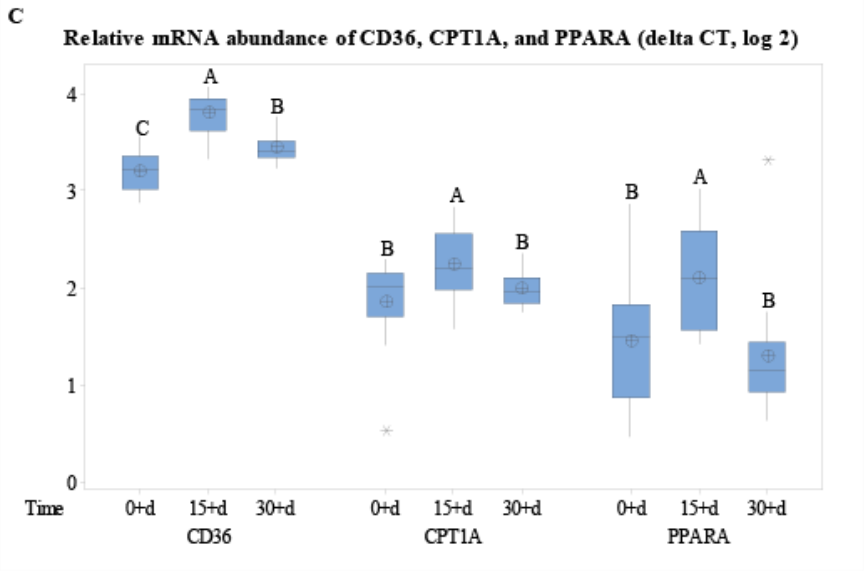
For aspartate aminotransferase (AST), creatinine, glucose, and γ -glutamyltransferase (GGT) concentrations, medians followed by minimum and maximum values; equal medians by the Kruskal-Wallis test ($P > 0.05$) are shown in the columns followed by lowercase letters, and medians followed by distinct uppercase letters, in rows, differ by Friedman's test ($P < 0.05$), with Dunn's post-test ($P < 0.05$). For lactate, lactate dehydrogenase (LDH), total protein (TP), and urea concentrations, means followed by standard error and distinct uppercase letters in columns and lowercase letters in rows differ by Tukey's test ($P < 0.05$).

39

Figure 1

[Click here to access/download;Figure;FIGURE_1.pdf](#)





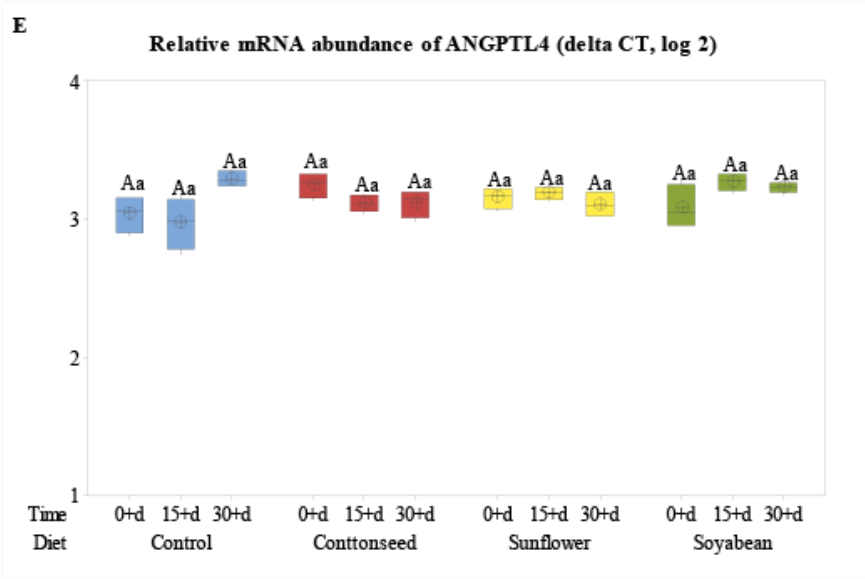
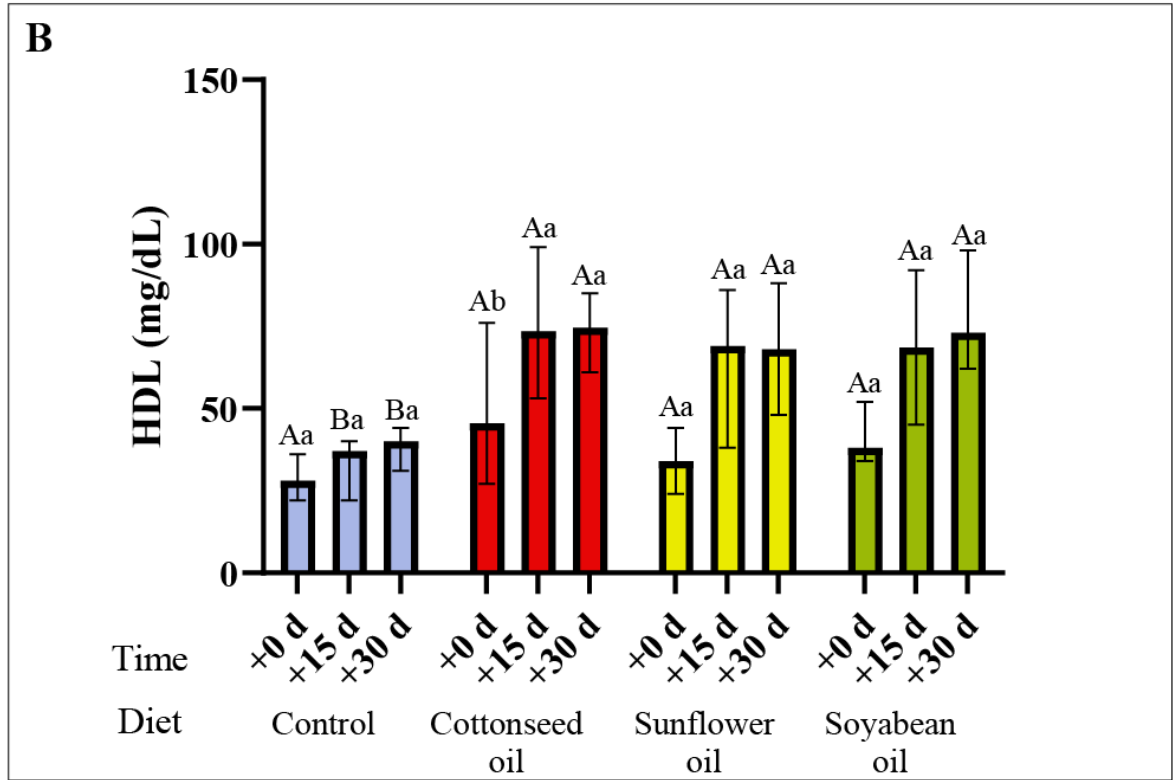
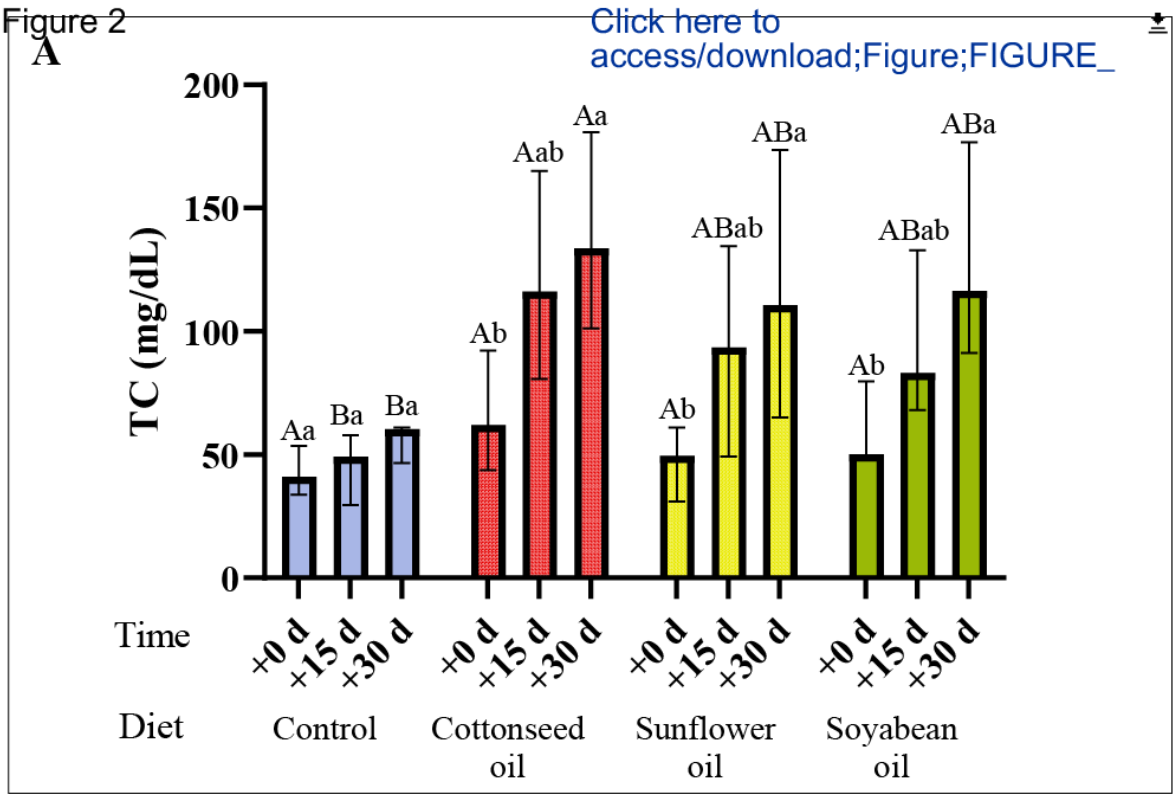
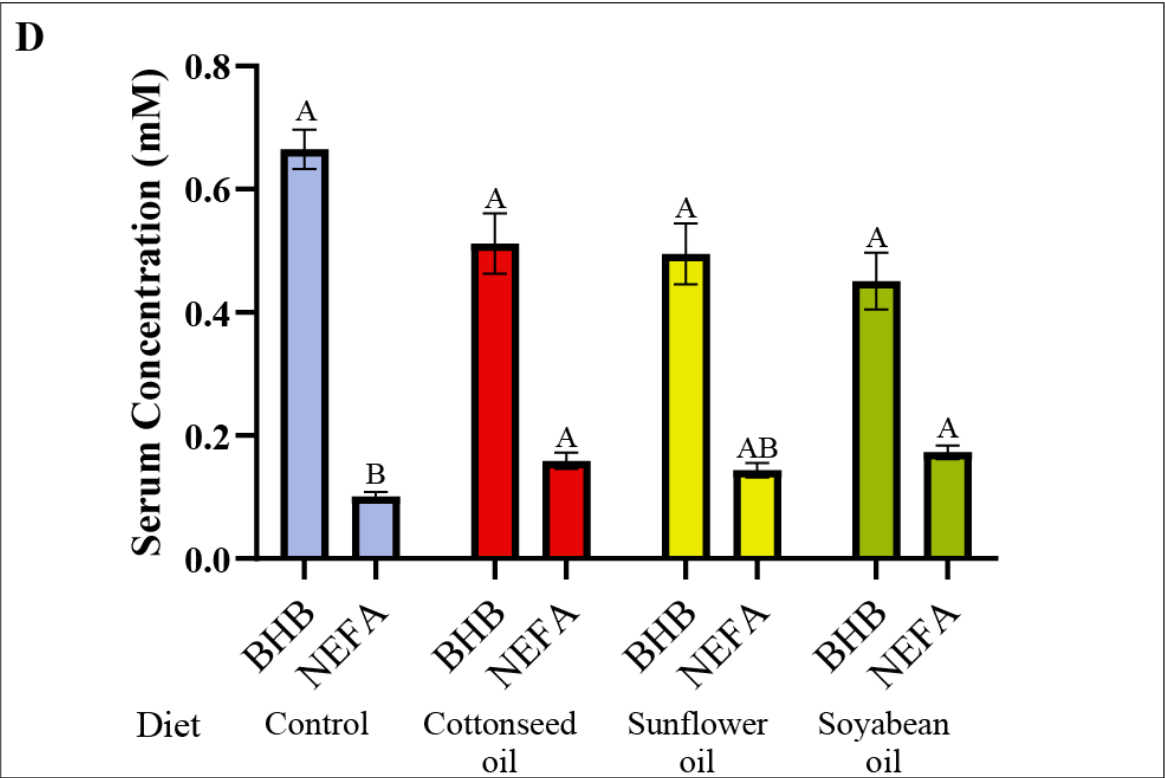
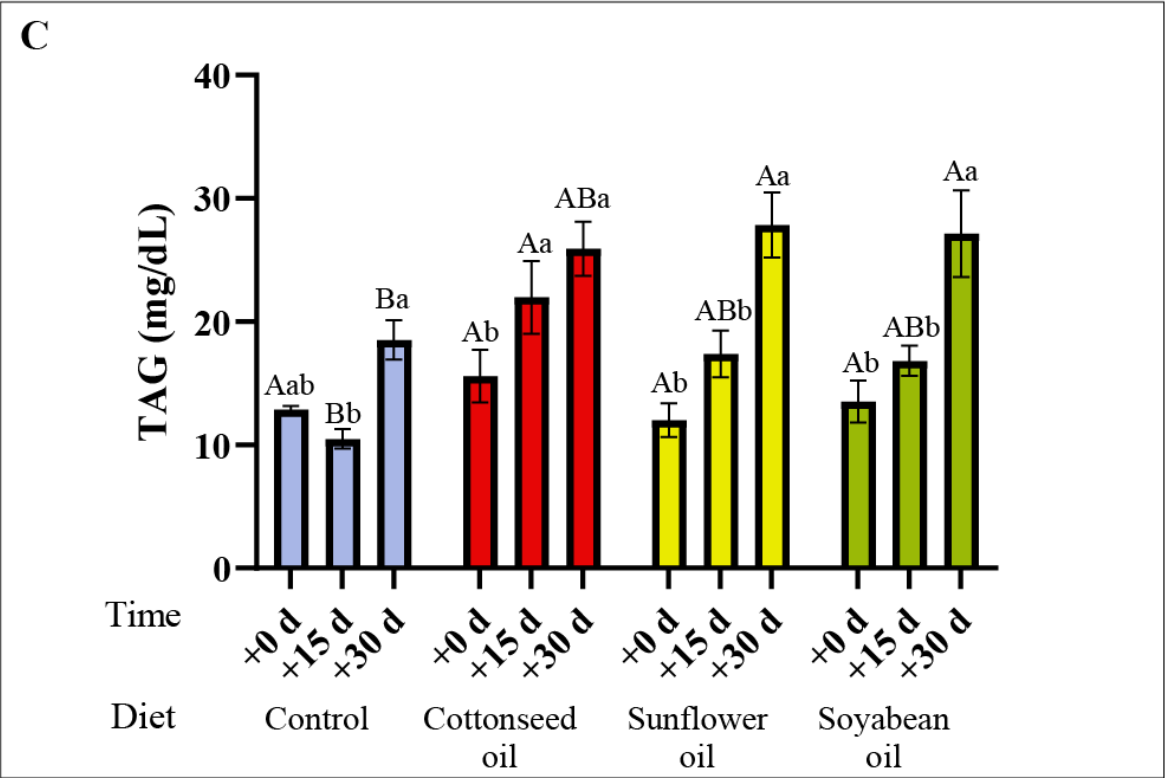
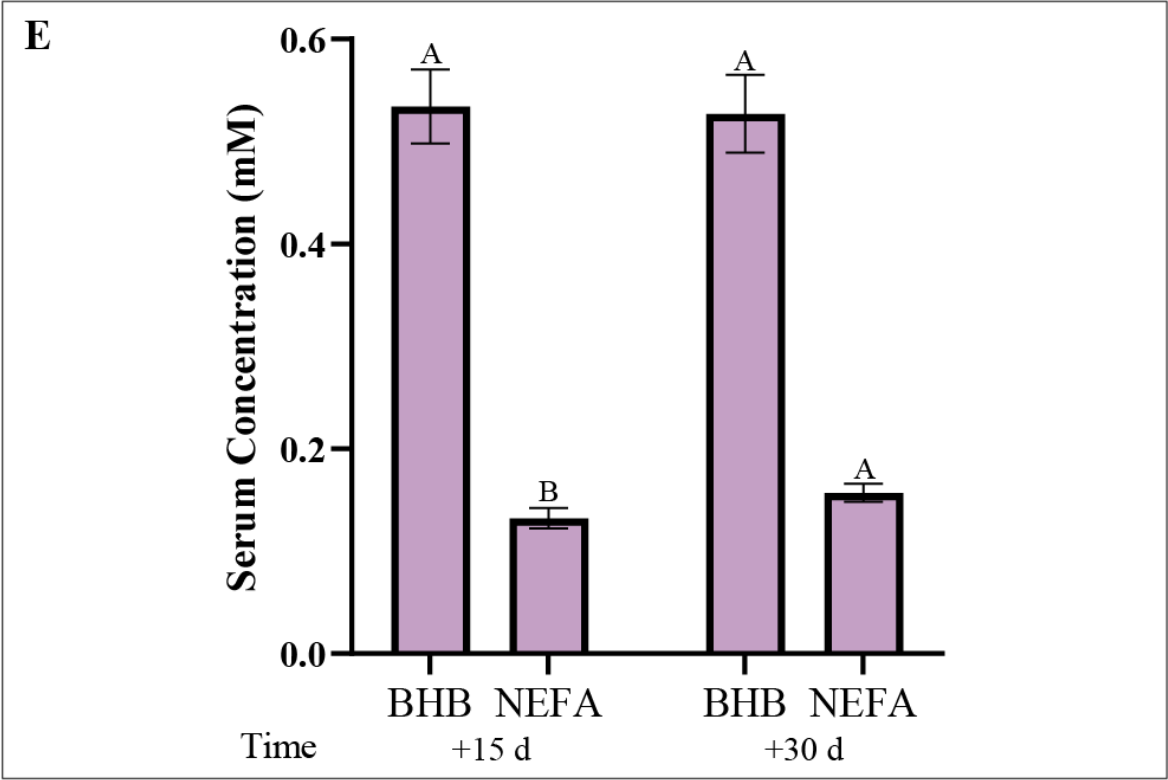


Figure 2







Declaration of Interest Statement

Declaration of interest

We declare that we do not have any competing interests to disclose.