

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado de Pós-Graduação em Zootecnia

**DESENVOLVIMENTO DA GLÂNDULA MAMÁRIA DE BEZERRAS MESTIÇAS
ALEITADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SÓLIDOS NA DIETA
LÍQUIDA**

PAMELA MICHÉLI FURINI

BELO HORIZONTE

2016

Pamela Michéli Furini

**DESENVOLVIMENTO DA GLÂNDULA MAMÁRIA DE BEZERRAS MESTIÇAS
ALEITADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SÓLIDOS NA DIETA
LÍQUIDA**

Dissertação apresentada ao Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Produção Animal

Orientadora: Prof^a. Sandra Gesteira Coelho

Coorientadores: Bruno Campos de Carvalho

Fernanda Samarini Machado

Belo Horizonte

Escola de Veterinária da UFMG

2016

Dissertação defendida e aprovada em 15 de fevereiro de 2016 pela comissão
examinadora constituída por:

Prof^a. Sandra Gesteira Coelho
Orientadora
(Escola de Veterinária da UFMG)

Prof. Álan Maia Borges
(Escola de Veterinária da UFMG)

Dr^a. Juliana Aparecida Mello Lima
(Embrapa Gado de Leite)

Mudaram as estações, nada mudou
Mas eu sei que alguma coisa aconteceu
Está tudo assim tão diferente

Se lembra quando a gente chegou um dia a acreditar
Que tudo era pra sempre
Sem saber
Que o pra sempre
Sempre acaba!

Mas nada vai conseguir mudar o que ficou
Quando penso em alguém
Só penso em você
E aí então estamos bem

Mesmo com tantos motivos pra deixar tudo como está
Nem desistir, nem tentar
Agora tanto faz
Estamos indo de volta pra casa

(Renato Russo)

AGRADECIMENTOS

“Que eu jamais me esqueça de que Deus me ama infinitamente, que um pequeno grão de alegria e esperança dentro de cada um é capaz de mudar e transformar qualquer coisa, pois... a vida é construída nos sonhos e concretizada no amor.”

Chico Xavier

... “Todo dia é um vai e vem à vida se repete na estação de trem”..., por isso Agradeço enormemente a força motriz do mundo (Deus), pela vida, pessoas que aqui encontrei e a oportunidade de aprender!

À minha família! Principalmente a minha mãe, muito obrigada mãe, pelo apoio, carinho, amor, compreensão, amizade, por sempre me incentivar na busca dos meus sonhos mesmo que não fossem os esperados por ti, e principalmente por me financiar neste período em Belo Horizonte, sei que não foi fácil, espero retribuir nos próximos anos...

Aos amigos de infância e de vida no Paraná e aos novos amigos mineiros, adorei o carinho e as pessoas aqui encontradas.

Aos professores de longa data e aos da UFMG, muito obrigada pelos ensinamentos e acolhimento.

À UFMG, por ter me proporcionado este título.

Aos companheiros de experimento, Rafael e Sâmara, muito obrigada pelo apoio, ajuda, companheirismo, amizade construída, por me aturarem, me colocarem em dieta de confinamento e fazer meus dias mais felizes! Por tudo isso é que eu ADORO vocês!

A Marlinda, pela experiência adquirada da “Arte da Convivência”.

Ao Gustavo (Gaúcho), por me suportar, pelo grande auxílio para a obtenção das imagens de ultrassom, sem o qual talvez não fosse possível a realização deste trabalho, pelos mates divididos e excelente exemplo profissional.

Aos demais pós-graduandos e amigos Embrapianos (André, Carlos, Clóvis e Luciano) que estavam na Embrapa Gado de Leite nesta época.

Às queridas Camila, Tássia, Brena, Bárbara, Carol! Muito obrigada por tudo, minha admiração e gratidão serão eternas!

A todos os residentes, em especial ao povo da “glândula mamária”, vocês foram peças fundamentais, sem a qual não conseguiria ter realizado este trabalho.

Aos estagiários que passaram durante o experimento sem vocês e a alegria de vocês, tudo teria sido muito mais difícil.

A todos os pesquisadores e analistas da Embrapa Gado de leite, pela oportunidade e auxílio, em especial ao meu coorientador Bruno Campos de Carvalho e minhas coorientadoras Fernanda e Mariana (emprestada! Heheh), porém o papel foi uma mera formalidade.

Aos funcionários do campo experimental Coronel Pacheco, minha imensa gratidão pela ajuda, carinho, amizade construída, exemplos de pessoas e vidas! Enfim dá nada não e se der dá pouca coisa, gerente Celinho, Seu Lado, Seu Chico, Verônica, Tiãozinho, Seu Lopes e demais colaboradores. Com certeza os nossos dias foram melhores com o carinho, café, pãozinho e as risadas de vocês.

Às gurias que dividiram comigo os dias bons e ruins, as glórias e as trevas. Obrigada por cuidarem de mim, pelo carinho e acolhimento Michelle, Cacilda e Tamara.

Ao seu João, pelo acolhimento, carinho, conversas, exemplo de pessoa e jovialidade muito obrigada!

Ao Prof. Alan, por ter aceitado o convite para compor a banca examinadora deste trabalho, pelas aulas, ensinamentos e a enorme contribuição a este trabalho, muito obrigada.

A Juliana Lima, agradeço sua participação no presente trabalho, por toda a ajuda durante o período UFMG, Embrapa, pela prestatividade sempre que solicitada, muito obrigada por tudo.

À professora, mestre e exemplo profissional Sandra Gesteira Coelho. Agradeço enormemente toda a paciência, confiança, dedicação, prestatividade, ensinamentos e os exemplos passados. Sou muito grata e honrada por ter aceitado o meu convite para ser sua orientanda.

Quero agradecer a todas as pessoas, mesmo não tendo citado todos os nomes, que fizeram e fazem a minha estação da vida ser mais divertida, com grandes experiências, aprendizados e ajuda para que a cada dia eu seja um pouco melhor do que fui no dia anterior.

Muito obrigada a todos!

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA

RESUMO.....	11
INTRODUÇÃO.....	13
REVISÃO DE LITERATURA.....	15
1.Desenvolvimento da Glândula Mamária.....	15
1.1 Desenvolvimento mamário fetal.....	15
1.2 Crescimento mamário do nascimento a puberdade.....	16
1.3 Regulação hormonal do crescimento mamário a puberdade.....	17
1.4 Plano nutricional na fase de aleitamento e sua influência na glândula mamária.....	18
1.5 Influência do plano nutricional do desaleitamento a puberdade na glândula mamária.....	19
1.6 Ganho de peso e impacto na glândula mamária.....	20
2. História da utilização do ultrassom na avaliação tecidual.....	22
3. Objetivo geral.....	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

CAPÍTULO II – Artigo

THE EFFECTS OF INCREASING AMOUNTS OF MILK REPLACER POWDER ADDED TO WHOLE MILK ON MAMMARY GLAND MEASUREMENTS USING ULTRASOUND IN DAIRY HEIFERS

ABSTRACT.....	33
INTRODUCTION.....	34
MATERIAL AND METHODS.....	35
RESULTS AND DISCUSSION.....	38
CONCLUSIONS.....	42
REFERENCES.....	43

LISTA DE TABELAS

Table 1. Nutrient composition (DM basis, % unless otherwise noted) of whole milk, milk replacer powder (MRP), starter, corn silage, and treatments.....	49
Table 2. Average body weight (kg), parenchyma area (mm ² /gland), circularity and average number of pixels from 5 ^a to 11 ^a wk of age in heifers (n = 60) fed different TS concentrations in whole milk during the preweaning period.....	51
Table 3. Interaction between treatment and week for parenchyma area (mm ²) in heifers (n = 60) fed different TS concentrations in whole milk during the preweaning period.....	52
Table 4. Interaction between mammary gland and week for parenchyma area (mm ² /gland) in heifers (n = 60) fed different TS concentrations in whole milk during the preweaning period.....	53
Table 5. Average palpation scores in heifers (n = 60) fed different TS concentrations in whole milk during the preweaning period.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figure 1. Circularity of mammary gland in heifers fed different TS concentrations (13.5, 16.1, 18.2, and 20.4%) in whole milk during the preweaning period. Error bars represent SE.....55

LISTA DE ABREVIATURAS

BMP = Bitmap

CM = Centímetro

EPGM = Escore de palpação da glândula mamária

EM = Energia metabolizável

G/ L = Grama/ Litro

GP = Ganho de peso corporal

HZ = Holandês zebuínos

IGF-1 = Fator de crescimento semelhante à insulina 1

IgG = Imunoglobulina G

MFP = “*Fat pad*” Mamário/ matriz adiposa

MHz = Mega-hertz

MM = Milímetro

MS = Matéria Seca

L = Litro

PAR = Parênquima mamário

PB = Proteína Bruta

PC = Peso Corporal

PM = Proteína Metabolizável

PN = Peso ao Nascimento

PT = Proteína Sérica Total

S = Sólidos

US = Ultrassom

LI = Leite Integral

RESUMO

Objetivou-se determinar o efeito do aumento de sólidos totais (TS) na dieta líquida, durante a fase de aleitamento, sobre o crescimento da glândula mamária de bezerras leiteiras. O aumento dos ST foi obtido com a adição de sucedâneo em pó ao leite integral. Bezerras mestiças Holandês x Gir (n = 60) foram distribuídas em quatro tratamentos, com diferentes concentrações de TS: 13.5% (n = 15); 16.1% (n = 15); 18.2% (n = 13) e 20.4% (n = 15). As dietas foram fornecidas até os 59 dias de idade, sendo todos animais desmamados aos 60 dias de idade. Dos 60 aos 69 dias os animais receberam o mesmo concentrado da fase de aleitamento e água. Aos 70 dias de idade silagem de milho foi adicionada a dieta. Avaliações da glândula mamária com uso de ultrassom, com transdutor micro-convexo frequência 6 MHz, foram realizadas semanalmente, entre a 5ª e 11ª semana de idade. As imagens foram obtidas com o animal em decúbito latero-lateral nos quartos anteriores e posteriores, em posição padronizada da probe com inclinação de 45° em relação à inserção do teto, sempre no sentido caudo-cranial, sendo salvas em formato BMP e transferidas para o programa ImageJ® para análises. Nessas mesmas semanas foi feito o escore de palpação da glândula mamária. O aumento da concentração de ST na dieta líquida durante a fase de aleitamento aumentou o BW das bezerras, porém não alterou o crescimento do parênquima mamário, e a deposição de tecido adiposo na glândula mamária avaliada por ultrassonografia. A forma circular do parênquima mamário foi alterada após os dois meses de idade. No período avaliado a glândula mamária apresentou crescimento isométrico em relação ao crescimento corporal das bezerras. O escore de palpação do parênquima mamário apresentou forte correlação com a avaliação ultrassonográfica do parênquima mamário.

Palavras-chave: *desenvolvimento, área de parênquima, escore de palpação*

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the effect of increasing total solids (TS) in liquid diet during preweaning phase on mammary gland development in dairy heifers. The increase in total solids (TS) was obtained with the addition of milk replacer powder to whole milk. Crossbreed Holstein-Gyr heifers (n = 60) were distributed in four treatments with different TS concentrations: 13.5% (n = 15); 16.1% (n = 15); 18.2% (n = 15) and 20.4% (n = 15). The liquid diets were provided from 5 to 55 d of age. From 56 to 59 d of age, the total amount of liquid feed was reduced by half, maintaining only morning feedings. Heifers were weaned at 60 d and monitored until 90 d of age. From 60 to 90 days old, the same concentrate of the preweaning period was supplied. Corn silage was added to the diet at 70 days of age. Ultrasound mammary gland evaluations were performed weekly between the wk 5 to 11 of age, using a B-mode ultrasound equipped with micro-convex transducer of 6 MHz frequency. The images were obtained from the front and rear quarters with the animal laid on lateral decubitus, with the probe in a standardized position with a 45° inclination in relation to the teat position, always in caudal-cranial direction. The images obtained were saved in BMP format and then transferred to the ImageJ® program for analysis. In those same weeks, the manual palpation of mammary parenchyma was performed. Increased TS concentration of liquid diet during the preweaning period increased BW of heifers, but did not alter mammary parenchyma growth and the deposition of adipose tissue in the mammary gland evaluated by ultrasonography. The oval-shaped structure of mammary parenchyma was altered after two months of age. In the evaluated period, mammary parenchyma growth was isometric with respect to the body growth rate. Palpation scoring of mammary parenchyma had a strong correlation with the ultrasound evaluation of the mammary parenchyma.

Key words: development, parenchymal area, palpation score

CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA

INTRODUÇÃO

Atualmente existem dois programas de aleitamento para bezerras leiteiras: o convencional e o intensivo. Os programas de aleitamento convencionais consistem no fornecimento restrito da dieta líquida, geralmente 10% do peso vivo do animal (Raeth-Knight et al., 2009). O desempenho e a eficiência alimentar nesse sistema estão frequentemente associados a resultados insatisfatórios (Khan et al., 2007). Nos programas intensivos de aleitamento as bezerras recebem maior volume de leite ou sucedâneo (Jasper e Weary, 2002; Silper et al., 2014), ou maiores quantidades de sólidos (S) por litro de dieta líquida oferecida, com teores de sólidos variando entre 12,5 a 17,5% (Cowles et al., 2006).

Segundo Sejrsen e Purup (1997) e Radcliff et al. (2000) os programas aceleradores de crescimento utilizados após o desaleitamento geram prejuízos ao crescimento da glândula mamária e, conseqüentemente, menor produção de leite na primeira lactação. Em contrapartida outros autores não relataram influência da taxa de ganho de peso sobre o crescimento mamário quando se fornece dieta com adequado balanço entre energia e proteína às bezerras (Capuco et al., 1995; Dobos et al., 2000; Whitlock et al., 2002 e Albino et al., 2015).

Os possíveis prejuízos do alto ganho de peso no pós-aleitamento são controversos. Por outro lado, maximizar a taxa de crescimento antes do desaleitamento parece trazer efeitos positivos sobre o crescimento da glândula mamária, já que o aumento no fornecimento de nutrientes nessa idade quase dobrou a massa de parênquima mamário (Brown et al., 2005b), indicando que rápido crescimento até o desaleitamento, não é prejudicial ao desenvolvimento da glândula mamária.

Porém, para confirmar esses efeitos, avaliações do crescimento da glândula mamária e da produção de leite na primeira lactação devem ser realizadas. Os trabalhos para avaliação da glândula mamária utilizavam o abate dos animais para acessar a glândula mamária ou utilizavam biópsias mamárias, para a quantificação de parênquima (PAR), *mamary fat pad* (MFP), DNA e RNA (Sorensen et al., 2006). Essas técnicas são trabalhosas e de custos elevados, limitando-se às pesquisas. Trabalhos atuais vêm buscando métodos alternativos e não invasivos que reduzam o tempo e custo dessas análises. Como exemplo, cita-se o ultrassom, que é utilizado na avaliação da deposição de gordura em carcaças e para avaliar características da glândula mamária, como área de PAR e lesões da glândula mamária

(Williams, 2002, Polák et al., 2008; Nishimura et al., 2011; Albino, 2013; Esselburn et al., 2015).

Segundo Lima (2011), o gado Girolando apresenta peculiaridades quanto à fisiologia da lactação, com destaque para o formato da curva de lactação, quando comparada a raças especializadas, destacando a raça Holandês. Segundo Teixeira (1984), a composição corporal pode ser afetada pela composição genética, sexo, alimentação e taxa de crescimento, além do peso corporal (PC) e da taxa de ganho de peso (GP) (Fox e Black, 1984).

Devido ao pequeno número de trabalhos realizados com a utilização de técnicas repetidas no mesmo animal, juntamente com as diferenças que o animal mestiço apresenta em sua fisiologia e composição corporal, objetivou-se avaliar o crescimento do parênquima mamário de bezerras leiteiras mestiças (HZ), com uso de ultrassom, da quinta a décima primeira semana de vida, em resposta ao aumento dos teores de sólidos na dieta líquida.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Desenvolvimento da Glândula Mamária

A glândula mamária é um órgão dinâmico que é submetido a várias mudanças morfofuncionais, com padrão cíclico ao longo do desenvolvimento da fêmea, iniciando seu desenvolvimento na vida embrionária. Logo após o nascimento ocorrem alterações no desenvolvimento que se estendem até pós-lactação, sendo o tecido secretor formado no início da vida relacionado à capacidade de produção futura dos animais (Boesche, 2011).

O maior crescimento mamário ocorre após o nascimento. Em vacas leiteiras a massa de parênquima mamário aumenta aproximadamente 11.000 vezes do nascimento a lactação (pesa menos que 0,5 g ao nascimento e em média de 5,5 kg durante a lactação). O epitélio mamário diferencia-se a partir de uma rede primitiva de ductos a uma rede lóbulo-alveolar que é capaz de sintetizar grande quantidade de leite (Capuco e Akers, 2010).

Os processos de desenvolvimento e crescimento são hormonalmente regulados, mas também envolvem grande interação de diferentes tipos de células, por exemplo, estromais, epiteliais, células mioepiteliais, células tronco e células progenitoras, e são regulados por fatores locais parácrinos e autócrinos. Porém, adequada ingestão de nutrientes e o equilíbrio entre os nutrientes é importante para o desenvolvimento e crescimento mamário, e estes processos podem ser influenciados por excesso ou restrição nutricional dos animais. Devido a interações do ambiente com o sistema endócrino, o desenvolvimento mamário e a diferenciação podem ser influenciados por fatores adicionais, tais como substâncias bioativas em alimentos e pelo fotoperíodo (Capuco e Akers, 2010).

As fases cíclicas de crescimento e involução são dissociadas e o parênquima mamário sofre crescimento alveolar, diferenciação funcional, regressão e reconstrução na vaca em lactação (Capuco e Ellis, 2013). As fases importantes da vida relacionadas com o desenvolvimento e crescimento da glândula mamária em vacas leiteiras de origem europeia podem ser descritas como: fetal, aleitamento (0-2 meses), pré-puberal (2-9 meses), peripuberais (a partir dos 9 meses até a concepção, próximo dos 15 meses de idade), gestação, e lactação (Esselburn, 2012).

1.1 Desenvolvimento mamário fetal

Comparando o desenvolvimento mamário de vários mamíferos, tem-se a ideia de que a glândula mamária surgiu a partir de glândulas sebáceas ou sudoríparas. Os primeiros anatomistas tentaram definir a origem da glândula mamária ao classificar o mecanismo de

secreção das células alveolares. Glândulas sebáceas exibem modo de secreção do tipo holócrina, na qual a célula secreta o produto e também é um produto da secreção, já na secreção merócrina, as células não apresentam perda celular (Ofstedal, 2002). As células mamárias secretoras utilizam ambos os modos de secreção (Capuco e Akers, 2010).

Os primeiros sinais de desenvolvimento mamário aparecem como um suave espessamento do ectoderma ventro-lateral no embrião, quando os membros começam a alongar. Estas áreas de espessamento são conhecidas como banda, faixa, e linha mamária. O epitélio mamário surge a partir do ectoderma germinal e das papilas mamárias primitivas. Nos bovinos o botão mamário aparece aproximadamente aos 40 dias de idade gestacional, aos 80 dias surge o teto e a primeira canalização, que forma a cisterna do teto. Em torno dos 90-100 dias aparece o canal secundário e ao nascimento estão formados o teto, a cisterna do teto e cisterna da glândula (Capuco e Akers, 2010).

O controle hormonal do desenvolvimento fetal é pouco conhecido. Em geral parece haver baixa exigência hormonal para o desenvolvimento mamário, porém com a participação de fatores de crescimento (Tucker, 2000).

1.2 Crescimento mamário do nascimento a puberdade

Ao nascimento, o parênquima mamário bovino é constituído por uma rede de ductos rudimentares conectados a uma pequena cavidade da cisterna da glândula que se conecta a cisterna do teto e, finalmente, comunica com o canal do teto (Capuco et al., 2002). O tecido secretor e os ductos presentes na glândula mamária formam o parênquima mamário, e o estroma é constituído pelo tecido conectivo e a *fat pad* (matriz adiposa) que dão suporte ao parênquima (Capuco e Akers, 2010).

Antes da puberdade, a glândula mamária passa por duas fases distintas de crescimento. Do nascimento até mais ou menos três meses de idade, ela se desenvolve de forma isométrica, ou seja, em taxas semelhantes ao desenvolvimento corporal (1,5 %) (Meyer et al., 2006a). Entre o segundo e terceiro meses de idade, período em que normalmente as bezerras são desaleitadas, até a puberdade, o crescimento mamário passa a ser mais rápido (3,6%) em relação ao crescimento do corpo, denominado alométrico (Lohakare et al., 2012).

A quantidade de PAR sofre alterações ao longo da vida da bezerra. Meyer et al. (2006b) encontraram, em bezerras recém nascidas com 46 kg de peso vivo, quantidades insignificantes de parênquima mamário e, aos 30 dias de idade, ainda é difícil localizar o parênquima mamário por meio de palpação no úbere em desenvolvimento (Filep e Akers., 2000), porém é possível visualizá-lo utilizando ultrassom (Esselburn et al., 2015). Já, Brown et al. (2005a)

citam que bezerras com oito semanas de idade tem quantidade de parênquima mamário de 1,2- 4,5 g, dependendo da dieta. Meyer et al. (2006b) relataram em bezerras aos 100 kg de peso vivo, peso de parênquima mamário variando de 17-30 g, dependendo da dieta.

Segundo Meyer et al. (2006b), o desenvolvimento mamário na pré-puberdade consiste no alongamento e ramificação dos ductos mamários no parênquima, já as extensas ramificações, o alongamento e, finalmente o aparecimento de células alveolares secretoras, irão ocorrer somente após a concepção, sob a ação dos hormônios ligados à gestação.

1.3 Regulação Hormonal do Crescimento Mamário até a puberdade

A regulação do desenvolvimento mamário pré-puberal é dependente de hormônios e fatores de crescimento, de natureza sistêmica e parácrina. As primeiras pesquisas indicaram que o crescimento mamário durante o período pré-puberal é influenciado principalmente pelo estrógeno e hormônio do crescimento (GH) (Akers, 2006).

Para o crescimento mamário pré-puberal em novilhas é necessário a secreção de estrógeno, principalmente de origem ovariana. A ovariectomia em bezerras interrompe o desenvolvimento mamário, mas a aplicação de estrógeno pode restaurar o crescimento (Berry et al., 2003). O estrógeno é conhecido por induzir proliferação em células epiteliais, enquanto a progesterona aumenta a proliferação somente na presença de estrógeno, não induzindo proliferação diretamente; novilhas pré-púberes somente com o tratamento de progesterona não apresentaram resposta proliferativa, porém isto não significa que a progesterona seja um hormônio desnecessário, ela estimula o desenvolvimento lóbulo-alveolar durante a gestação (Tucker, 2013).

Em ratos e camundongos o GH é essencial para o crescimento de ductos mamários, juntamente com o estrógeno e os glicocorticoides da adrenal (Kleinberg, 1997). Em ruminantes o GH apresenta similar importância devido ao fato da aplicação exógena de GH estimular o crescimento da glândula mamária em bezerras pré-púberes e ovelhas (Purup et al., 1993; Radcliff et al., 2004). Os efeitos do GH na glândula mamária são mediados principalmente pelo fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) (Radcliff et al., 2004; Capuco e Akers, 2010). Em várias espécies o IGF-1 apresenta efeito mitogênico na glândula mamária (Akers et al., 2000). As funções reguladas pelo IGF-1 são moduladas pela produção local de proteínas ligadoras de IGF-1, sendo conhecidas seis proteínas ligantes de alta afinidade IGFBP 1-6 (Capuco e Akers, 2010).

1.4 Plano nutricional na fase de aleitamento e sua influência na glândula mamária

Na literatura há trabalhos que avaliam de diferentes formas, o efeito da dieta sobre o desenvolvimento da glândula mamária. Estes se baseiam em eventos epigenéticos, histologia mamária, parâmetros de desenvolvimento corporal e taxa de desempenho. Eventos epigenéticos podem ocorrer durante o período pré-desaleitamento, que alteram o potencial de produção de leite das bezerras, associada à maior ingestão de nutrientes pela dieta líquida fornecida as bezerras (Soberon et al., 2012). Segundo Drackley (2005), Glosson et al. (2015) e Kiezebrink et al. (2015) para melhor entendimento dos programas de aleitamento intensivos e o seu impacto sobre a criação de bezerras e novilhas, é necessário que o crescimento adicional e as medidas de desenvolvimento, tais como as diferenças no pós-aleitamento, idade ao primeiro parto, produção e a longevidade dos animais, sejam pesquisados. Ao longo dos anos, vários estudos têm investigado os mecanismos de controle da disponibilidade e metabolismo de nutrientes na glândula mamária, e como alterações na dieta podem influenciar esses processos (Baldi et al., 2007). Mas pouco se sabe sobre o efeito da taxa de ganho ou componentes alimentares específicos no desenvolvimento mamário em bezerras antes do desaleitamento com subsequente desempenho na lactação (Daniels, 2008).

Dietas para promover ganho de peso (GP) elevado para bezerras, entre dois a 11 meses de idade, estão correlacionadas negativamente com o desenvolvimento mamário e produção de leite futura (Silva et al., 2008). Este período é conhecido como "janela crítica", e altas taxas de GP (> 700 g em bovinos da raça Holandês) levaram a maior deposição de tecido adiposo na glândula mamária (Daniels, 2004).

Com o objetivo de estudar o impacto da ingestão elevada de nutrientes no desenvolvimento mamário de bezerras Holandês, em vários momentos entre o nascimento e a puberdade, Meyer et al. (2006b) distribuíram 78 fêmeas em dois planos nutricionais: elevado ganho 950 g/d ou ganho restrito 650 g/d. Os animais foram abatidos em diferentes tempos, levando em consideração o peso corporal (PC) dos mesmos. E para relacionar o efeito da dieta sobre o desenvolvimento da glândula mamária, o intervalo de abate foi de 50 kg, com 100 kg sendo o tempo 1 e 350 kg o tempo final. Segundo os autores, ao incluir a idade do animal no momento do abate como covariável nas análises estatísticas, não foram encontradas diferenças entre os tratamentos nos diferentes pesos de abate para as variáveis de peso mamário, quantidade de DNA e composição de parênquima e *fat pad*. Com isso concluíram que a matriz adiposa é diretamente afetada pela ingestão elevada de nutrientes, porém, isto não ocorre no parênquima mamário, no desenvolvimento de estruturas epiteliais ou na habilidade destes para deslocar adipócitos durante a invasão na *fat pad*.

Daniels et al. (2009), seguindo a metodologia de Meyer et al. (2006b), forneceram quantidades variáveis da mesma dieta, com taxas de ganho de 650 ou 950 g/d e abate das fêmeas com peso entre 100 e 350 kg, e não encontraram diferenças na composição do parênquima mamário, no padrão de desenvolvimento do parênquima mamário ou dos ductos em resposta aos tratamentos.

1.5 Influência do plano nutricional do desaleitamento até a puberdade no desenvolvimento da glândula mamária

A puberdade em novilhas de raças de grande porte ocorre normalmente entre os nove e 11 meses de idade, com média de PC de 250 a 280 kg, sendo a puberdade dependente mais do PC do que a idade dos animais (Macdonald et al., 2005).

Os programas intensivos de nutrição, da desmama até a puberdade, proporcionam maior GP, permitindo que os animais alcancem o PC ideal para entrarem na puberdade mais cedo, podendo reduzir o crescimento mamário e comprometendo o potencial de produção de leite futura (Sejrsen et al., 2000), caso o crescimento proporcione aumento da deposição de gordura na glândula mamária das bezerras.

Meyer et al. (2006a e b), trabalhando com novilhas abatidas entre 100 e 350 kg, com taxas de ganho de 650 ou 950 g/d e alimentadas com quantidades variáveis da mesma dieta, não verificaram efeito da taxa de ganho sobre a composição bioquímica e outras medidas do crescimento do parênquima mamário das novilhas. Segundo os autores, ganhos de 950 g por dia não causaram efeitos biológicos prejudiciais e nem vantajosos para a criação de novilhas leiteiras.

Daniels et al. (2009), avaliando os mesmos animais de Meyer et al. (2006), verificaram que as diferentes composições da área de parênquima não diferiram entre os pesos de abate e nem entre as taxas de GP. Entretanto, segundo os autores, a área ocupada pelo estroma intralobular foi inferior nos animais abatidos com 100 e 150 kg em comparação com novilhas mais pesadas, sem ser afetado pelos programas nutricionais, demonstrando que planos de crescimento acelerado não causam efeito sobre as características dos tecidos ou da complexidade do desenvolvimento do parênquima mamário.

Brown et al. (2005b) avaliaram o impacto da nutrição durante oito a 14 semanas de idade e observaram que o aumento nutricional nessa fase de vida não influenciou o crescimento do parênquima mamário, entretanto, proporcionou maior deposição de gordura dentro do parênquima. Segundo Silva et al. (2002b), dentro de um mesmo tratamento dietético oferecido a bezerras durante a pré-puberdade, aquelas que cresceram mais rapidamente não

apresentaram desenvolvimento mamário prejudicado. Entretanto, aquelas que ganharam maiores proporções de gordura corporal, cresceram mais lentamente e tiveram menor parênquima mamário à puberdade, demonstrando que o aumento da gordura corporal pode ser melhor indicador do efeito da nutrição sobre o desenvolvimento mamário do que o ganho de peso corporal.

Radcliff et al. (2000) relataram que novilhas alimentadas com dietas para ganhos superiores a 1 kg/d apresentaram redução na idade ao primeiro parto, e a produção de leite na primeira lactação foi comprometida. Os efeitos negativos de programas de crescimento acelerado sobre o desenvolvimento da glândula mamária reportados até hoje, durante a pré-puberdade de novilhas, muitas vezes podem ter ocorrido em experimentos que adotaram diferentes alimentos ou realizaram comparações entre novilhas de diferentes idades e, portanto, diferentes estágios de desenvolvimento mamário (Daniels et al., 2009; Lohakare et al., 2012). É importante reconhecer que há probabilidade de efeitos nutricionais afetarem drasticamente o desenvolvimento mamário, que poderia interagir de forma inesperada com outros fatores de desenvolvimento corporal dos animais (Daniels et al., 2009).

1.6 Ganho de Peso e impacto na Glândula Mamária

Durante anos de pesquisas sobre o impacto dos programas de alimentação no desenvolvimento e produção futura da glândula mamária de novilhas leiteiras, algumas hipóteses surgiram. Acreditava-se que quando o crescimento das novilhas era acelerado, com altas taxas de GP, ocorria deposição de tecido adiposo na glândula mamária em detrimento ao desenvolvimento do parênquima.

Segundo Daniels et al. (2009), este aumento de tecido adiposo no parênquima mamário foi relacionado com redução do epitélio, mas os dados sugerem que não ocorrem efeitos inibitórios sobre os ductos primários, e sim sobre a extensão das ramificações dos ductos, podendo influenciar a produção futura do animal.

A composição da dieta, independente da taxa de GP, pode influenciar a deposição de gordura (Capuco et al. 1995). Dietas que afetam a secreção de hormônios mamogênicos (GH ou estrógeno), a expressão local do tecido mamário aos hormônios mamogênicos ou os fatores de crescimento e os seus receptores, possivelmente irão alterar o desenvolvimento mamário (Daniels et al. 2009). Assim, tratamentos dietéticos que influenciam a função ovariana ou hipofisária são susceptíveis de afetarem o desenvolvimento mamário.

Segundo Meyer et al. (2006b), o desenvolvimento do parênquima mamário será alterado se o período de pré-puberdade for reduzido devido aos programas acelerados de crescimento.

Entretanto, a capacidade da glândula mamária em produzir leite irá depender do número de células epiteliais, que são influenciadas pela genética, taxa de proliferação e apoptose (Capuco et al., 2003), e pelo efeito de diferenciações sobre a atividade secretória das células epiteliais (Akers et al., 2006), e não pelo tamanho do parênquima mamário que, embora possa ser reduzido, não necessariamente resultaria em menor produção (Macdonald et al., 2005).

Hipóteses do ponto de vista endócrino também foram propostas. Uma seria relacionada ao GH, IGF-1 e ao estrógeno, necessários para o desenvolvimento mamário, que seriam reduzidos em situações de altas taxas de GP (Knight e Sorensen, 2001), ocasionando redução da proliferação celular. Entretanto, o GH é mediado pelo IGF-1 e, segundo Brown et al. (2005a), planos nutricionais altos aumentam a concentração de IGF-1, que é um fator de crescimento que estimula a proliferação de epitélio celular mamário em bezerras na pré-puberdade (Silva et al., 2005).

A leptina foi outro hormônio relacionado ao efeito de crescimentos acelerados no aleitamento e pós desaleitamento, sobre a produção de leite futura destes animais. A elevada ingestão de nutrientes aumenta a concentração desse hormônio no tecido mamário (Thorn et al., 2006) e, segundo Silva et al. (2008), infusões de leptina intramamária bloquearam a proliferação celular na glândula durante a pré-puberdade de fêmeas bovinas. Por outro lado, Meyer et al. (2006a) sugerem que aumentos induzidos de leptina plasmática, em consequência do aumento nutricional da dieta, parecem não ter tal atividade de redução da proliferação celular da glândula mamária, e Thorn et al. (2006) demonstraram que a leptina não retarda a proliferação das células epiteliais mamárias bovinas, diferente ao verificado por Silva et al. (2002a), em experimento *in vitro*, e por Silva et al. (2008) em experimento *in vivo*.

A produção de leite é baixa em animais muito jovens e que tiveram altas taxas de GP (Little e Kay 1977; Park et al., 1998). Outros estudos indicam que as altas taxas de GP antes da puberdade são prejudiciais ao desenvolvimento da glândula mamária e, conseqüentemente, a produção de leite, porém isto não ocorre para taxas de GP elevadas após a puberdade (Sejrsen, 1978; Sejrsen et al. 1982). Este período crítico coincide com a fase de crescimento alométrico da glândula mamária (Daniels et al. 2009; Capuco e Akers, 2010).

Na avaliação de hormônios relacionados ao desenvolvimento da glândula mamária em novilhas criadas com dietas para altos ganhos, Sejrsen et al. (1982) encontraram, no soro sanguíneo reduzidas concentrações de GH e elevadas concentrações de leptina. Em roedores, GH é requerido para crescimento de ductos, e em bovinos, a administração de GH aumenta a quantidade de parênquima mamário (Sejrsen et al. 1986; Radcliff et al. 2004) todavia, a

infusão intramamária de leptina bloqueia a proliferação de células epiteliais mamárias de bovinos pré-puberais (Silva et al. 2003).

2. História da utilização do ultrassom na avaliação tecidual

Os físicos franceses Pierre e Jacques Curie, em 1880, descobriram o efeito piezoelétrico. Já o físico francês Paul Langevin tentou desenvolver materiais piezoelétricos de alta frequência como emissores e receptores de distúrbios mecânicos (ondas ultrassom) através dos materiais. Sua aplicação específica foi o uso do ultrassom para detectar submarinos durante a Primeira Guerra Mundial. Esta técnica de navegação e de som variando (sonar) finalmente se tornou prática durante a Segunda Guerra Mundial (Hendee e Ritenour, 2003).

Em 1928, com a sugestão do físico soviético Sokolov, o ultrassom começou a ser utilizado para detectar falhas escondidas em materiais industriais. Na medicina, o uso do ultrassom data da década de 30 como início, onde foi utilizado em aplicações terapêuticas, tais como tratamentos de câncer e terapia física para várias doenças. Já, sua aplicação como diagnóstico começou no final dos anos 1940, por meio da colaboração entre médicos e engenheiros familiarizados com o SONAR (Hendee e Ritenour, 2003).

Hendee e Ritenour (2003) citam que a frequência sonora que é audível para o ouvido humano, é uma onda entre cerca de 20 e 20.000 Hz. Já ondas infrassônicas, ou seja, abaixo de 20 Hz não são audíveis para o ouvido humano. O ultrassom para diagnóstico clínico trabalha com ondas de frequências entre 1 e 20 MHz. A maioria das aplicações de diagnóstico por meio de ultrassom é feito a partir do uso de ondas ultrassonográficas refletindo a composição da interface entre diferentes tecidos avaliados.

Probes de ultrassom são equipadas com transdutores de frequências diferentes. As frequências mais comumente usadas em reprodução bovina são de 3,5; 5,0 e 7,5 MHz. Quanto maior a frequência das ondas sonoras transmitidas, melhor a resolução da imagem, mas com menor poder de penetração, estas são usadas para obter detalhes de estruturas, como por exemplo, folículo ovariano e parênquima mamário (Ribadu e Nakau, 1999; Nishimura et al. 2011; Albino et al. 2015; Esselburn, et al. 2015).

Com o ultrassom é possível à visualização, em tempo real, de vários tecidos. Glândulas mamárias acometidas com mastite já foram identificadas com o uso de ultrassom em vacas (Flöck e Winter, 2006; Abbey, 2009), ovelhas (Franz et al. 2003), porcas (Baer e Bilkei, 2005) e em cadelas (Trasch et al. 2007). Também tem sido utilizado para avaliar a composição de carcaça em bovinos (Polák et al. 2008), suínos (Youssao et al. 2002) e ovelhas (Leeds et al. 2008). Particularmente em vacas leiteiras, tetos e parênquima mamário foram

examinados através de ultrassonografia, tanto em animais saudáveis (Franz et al. 2001; Klein et al. 2005; Franz et al. 2009; Nishimura et al. 2011; Albino et al. 2015; Esselburn et al. 2015) como em casos de doenças (Flöck e Winter, 2006; Franz et al. 2009).

A análise de imagem por computador é baseada na digitalização da imagem, ou seja, a imagem é transformada em um conjunto de pontos (pixels) que são identificados pelo software, de acordo com suas coordenadas e limiar. A área analisada em uma imagem de ultrassom apresenta o valor médio de limiar de todos os pontos que formam o local/estrutura avaliado com o US, o valor determinado nesta área é apresentado como valor de cinza ou grau de *greyness*. Com variação de 0 a 255 graus da cor cinza; 0 representando 100% coloração preta e 255 representa 100% de cor branca da imagem. A amplitude dos pixels pode ser definida como ecogenicidade, ou seja, é o quanto uma estrutura retém a onda do ultrassom. Estruturas que tem alto poder de refletir as ondas sonoras (tecido adiposo) são definidas como hiperecóticas e, portanto, apresentam maiores valores de pixels. Já as imagens com baixa capacidade de reflexão, são denominadas como hipoecóticas e tem os menores valores de pixels (Polák et al. 2008).

Na ultrassonografia do músculo *longíssimus dorsi* (MLD) e da glândula mamária, cor preta (hipoecótica) representa substância muscular e parênquima, e cor branca (hiperecótica) representa a gordura intramuscular, gordura subcutânea, matriz adiposa, ossos e vasos capilares (Polák et al. 2008; Esselburn et al. 2015). Líquidos não refletem ondas sonoras (e são não ecogênicos ou anecóticos) e são representados na tela de visualização como preto (Ribadu e Nakau, 1999).

3. OBJETIVO GERAL

Esta pesquisa teve como objetivo geral avaliar o crescimento do parênquima mamário de bezerras leiteiras mestiças (HZ) em resposta ao aumento dos teores de sólidos na dieta líquida, com adição de sucedâneo em pó, fornecido durante os primeiros 60 dias de idade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBEY, M. S. Mammary gland: ultrasound. pp. 516–519. *In*: Blackwell's Five-Minute Veterinary Consult: Ruminant (Haskell, S. R. ed.), Blackwell, Iowa, 2009.

AKERS, R. M., MCFADDEN, T. B., PURUP, S. et al. Local IGF-I axis in peripubertal ruminant mammary development. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. v. 5, p. 43–51, 2000.

AKERS, R.M.; CAPUCO, A.V.; KEYS, J.E. Mammary histology and alveolar cell differentiation during late gestation and early lactation in mammary tissue of beef and dairy heifers. *Livest. Sci*, v.105, n.1, p.44-49, 2006.

ALBINO, R.L. *Consumo, desempenho e desenvolvimento da glândula mamária de novilhas holandesas submetidas a diferentes relações proteína metabolizável: energia metabolizável dietética*. 2013. 36 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

ALBINO, R.L.; MARCONDES, M.I.; AKERS, R.M.; et al. Mammary gland development of dairy heifers fed diets containing increasing levels of metabolisable protein: metabolisable energy. *J. Dairy Res.*, v. 82, p. 113–120, 2015.

BAER, C. AND BILKEI, G. Ultrasonographic and gross pathological findings in the mammary glands of weaned sows having suffered recidiving mastitis metritisagalactia. *Reprod. Domest. Anim.*, v. 40, p. 544–547, 2005.

BALDI, A.; CHELI, F.; PINOTTI, L. et al.; Nutrition in mammary gland health and lactation: Advances over eight biology of lactation in farm animals meetings. *J. Anim Sci* 2008, v.86, p.3-9, 2007.

BERRY, S. D. K.; JOBST, P. M.; ELLIS, S. E. et al. Mammary Epithelial Proliferation and Estrogen Receptor α Expression in Prepubertal Heifers: Effects of Ovariectomy and Growth Hormone. *J. Dairy Sci*. v. 86, p. 2098–2105, 2003.

BOESCHE, K. E. *Unique aspects of mammary growth and development in dairy heifers and ewe lambs*. 2011. 72 f. Thesis (Graduate Program in Animal Sciences) The Ohio State University, Ohio.

BROWN, E.G.; VANDEHAAR, M.J.; DANIELS, K.M. et al. Effect of increasing energy and protein intake on body growth and carcass composition of heifer calves. *J. Dairy Sci*, v.88, n.2, p.585-594, 2005a.

BROWN, E.G.; VANDEHAAR, M.J.; DANIELS, K.M. et al. Effect of increasing energy and protein intake on mammary development in heifer calves. *J. Dairy Sci*, v.88, n.2, p.595-603, 2005b.

CAPUCO, A.V.; SMITH, J.J.; WALDO, D.R. et al. Influence of prepubertal dietary regimen on mammary growth of Holstein heifers. *J. Dairy Sci*, v.78, n.12, p.2709-2725, 1995.

CAPUCO, A.V.; ELLIS, S.; WOOD, D.L.; AKERS, R.M.; GARRETT, W. Postnatal mammary ductal growth: three-dimensional imaging of cell proliferation, effects of estrogen treatment, and expression of steroid receptors in prepubertal calves. *Tissue Cell*, v. 34, p.143–154, 2002.

CAPUCO, A.V.; ELLIS, S.E.; HALE, S.A.E. Lactation persistency: insights from mammary cell proliferation studies. *J. Anim. Sci*, v.81, Suppl. 3, p.18-31, 2003.

CAPUCO, A.V. and AKERS, R.M., Management and Environmental Influences on Mammary Gland Development and Milk Production. In. GREENWOOD, P.L.; BELL, A.W.; VERCOE, P.E.; VILJOEN, G.J. *Managing the Prenatal Environment to Enhance Livestock Productivity*. 1 ed. Springer Science & Business Media. p. 259- 292. 2010.

CAPUCO, A.V.; ELLIS, S.E. Comparative aspects of mammary gland development and homeostasis. *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, v.1, p.179-202, 2013.

COWLES, K.E.; WHITE, R.A.; WHITEHOUSE, N.L; ERICKSON, P.S. Growth characteristics of calves fed an intensified milk replacer regimen with additional lactoferrin. *J. Dairy Sci*, v.89, n.12, p.4835-4845, 2006.

DANIELS, K.M. *Effects of bodyweight and plane of nutrition on mitogenic capacity of mammary extracts in cell culture, mammary growth and development, and protein expression profiles of mammary tissue in Holstein heifers*. 2004. 116 f. Master of Science (Dairy Science) Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA.

DANIELS, K.M. *Effects of Milk Replacer Composition on Measures of Mammary Development in Holstein Heifer Calves*. 2008. 66 f. Thesis (Doctor of Philosophy in Animal Sciences, Dairy) - Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA.

DANIELS, K.M.; MCGILLIARD, M.L.; MEYER, M.J. et al. Effects of body weight and nutrition on histological mammary development in Holstein heifers. *J. Dairy Sci*, v.92, n.2, p.499-505, 2009.

DOBOS, R. C.; NANDRA, K. S.; RILEY, K. et al. The effect of dietary protein level during the pre-pubertal period of growth on 34 mammary gland development and subsequent milk production in Friesian heifers. *Livestock Prod. Sci*, v. 63, p. 235 – 243, 2000.

DRACKLEY, J.K. Early growth effects on subsequent health and performance of dairy heifers. In: *Calf and Heifer Rearing* (Ed. P. C. Garnsworthy). Nottingham University Press, Nottingham. p. 213-235, 2005.

ESSELBURN, K.M. *Ultrasonographic monitoring of mammary parenchyma growth in preweaned holstein heifers*. 2012. 89 f. Thesis (Graduate Program in Animal Sciences) The Ohio State University, Ohio.

ESSELBURN, K.M., HILL, T.M., BATERMAN, H.G. et al.; Examination of weekly mammary parenchymal area by ultrasound, mammary mass, and composition in Holstein heifers reared on 1 of 3 diets from birth to 2 months of age. *J. Dairy Sci.* v.98, p.1–14, 2015.

FILEP, R. and R.M. AKERS. Casein secretion and cytological differentiation in mammary tissue from bulls of high or low genetic merit. *J. Dairy Sci.* v. 83, p. 2261–2268, 2000.

FLÖCK, M. and WINTER, P. Diagnostic ultrasonography in cattle with diseases of the mammary gland. *Vet. J.* v. 171, p. 314– 321, 2006.

FOX, D.G.; BLACK, J.R. System for predicting body composition and performance of growing cattle. *J. Animal Sci*, v.58, n.3, p.725-739, 1984.

FRANZ, S., HOFMANN-PARISOT, M., BAUMGARTNER, W. et al. Ultrasonography of the teat canal in cows and sheep. *Vet. Rec.* v. 149, p. 109–112, 2001.

FRANZ, S., HOFMANN-PARISOT, M., GUTLER, S. and BAUMGARTNER, W. Clinical and ultrasonographic findings in the mammary gland of sheep. *NZ Vet. J.* v. 51, p. 238–243, 2003.

FRANZ, S., FLOECK, M.; HOFMANN-PARISOT, M.,. Ultrasonography of the bovine udder and teat. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* v. 25, p.669–685, 2009.

GLOSSON, K.; HOPKINS, B. A.; WASHBURN, S. P. et al. The effects of supplementing pasteurized milk balancer products to pasteurized whole milk on the health and growth of dairy calves. *J. Dairy Sci.*, v.98, p.1127–1135, 2015.

HENDEE, W. R. e E. R. RITENOUR. *Ultrasound waves*. In *Medical Imaging Physics*. Fourth ed. *Ultrasound waves*. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, 2003.

JASPER, J.; WEARY, D.M. Effects of ad libitum intake on dairy calves. *J. Dairy Sci.* v. 85, p.3054-3058, 2002.

KHAN, M.A.; LEE, H.J., LEE; W.S. et al. Pre-and postweaning performance of Holstein female calves fed milk through step-down and conventional methods. *J. Dairy Sci*, v.90, n.2, p.876-885, 2007.

KIEZEBRINK, D. J.; EDWARDS, A. M.; WRIGHT, T. C. et al. Effect of enhanced whole milk feeding in calves on subsequent first-lactation performance. *J. Dairy Sci.*, v.98, p.1–8, 2015.

KLEIN, D., FLÖCK, M., KHOL, J. L. et al. Ultrasonographic measurement of the bovine teat: breed differences, and the significance of the measurements for udder health. *J. Dairy Res.* v.72, p.296–302, 2005.

KLEINBERG, D.L. Early mammary development: growth hormone and IGF-1. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, v.2, p.49–57, 1997.

KNIGHT, C.H.; SORENSEN, A. Windows in early mammary development: critical or not? *Reproduction*, v.122, n.3, p. 337-345, 2001.

LEEDS, T. D.; MOUSEL, M. R.; NOTTER, D. R. et al. B-mode, real-time ultrasound for estimating carcass measures in live sheep: Accuracy of ultrasound measures and their relationships with carcass yield and value. *J. Anim. Sci.* v. 86, p. 3203-3214, 2008.

LIMA, J.A.M. *Desempenho produtivo de vacas fl holandês/zebu submetidas ao aumento do número de ordenha no início da lactação e a diferentes manejos de amamentação*. 2011. 79 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

LITTLE, W. and KAY, R.M. The effects of rapid rearing and early calving on the subsequent performance of dairy heifers. *Anim. Prod.* V. 29, p. 131–142, 1977.

LOHAKARE, J.D.; SUEDEKUM, K.H.; PATTANAIK, A.K. Nutrition-induced changes of growth from birth to first calving and its impact on mammary development and firstlactation milk yield in dairy heifers: a review. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* v.25, n.9, p.1338-1350, 2012.

MACDONALD, K.A.; PENNO, J.W.; BRYANT, A.M.; ROCHE, J.R. Effect of feeding level pre-and post-puberty and body weight at first calving on growth, milk production, and fertility in grazing dairy cows. *J. Dairy Sci.* v.88, n.9, p.3363-3375, 2005.

MEYER, M.J.; CAPUCO, A.V.; ROSS, D.A. et al. Developmental and nutritional regulation of the prepubertal heifer mammary gland: I. Parenchyma and fat pad mass and composition. *J. Dairy Sci.* v.89, n.11, p.4289-4297, 2006a.

MEYER, M.J.; CAPUCO, A.V.; ROSS, D.A. et al. Developmental and nutritional regulation of the prepubertal bovine mammary gland: II. Epithelial cell proliferation, parenchymal accretion rate, and allometric growth. *J. Dairy Sci.* v.89, n.11, p.4298-4304, 2006b.

NISHIMURA, M., YOSHIDA, T., EL-KHODERY, S. et al., Ultrasound imaging of mammary glands in dairy heifers at different stages of growth. *J. Vet. Med. Sci.* v.73, p.19–24, 2011.

OFTEDAL, O.T. The mammary gland and its origin during synapsid evolution. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* v. 7, p. 225–252, 2002.

PARK, C.S., DANIELSON, R.B., KREFT, B.S. et al. Nutritionally directed compensatory growth and effects on lactation potential of developing heifers. *J. Dairy Sci.* v. 81, p. 243–249, 1998.

POLÁK, P., MENDIZABAL, J. A., BLANCO R.O.A. et al. Prediction of intramuscular fat in live bulls using real-time ultrasound and image analysis. *J. Animal and Feed Sci,* v. 17, p. 30–40, 2008.

PURUP, S., K. SEJRSEN, J. FOLDAGER, and R.M. AKERS. Effect of exogenous bovine growth hormone and ovariectomy on prepubertal mammary growth, serum hormones and acute in-vitro proliferative response of mammary explants from Holstein heifers. *J. Endocrinol.* v. 139, p. 19–26, 1993.

RADCLIFF, R.P.; VANDEHAAR, M.J.; CHAPIN, L.T. et al. Effects of diet and injection of bovine somatotropin on prepubertal growth and first-lactation milk yields of Holstein cows. *J. Dairy Sci,* v.83, n.1, p.23-29, 2000.

RADCLIFF, R.P.; VANDEHAAR, M. J.; KOBAYASHI, Y.; SHARMA, B. K. Effect of dietary energy and somatotropin on components of the somatotropic axis in holstein heifers. *J. Dairy. Sci.* v. 87, p. 1229-1235, 2004.

RAETH-KNIGHT, M.; CHESTER-JONES, H.; HAYES, S. et al. Impact of conventional or intensive milk replacer programs on Holstein heifer performance through six months of age and during first lactation. *J. Anim. Sci,* v.92, n.2, p.799-809, 2009.

RIBADU, A. Y.; NAKAO, T. Bovine Reproductive Ultrasonography: A Review. *J. Reprod. Dev.* v. 45, p. 13–28, 1999.

SEJRSEN, K. Mammary development and milk yield in relation to growth rate in dairy and dual-purpose heifers. *Acta. Agriculturae Scandinavica.* v.28, p. 41–46, 1978.

SEJRSEN, K.; HUBER, J. T.; TUCKER, H. A. et al. Influence of Nutrition on Mammary Development in Pre- and Postpubertal Heifers¹. *J. Dairy sci,* v.65, n.5, p.793-800, 1982.

SEJRSEN, K., FOLDAGER, J. SORENSEN, M.T. et al. Effect of exogenous bovine somatotropin on pubertal mammary development in heifers. *J. Dairy Sci.*v.69, p. 1528–1535, 1986.

SEJRSEN, K.; PURUP, S. Influence of prepubertal feeding level on milk yield potential of dairy heifers: A Review. *J. Anim. Sci.*, v.75, p.828–835, 1997.

SEJRSEN, K.; PURUP, S.; VESTERGAARD, M.; FOLDAGER, J. High body weight gain and reduced bovine mammary growth: physiological basis and implications for milk yield potential. *Domest. Anim. Endocrinol.*, v.19, n.2, p.93-104, 2000.

SILPER, B. F., LANA, A. M. Q., CARVALHO, A. U. et al. Effects of milk replacer feeding strategies on performance, ruminal development, and metabolism of dairy calves. *J. Dairy Sci.* v. 97, p. 1016-1025, 2014.

SILVA, L.F.; VANDEHAAR, M.J.; WEBER NIELSEN, M.S.; SMITH, G.W. Evidence for a local effect of leptin in bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.*, v.85, n.12, p.3277-3286, 2002a.

SILVA, L.F.P.; VANDEHAAR, M.J.; WHITLOCK, B.K. et al. Short communication: relationship between body growth and mammary development in dairy heifers. *J. Dairy Sci.*, v.85, n.10, p.2600-2602, 2002b.

SILVA, L.F., LIESMAN, J.S., NIELSEN, M.S. et al. Intramammary infusion of leptin decreases proliferation of mammary epithelial cells in prepubertal heifers. *J. Dairy Sci.* (Suppl. 1) v. 82, p. 166, 2003.

SILVA, L.F.P.; LIESMAN, J.S.; ETCHEBARNE, B.E. et al. Short Communication: Intramammary infusion of IGF-I increases bromodeoxyuridine labeling in mammary epithelial cells of prepubertal heifers. *J. Dairy Sci.*, v.88, n.8, p.2771-2773, 2005.

SILVA, L.F.P.; ETCHEBARNE, B.E.; WEBER NIELSEN, M.S. et al. Intramammary infusion of leptin decreases proliferation of mammary epithelial cells in prepubertal heifers. *J. Dairy Sci.*, v.91, n.8, p.3034-3044, 2008.

SOBERON, F.; RAFFRENATO, E.; EVERETT, R.W.; VAN AMBURGH, M.E. Prewaning milk replacer intake and effects on long-term productivity of dairy calves. *J. Dairy Sci.*, v.95, n.2, p.783-793, 2012.

SORENSEN, M. T.; NORGAARD, J. V.; THEIL, P. K. et al. Cell turnover and activity in mammary tissue during lactation and dry period in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v. 89, p. 4632-4639, 2006.

TEIXEIRA, J.C. *Exigências de energia e proteína, composição e área corporal e principais cortes da carcaça em seis grupos genéticos de bovídeos.* 1984. 94p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal Viçosa, Viçosa.

THORN, S.R.; PURUP, S.; COHICK, W.S. et al. Leptin does not act directly on mammary epithelial cells in prepubertal dairy heifers. *J. Dairy Sci.*, v.89, n.5, p.1467-1477, 2006.

TRASCH, K., WEHREND, A. and BOSTEDT, H. Ultrasonographic description of canine mastitis. *Vet. Radiol. Ultrasound*. v. 48, p. 580–584, 2007.

TUCKER, H.A.; SYMPOSIUM: HORMONAL REGULATION OF MILK SYNTHESIS Hormones, Mammary Growth, and Lactation: a 41-Year Perspective. *J Dairy Sci.*,v. 83, p. 874–884, 2000.

TUCKER, H.L.M.; *The Effects of Tamoxifen on Mammary Development in Prepubertal Heifers*. 2013. 86 f. Master (Master of Science In Dairy Science) – Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA.

WHITLOCK, B. K.; VANDEHAAR, M. J.; SILVA, L. F. P. et al. Effect of Dietary Protein on Prepubertal Mammary Development in Rapidly Growing Dairy Heifers¹. *J. Dairy sci*, v.85, n.6, p.1516-1525, 2002.

WILLIAMS, A. R. Ultrasound applications in beef cattle carcass research and management. *J. Animal Sci*, v.80, n.2, p.E183-E185, 2002.

YOUSAO, I.; VERLEYEN, V.; MICHAUX, C.; LEROY, P. L. Choice of probing site for estimation of carcass lean percentage in Piétrain pig using the real-time ultrasound. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*. v. 4, p. 195–200, 2002.

ANEXOS

Anexo 1. Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Gado de Leite



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Programas de aleitamento intensivo com diferentes teores de matéria seca para bezerros mestiços: desempenho, comportamento, saúde e exigências nutricionais**", Protocolo Nº **06/2014**, sob a responsabilidade de **Fernanda Samarini Machado** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Gado de Leite, em reunião de **12/03/2014**.

Vigência do Projeto	De 05/04/2014 a 31/08/2014
Espécie/Linhagem	<i>Bos taurus</i> /Bovino
Nº de Animais	100
Peso/Idade	35 a 80 Kg/01 a 90 dias
Sexo	Machos (x) Fêmeas (x)
Origem	Biotérios da Embrapa Gado de Leite (x) Frigorífico ()

João Batista Ribeiro
Secretário Administrativo da CEUA/EGL

INTERPRETIVE SUMMARY

The effects of increasing amounts of milk replacer powder added to whole milk on mammary gland measurements using ultrasound in dairy heifers. *Furini et al.* A

recent strategy to increase heifer performance is the addition of milk replacer powder to whole milk in a fixed volume, leading to an increase in the total solids content of liquid feed. There are few studies in literature evaluating the impact of high weight gain rates during preweaning phase on mammary gland development. Therefore, it is important to investigate the effects of this nutritional strategy on mammary gland development in dairy heifers.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the effect of increasing total solids (TS) in the liquid diet during the preweaning phase on mammary gland development in dairy heifers. The increase in total solids (TS) was obtained with the addition of milk replacer powder (MRP) to whole milk (WM). Crossbreed Holstein-Gyr heifers (n = 60) were distributed in four treatments with different TS concentrations: 13.5% (n = 15); 16.1% (n = 15); 18.2% (n = 15) and 20.4% (n = 15). The liquid diets were provided from 5 to 55 d of age. From 56 to 59 d of age, the total amount of liquid feed was reduced by half. Heifers were weaned at 60 d and monitored until 90 d of age. Ultrasound mammary gland evaluations were performed weekly between the wk 5 to 11 of age, using a B-mode ultrasound equipped with micro-convex transducer of 6 MHz frequency. In those same weeks, the manual palpation of mammary parenchyma (PAR) was performed. Increased TS concentration of liquid diet during the preweaning period increased BW of heifers, but did not alter PAR growth and the deposition of adipose tissue in the mammary gland evaluated by ultrasonography. The oval-shaped structure of PAR was

26 altered after two months of age. In the evaluated period, PAR growth was isometric with
27 respect to the body growth rate. Palpation scoring of PAR had a strong correlation with
28 the ultrasound evaluation of the PAR.

29 **Key words:** development, parenchymal area, palpation score

30

31

INTRODUCTION

32 The conventional calf-feeding program adopted in dairy farm consists of feeding
33 10% of BW of liquid feed (Raeth-Knight et al., 2009), and this practice is also known to
34 stimulate starter intake and promote early rumen development (Azevedo et al., 2016a).
35 However, the performance and feed efficiency of this system are often associated with
36 unsatisfactory results (Khan et al., 2007). In intensive calf-feeding, higher amounts of
37 nutrients are provided by increasing the total volume of liquid feed (Silper et al., 2014,
38 Leão et al., 2016; Rosenberger et al., 2017), by increasing total solids (TS) in milk
39 replacer (MR; Terré et al., 2009; Chapman et al., 2016; Hill et al., 2016) or by the
40 addition of milk balancer (Glosson et al., 2015) or MRP (Azevedo et al., 2016a,b).

41 According to Sejrsen and Purup (1997) and Radcliff et al. (2000), high ADG rates
42 before puberty (90 to 320 kg of BW) in Holstein heifers may negatively affect the
43 development of the mammary gland, with consequent lower milk yield in the first
44 lactation. Weeler et al. (2016) reported an alteration in mammary development with
45 increased nutrient intake in pre-pubertal Holstein-Gyr heifers, with gains from 0.5 to 1.0
46 kg/d. The consequence is an increase in body fat content and fat accumulation in
47 mammary gland, which may compromise mammary parenchymal growth in heifers.
48 However, during the preweaning phase (before 2 months of age), this same effect has
49 not been reported (Daniels et al., 2009). Meyer et al. (2006) and Geiger et al. (2016a,b)
50 reported greater mammary development in heifers submitted to intensive feeding

51 programs. According to Brown et al. (2005), the increased growth rate prior to weaning
52 seems to have positive effects on mammary gland growth, as the increase in nutrient
53 supply at that age almost doubled the PAR mass of heifers. This demonstrates that the
54 rapid growth until weaning is not detrimental to mammary gland development. In this
55 way the effects of the nutrition plan on mammary gland development seem to differ
56 between preweaning and prepubertal period, this may be due to the low fat content of
57 the young calf at birth.

58 Evaluation of mammary gland development (PAR and mammary fat pad) in
59 heifers is usually done after the slaughter (Brown et al., 2005; Geiger et al., 2016a,b;
60 Weller et al., 2016). This technique does not allow for the monitoring the animal during
61 its development and presents high costs, which limits the research. In this context,
62 alternative and non-invasive methods to reduce time and cost of such analyzes become
63 important. Ultrasonography is a widely used technique for assessing fat deposition in
64 animal carcasses (Arnold et al., 1991) and it has been used to evaluate developmental
65 characteristics and lesions of the mammary gland in dairy calves and heifers (Nishimura
66 et al. 2011; Esselburn et al., 2015, Albino et al., 2017). Another alternative used to
67 monitor the development of the mammary gland in dairy heifers is palpation scoring,
68 which is easy, does not present a cost in its execution, but is subjective technique
69 (Esselburn et al., 2015).

70 The objective of this study was (1) to determine the effect of increasing total
71 solids of WM by the addition of MRP in the mammary gland development of dairy
72 heifers from wk 5 to 11 of age, using ultrasonography; (2) to evaluate the relationship
73 between the weekly measurements of PAR growth using ultrasound with the manual
74 palpation scoring. Our hypotheses are (1) heifers fed higher total solids contents of
75 liquid diet will have greater PAR growth in relation to heifers fed lower TS

76 concentrations; (2) the palpation scoring may be an option to monitor PAR development
77 in dairy heifers.

78

79

MATERIAL AND METHODS

80 The Ethics Committee of Embrapa Dairy Cattle, Brazil (protocol no. 06/2014),
81 approved the study. The trial was conducted at the Embrapa Dairy Cattle Experimental
82 Farm, located in Coronel Pacheco, Minas Gerais, Brazil.

Animals, Housing, Management, and Performance

84 Holstein-Gyr crossbred heifers (n = 60) were used; their genetic composition was
85 5/8 or more Holstein and 3/8 or less Gyr. These heifers were previously part of the
86 study conducted by Azevedo et al. (2016a) to evaluate the effect of increasing solids
87 concentration by the addition of milk replacer powder MRP to WM on performance,
88 intake and health of heifers from 5 to 90 d of age. Detailed descriptions of the facilities,
89 initial care and dietary composition from preweaning (5 to 59 d of age) to postweaning
90 (60 to 90 d of age) can be found in Azevedo et al. (2016a). One heifer (treatment 17.5%
91 TS) was removed from the study in the last week of the postweaning period due to an
92 accident that led to the fracture of its anterior right leg.

93 The animals were randomly distributed in four treatments after birth. Preweaning
94 treatments consisted of increasing amounts of MRP (Sprayfo Violet SSP, Sloten BV,
95 Deventer, the Netherlands; 20% CP and 33% ether extract) added to WM ($12.6 \pm 0.7\%$
96 TS, mean \pm SD; Table 1) to adjust the TS to expected concentrations of 12.5% (actual
97 TS = $13.5 \pm 0.53\%$; N = 15), 15.0% (actual TS = $16.1 \pm 0.03\%$; N = 15), 17.5% (actual
98 TS = $18.2 \pm 0.14\%$; N = 13) and 20.0% (actual TS = $20.4 \pm 0.24\%$; N = 15). The initial
99 TS content in the WM was measured daily, immediately after milking and before each
100 feeding, using a Brix refractometer (DD-3 Palm Abbe Digital, Misco, Solon, OH). Brix

101 grade values were converted to TS content using the equation proposed by Moore et al.
102 (2009) [$TS = 0.9984 \times (\text{Brix refractometer reading}) + 2.077$] and the amount of MRP to
103 be added to the WM was adjusted to achieve the desired TS content for each treatment.
104 The MRP was added to the WM immediately before feeding the heifers. The total
105 volume of treatment (6 L/d) was divided into 2 equal meals (0800 and 1600 h) and
106 provided to heifers in buckets from 5 to 55 d of age. At 56 d of age, the total volume of
107 liquid feed was reduced by half (3 L/d, provided at 0800 h only) and heifers were
108 weaned at 60 d of age. Starter (Soylac Rumen 20% Flocculated, Total Alimentos, Três
109 Corações, Brazil) and water were offered ad libitum during the preweaning period. At
110 70 d of age, corn silage was included ad libitum in a separate bucket.

111 ***Mammary Ultrasound***

112 Ultrasound images were obtained weekly between wk 5 to 11 of age, always by
113 the same evaluator, using a B-mode ultrasound equipped with micro-convex transducer
114 of 6 MHz frequency (DP 2200, Mindray, China). For the evaluation of the mammary
115 glands (front and rear quarters), the animals were laid on lateral decubitus with the
116 probe in a standardized position with a 45° inclination in relation to the teat position,
117 always in caudal-cranial direction (Nishimura et al., 2011). To increase the contact of
118 the probe with the skin and to improve the visualization of the images, the area to be
119 evaluated was wetted with 70% alcohol and then the ultrasound gel was placed
120 (Carbogel ULT®, Sao Paulo, Brazil).

121 The images obtained were saved in BMP format and then transferred to the
122 ImageJ® program (National Institutes of Health; <http://imagej.nih.gov/ijindex.html>) for
123 further analysis. In ImageJ the scale of pixels per cm ($1 \text{ cm}^2 = 48,148 \text{ pixels}$) was
124 calibrated using the “straight” tracer and parenchymal areas were resultant by tracing
125 the PAR area with the mouse and cursor using the “freehand” tracer.

126 Within in PAR area, we used number the pixels to calculate the average pixel
127 brightness. In 8-bit images, each pixel was numerically represented on a scale of 256
128 thousand shades of grey (0=black; 255000=white) according to their brightness
129 (Ferreira and Rasband. 2011). According to Albino et al. (2015) structures with a high
130 ability to reflect sound waves (fat tissue) are hyperechoic and thus present with a higher
131 pixel value. Conversely, tissues with a limited ability to reflect sound waves are
132 hypoechoic and have a lower pixels value (PAR tissue).

133 The circularity was evaluated using $[4\pi \times (\text{Area}/\text{Perimeter})^2]$ obtained in ImageJ®
134 and it ranges from 0 (infinitely elongated polygon) to 1 (perfect circle) (National
135 Institutes of Health, Bethesda, MD).

136 ***Palpation Scoring***

137 Manual palpation of PAR was performed before all ultrasound evaluations, by a
138 single evaluator, adapting the methodology of scoring proposed by Esselburn et al.
139 (2015): (1) small and threadlike, comparable to a small grain of rice; (2) a larger grain
140 of rice; (3) a small pea; (4) a chickpea; (5) almond sized; (6) larger than an almond; and
141 (7) a pecan whole. For all variables, the averages of the front and rear glands were
142 obtained.

143 ***Statistical Analysis***

144 Data were analyzed using SAS version 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC). The
145 variables were analyzed using a repeated-measures mixed model (PROC MIXED),
146 including heifer as a random effect and treatment, week, block (genetic group),
147 mammary gland (front or rear) and their interaction as fixed components. Differences
148 among treatments were assessed using orthogonal polynomial contrasts to estimate the
149 linear, quadratic and cubic effects of increasing TS concentrations of liquid feed.
150 Circularity differences of the mammary gland (front and rear) and differences between

151 genetic groups were analyzed, including mammary gland or genetic group as a fixed
152 effect and using a Tukey adjustment for P -values. Palpation scores by period were
153 tested as a nonparametric variable using the Kruskal-Wallis test with 95% confidence
154 intervals for treatment comparisons (PROC NPAR1WAY). Least squares means for
155 each treatment are reported. BW at birth was considered as a covariate. Significance
156 was declared at $P \leq 0.05$.

157

158 **RESULTS AND DISCUSSION**

159 According the Azevedo et al. (2016a), the difference between the TS content
160 initially proposed and the values found by laboratory analysis may have occurred
161 because the equation used to convert Brix grade values to TS content was designed
162 based on waste milk samples (Moore et al., 2009), which are different from the WM
163 used in this experiment.

164 A linear increase ($P \leq 0.05$) in body weight (kg) was observed according to the
165 increase in TS levels of liquid diet between wk 5 to 11 of age (Table 2). As predicted,
166 the total intake of CP (g/d) and gross energy (Mcal/kg) increased linearly (Azevedo et
167 al., 2016a) with the concentration of TS. This increasing during the preweaning phase
168 boosted the development of the skeletal structure and the body tissues in heifers because
169 of the higher protein and energy intake. Glosson et al. (2015) reported similar results.

170 ***Mammary Ultrasound***

171 Interaction ($P \leq 0.05$; Table 2) between the TS concentrations and the evaluated
172 periods for PAR area (mm^2/gland) was observed. At the wk 5 of age, the lower
173 mammary PAR area was observed for the concentration of 17% TS of liquid diet
174 (quadratic, $P = 0.03$; Table 3). At week 11, when the animals were already weaned,
175 there was an increase (linear, $P = 0.02$; Table 3) in PAR area according to the increase

176 of TS concentrations of liquid diet. This result is similar to that observed for the weight
177 gain and appears to be the result of better nutrition during preweaning period, in
178 consequence for the increasing linear in the total CP (g/d) and gross energy intake
179 (Mcal/kg) according to the increase of TS concentrations in the liquid diets (Azevedo et
180 al., 2016a).

181 According to Brown et al. (2005), the increase in CP and energy intake between
182 the wk 2 to 8 of age increased mammary PAR growth rate of heifers, as well as the
183 DNA and RNA concentrations, suggesting that the rapid growth is not harmful when
184 the intraparenchymal fat content is not increased. On the other hand, Esselburn et al.
185 (2015) did not observe dietary effect on the area and composition of the PAR until the
186 wk 8 of age in heifers fed three different sources of fat in MR.

187 Interaction between PAR area and evaluated weeks ($P \leq 0.05$; Table 2) was
188 observed. At the wk 11 of age, the PAR of the rear ($61.1 \text{ mm}^2/\text{gland}$) quarters was 12.4%
189 higher compared to the front ($53.5 \text{ mm}^2/\text{gland}$) quarters ($P = 0.05$; Table 4). In adult
190 animals, the front quarters are smaller than the rear glands, with a ratio of 41:59 (Ayadi
191 et al., 2003). For this study, the ratio between the PAR area of the front and rear glands
192 was 47:53, which is similar to the observed by Esselburn et al. (2015).

193 At the wk 5 of age, the PAR area and BW of heifers, regardless of the treatments,
194 were $11.4 \pm 4.6 \text{ mm}^2$ and $53.7 \pm 4.6 \text{ kg}$, increasing to $28.8 \pm 9.3 \text{ mm}^2$ and $73.3 \pm 4.6 \text{ kg}$,
195 respectively, at the wk 8 of age. These results show that PAR increased 2.5 times and
196 BW 1.4 during this period. Complementary, mammary growth rate of 1.8 was observed
197 in relation to the BW growth rate, which indicates a slightly higher growth rate
198 compared to the reported by Sinha and Tucker (1969) and Meyer et al. (2006) as an
199 isometric growth (1.5 times). On the other hand, Esselburn et al. (2015) reported that
200 before 2 months of age, the PAR growth is allometric with respect to the BW in

201 Holstein heifers and the dogmatic assumption that PAR growth is isometric during this
202 time is not valid. The differences observed for mammary growth between the present
203 study and the results verified for Esselburn et al. (2015) can possibly be explained by
204 the different genetic composition and different calf-feeding strategies evaluated.
205 Therefore, more research is needed to determine the influence of genetics and calf-
206 feeding strategies on PAR growth in dairy heifers.

207 In the postweaning period (between the wk 8 to 11 of age), the PAR area and BW
208 of heifers, regardless of the treatments, were $28.8 \pm 9.3 \text{ mm}^2$ and $73.3 \pm 4.6 \text{ kg}$,
209 increasing to $40.9 \pm 20.6 \text{ mm}^2$ and $82.0 \pm 10.5 \text{ kg}$ respectively, at the wk 8 and 11 of
210 age. The mammary growth rate of 1.7 was observed in relation to the BW growth rate,
211 demonstrating that the animals were still in a growth phase slightly higher than that
212 reported by Sinha and Tucker (1969) and Meyer et al. (2006) as isometric.

213 The differences observed for mammary growth between the study of Esselburn et
214 al. (2015) and the results verified in the present study can possibly be explained by the
215 different genetic compositions and different calf-feeding strategies evaluated. Therefore,
216 more research is needed to determine the influence of genetics and calf-feeding
217 strategies on mammary gland development in dairy heifers.

218 According to Nishimura et al. (2011), at 2 months of age, the mammary gland is
219 an oval hyperechoic structure. The loss of delimitation and shape of the PAR, as well as
220 reduction of echogenicity in ultrasound images, occurs after this period. The oval-
221 shaped PAR structure was similar between the different treatments (Table 2). However,
222 the rear glands were more circular than the front quarters ($P \leq 0.05$, quadratic effect),
223 with the greater circularity observed at the wk 8 of age (Figure 1). Conversely,
224 Nishimura et al. (2011) did not verify differences between the ultrasound images
225 between the front and rear glands.

226 No influence of the TS concentration of the liquid diet was observed on the mean
227 number of pixels in the heifers PAR area (Table 2). According Albino et al. (2015), the
228 echogenicity is defined by the number of pixels, that is, structures with high capacity to
229 reflect sound waves are hyperechoic and with more pixels (adipose tissue). On the other
230 hand, structures with limited capacity to reflect sound waves are hypoechogenic and
231 have fewer pixels (PAR). Therefore, it is reasonable to assume that the increase in TS
232 concentrations of liquid diets up to 20.4% did not influence the deposition of fat in the
233 mammary gland. These results, combined with that observed by Azevedo et al. (2016b),
234 who reported no change in body composition of male calves fed diets with TS
235 concentrations similar to those of the present study, support the hypothesis that the same
236 was true for body composition and heifer mammary gland. Other studies demonstrated
237 similar results. Esselburn et al. (2015) found no dietary influence on the lipid
238 composition of the breast fat pad of DM fed heifers with different sources and amounts
239 of fat. Brown et al. (2015) conclude that high energy and protein intake in heifers during
240 the preweaning phase does not increase fat deposition in PAR. On the other hand,
241 Geiger et al. (2016b) observed that the amount of DNA in the breast fat pad was 5.4
242 times greater, as well as the fat concentration, for heifers (1.13 kg/d RM) than the
243 restricted heifers (0.45 kg/d of MR). However, in the study of Geiger et al. (2016b), fat
244 concentration and amount of total fat in PAR were not affected by different calf feeding
245 strategies.

246

247 *Palpation Scores*

248 The palpation score of PAR did not differ between the TS concentrations supplied
249 during the preweaning phase in any of the evaluated weeks (Table 5), ranging from 2.4
250 \pm 1.0 in the wk 5 and 5.2 \pm 1.1 in the wk 11. The correlation observed between the

251 palpation score of mammary parenchyma and the measurements of mammary
252 parenchyma area (mm^2/gland) using ultrasound was positive ($R^2 = 0.71$, $P \leq 0.01$) and
253 moderated, and were similar to that reported by Esselburn et al. (2015), which was 0.68
254 between ultrasound measurements and palpation scoring in week 2 to 8 of age. Both
255 correlations are considered as medium (Table 3). This correlation indicates that the
256 palpation score of PAR, although subjective, may be a useful and low-cost tool for
257 monitoring PAR development and may be used to select animals with better potential
258 for milk production without the use of ultrasound, even in the early stages of animal
259 life. However, more studies proving and establishing a guide on how to obtain and
260 analyze this variable are needed.

261

262

CONCLUSIONS

263

264 Increasing the concentration of TS in liquid feed up to 20.4% until the wk 8 of age
265 did not affect PAR development and adipose deposition in the mammary gland when
266 evaluated using ultrasonography. At 11 wk of age, a linear increase in mammary PAR
267 growth was observed according to the increased concentration of TS in liquid feed,
268 without dietary influence on the other parameters. Between the wk 5 to 11 of age, PAR
269 growth was isometric with respect to the heifers' body growth. The circularity of the
270 mammary gland was altered after two months of age. Ultrasonography is a noninvasive
271 technique for monitoring mammary gland development. However, further studies
272 involving larger numbers of animals and different breeds are suggested to increase the
273 accuracy of the technique. The palpation score and ultrasound evaluation were
274 moderately correlated.

275

276

277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES), “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais” (FAPEMIG), “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq) and Embrapa Dairy Cattle for the financial support.

REFERENCES

- Albino, R. L., Marcondes, M. I., Akers, R. M., Detmann, E., Carvalho, B. C., and Silva, T. E. 2015. Mammary gland development of dairy heifers fed diets containing increasing levels of metabolisable protein: metabolisable energy. *J. Dairy Res.*,82:113–120.
- Albino, R. L., Guimarães, S. E. F., Daniels, K. M., Fontes, M. M. S., Machado, A. F., Dos Santos, G. B., and Marcondes, M. I. 2017. Technical note: Mammary gland ultrasonography to evaluate mammary parenchymal composition in prepubertal heifers. *J. Dairy Sci.* 100:1588-1591.
- Arnold, J. W., J. K, Bertrand, L. L. Benyshek, and C. Ludwig. 1991. Estimates of genetic parameters for live animal ultrasound, actual carcass data, and growth traits in beef cattle. *J. Animal Sci.* 69:985-992.
- Azevedo, R. A., F. S. Machado, M. M. Campos, P. M. Furini, S. R. A. Rufino, L. G. R. Pereira, T. R. Tomich, and S. G. Coelho. 2016a. The effects of increasing amounts of milk replacer powder added to whole milk on feed intake and performance in dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 99:8018–8027.

- 302 Azevedo, R. A., F. S. Machado, M. M. Campos, D. R. G. Lopes, S. F. Costa, H. C.
303 Mantovani, F. C. F. Lopes, M. I. Marcondes, L. G. R. Pereira, T. R. Tomich,
304 and S. G. Coelho. 2016b. The effects of increasing amounts of milk replacer
305 powder added to whole milk on passage rate, nutrient digestibility, ruminal
306 development, and body composition in dairy calves. *J. Dairy Sci.* 99:8746-8758.
307
- 308 Ayadi, M., G. Caja, X. Such, and C. H. Knight. 2003. Use of ultrasonography to
309 estimate cistern size and milk storage at different milking intervals in the udder
310 of dairy cows. *J. Dairy Res.* 70:1-7.
311
- 312 Brown, E. G., M. J. Vandehaar, K. M. Daniels, J. S. Liesman, L. T. Chapin, J. W.
313 Forrest, R. M. Akers, R. E. Pearson, and M. S. Nielsen. 2005. Effect of
314 increasing energy and protein intake on mammary development in heifer calves.
315 *J. Dairy Sci.* 88:595–603.
316
- 317 Chapman, C. E., P. S. Erickson, J. D. Quigley, T. M. Hill, H. G. Bateman, F. X.
318 Suarez-Mena, and R. L. Schlotterbeck. 2016. Effect of milk replacer program
319 on calf performance and digestion of nutrients with age of the dairy calf. *J.*
320 *Dairy Sci.* 99:2740-2747.
321
- 322 Daniels, K. M., M. L. McGilliard, M. J. Meyer, M. E. Van Amburgh, A. V. Capuco,
323 and R. M. Akers. 2009. Effect of body weight and nutrition on histological
324 mammary development in Holstein heifers. *J. Dairy Sci.* 92:499–505.
325

- 326 Drackley, J. K. 2008. Calf nutrition from birth to breeding. *Vet. Clin. North Am. Food*
327 *Anim. Pract.* 24:55–86.
- 328
- 329 Esselburn, K. M., T. M. Hill, H. G. Bateman II, F. L. Fluharty, S. J. Moeller, K. M.
330 O'Diam, and K. M. Daniels. 2015. Examination of weekly mammary
331 parenchymal area by ultrasound, mammary mass, and composition in Holstein
332 heifers reared on 1 of 3 diets from birth to 2 months of age. *J. Dairy Sci.*
333 98:5280–5293.
- 334
- 335 Ferreira, T., and W. S. Rasband. 2011. ImageJ User Guide – IJ 1.46. Accessed Dec. 5,
336 2016. <http://imagej.nih.gov/ij/docs/index.html>.
- 337
- 338 Geiger, A. J., C. L. M. Parsons, R. E. James, and R. M. Akers. 2016a. Growth, intake,
339 and health of Holstein heifer calves fed an enhanced pre-weaning diet with or
340 without exogenous estrogen. *J. Dairy Sci.* 99:3995–4004.
- 341
- 342 Geiger, A. J., Parsons, C. L. M., & Akers, R. M. 2016b. Feeding a higher plane of
343 nutrition and providing exogenous estrogen increases mammary gland
344 development in Holstein heifer calves. *J. Dairy Sci.* 99:7642–7653.
- 345
- 346 Glosson, K. M., B. A. Hopkins, S. P. Washburn, S. Davidson, G. Smith, T. Earleywine,
347 and C. Ma. 2015. Effect of supplementing pasteurized milk balancer products to
348 heat-treated whole milk on the growth and health of dairy calves. *J. Dairy Sci.*
349 98:1127–1135.
- 350

- 351 Hill, T. M., J. D. Quigley, F. X. Suarez-Mena, H. G. Bateman II, and R. L.
352 Schlotterbeck. 2016. Effect of milk replacer feeding rate and functional fatty
353 acids on dairy calf performance and digestion of nutrients. *J. Dairy Sci.*
354 99:6352–6361.
- 355
- 356 Khan, M. A., H. J. Lee, W. S. Lee, H. S. Kim, S. B. Kim, K. S. Ki, J.K. Ha, H. G. Lee,
357 and Y. J. Choi. 2007. Pre- and post-weaning performance of Holstein female
358 calves fed milk through stepdown and conventional methods. *J. Dairy Sci.*
359 90:876–885.
- 360
- 361 Leão, J. M., J. A. M. Lima, A. M. Q. Lana, H. M. Saturnino, R. B. Reis, F. A. Barbosa,
362 F. A., R. A. Azevedo, R. V. Sá Fortes, and S. G. Coelho. 2016. Performance of
363 crossbred heifers in different step-down waste milk-feeding strategies. *Trop.*
364 *Anim. Health Prod.*48:1607-1612.
- 365
- 366 Meyer, M. J., A. V. Capuco, D. A. Ross, L. M. Lintault, and M. E. Van Amburgh. 2006.
367 Developmental and nutritional regulation of the prepubertal bovine mammary
368 gland: II. Epithelial cell proliferation, parenchymal accretion rate, and
369 allometric growth. *J. Dairy Sci.* 89:4298–4304.
- 370
- 371 Nishimura, M., T. Yoshida, S. El-Khodery, M. Miyoshi, J. Yasuda, and K. Miyahara.
372 2011. Ultrasound imaging of mammary glands in dairy heifers at different
373 stages of growth. *J. Vet. Med. Sci.* 73:19–24.
- 374

- 375 Radcliff, R. P., M. J. VandeHaar, L. T. Chapin, T. E. Pilbeam, D. K. Beede, E. P.
376 Stanisiewski, and H. A. Tucker. 2000. Effects of diet and injection of bovine
377 somatotropin on prepubertal growth and first-lactation milk yields of Holstein
378 cows. *J. Dairy Sci.* 83:23–29.
- 379
- 380 Raeth-Knight, M., H. Chester-Jones, S. Hayes, J. Linn, R. Larson, D. Ziegler, B.
381 Zeigler, and N. Broadwater. 2009. Impact of conventional or intensive milk
382 replacer programs on Holstein heifer performance through six months of age
383 and during first lactation. *J. Dairy Sci.* 92:799-809.
- 384
- 385 Rosenberger, K., Costa, J. H. C., Neave, H. W., von Keyserlingk, M. A. G., and Weary,
386 D. M. 2017. The effect of milk allowance on behavior and weight gains in dairy
387 calves. *J. Dairy Sci.* 100:504-512.
- 388
- 389 Sejrsen, K., and Purup, S. 1997. Influence of prepubertal feeding level on milk yield
390 potential of dairy heifers: A Review. *J. Anim. Sci.* 75:828–835.
- 391
- 392 Silper, B. F., A. M. Q. Lana, A. U. Carvalho, C. S. Ferreira, A. P. S. Franzoni, J. A. M.
393 Lima, H. M. Saturnino, R. B. Reis, and S. G. Coelho. 2014. Effects of milk
394 replacer feeding strategies on performance, ruminal development, and
395 metabolism of dairy calves. *J. Dairy Sci.* 97:1016–1025.
- 396
- 397 Sinha, Y. N., and H. A. Tucker. 1969. Mammary development and pituitary prolactin
398 level of heifers from birth through puberty and during the estrous cycle. *J. Dairy*
399 *Sci.* 52:507–512.

400

401 Terré, M., C. Tejero, and A. Bach. 2009. Long-term effects on heiferperformance of an

402 enhanced growth feeding programme applied during the pre-weaning period. *J.*403 *Dairy Res.* 76:331–339.

404

405 Weller, M. M. D. C. A., R. L. Albino, M. I. Marcondes, W. Silva, K.M. Daniels, M. M.

406 Campos, M. S. Duarte, M. L. Mescouto, F. F. Silva, and S. E. F. Guimaraes.

407 2016. Effects of nutrient intake level of same diet on mammary parenchyma

408 growth and gene expression in crossbreed (Holstein x Gyr) prepubertal heifers.

409 *J. Dairy Sci.* 99:9962–9974.

410

411

412

413

414

415

416

417

418

419

420

421

422

423

424

425 **Table 1.** Nutrient composition (DM basis, % unless otherwise noted) of whole milk
 426 (WM), milk replacer powder (MRP), starter, corn silage, and treatments

Item	WM	MRP ¹	Starter	Corn silage	Treatment (% TS in whole milk)			
					13.5	16.1	18.2	20.4
					DM ²	12.6	94.7	89.3
CP	25.6	20.0	21.2	6.7	25.2	23.8	23.2	22.9
Ether extract	33.0	13.4	2.1	3.6	33.0	28.6	26.0	23.7
Ash	–	7.3	11.9	5.8	5.8	5.6	5.5	5.3
NDF	–	–	23.5	56.7	–	–	–	–
ADF	–	–	10.1	28.6	–	–	–	–
Gross energy (Mcal/kg)	–	4.5	3.7	4.1	5.8	5.7	5.6	5.6
Lactose ³	33.9	47.0	–	–	31.5	39.6	42.5	44.8
Calcium	–	1.1	1.5	0.2	1.1	1.0	1.0	1.0
Phosphorus	–	0.5	0.5	0.2	0.8	0.8	0.7	0.7
Magnesium	–	0.1	0.3	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1

427 ¹Basic composition: whey, lactose-free whey, lipids of plant origin, wheat gluten
 428 hydrolyzate, folic acid, nicotinic acid, pantothenic acid, betaine, biotin, iron oxide,
 429 magnesium oxide, zinc oxide, sodium selenite, copper sulfate, manganese sulfate,
 430 vitamin A, vitamin B1, vitamin B12, vitamin B2, vitamin B6, vitamin C, vitamin D3,

431 vitamin E, vitamin K, and probiotic additive (*Enterococcus faecium* and *Lactobacillus*
432 *rhamnosus*).

433 ² As fed basis.

434 ³Lactose % of treatments = 100 – CP% - Ether extract % - Ash% - 2 (Drackley, 2008).

435

436 **Table 2.** Average body weight (kg), parenchyma (PAR) area (mm²/gland), circularity and average number of pixels from 5^a to 11^a wk of age in
 437 heifers (n = 60) fed different TS concentrations in whole milk (WM) during the preweaning period

Item	Treatment (% TS in WM)				<i>P</i> -value ¹							SEM
	13.5	16.1	18.2	20.4	T	W	MG	TxW ⁴	TxMG	WxMG	TxWxMG	
Body weight (kg) ²	66.5	70.4	72.5	75.0	0.01	0.01	-	0.01	-	-	-	0.49
Parenchyma area (mm ² /gland)	28.1	31.1	28.8	32.7	0.43	0.01	0.01	0.01	0.37	0.02	0.98	0.67
Circularity	0.62	0.63	0.60	0.61	0.32	0.01	0.01	0.11	0.73	0.35	0.84	0.004
Average pixel value	68170	64822	67337	68332	0.38	0.27	0.63	0.65	0.93	0.77	0.85	431.49

438 ¹T = treatment effect; W = week effect; MG = mammary quarter effect; T x W = treatment by week interaction; T x MG = treatment by
 439 mammary gland interaction; W x MG = week by mammary gland interaction; T x W x MG = treatment by week by mammary quarter
 440 interaction.

441 ²Linear effect of treatment ($P \leq 0.05$).

442

443 **Table 3.** Interaction between treatment and week for parenchyma area (mm²) in heifers
 444 (n = 60) fed different TS concentrations in whole milk (WM) during the preweaning
 445 period

Week	Treatment (% TS in WM)				SEM	Contrast, <i>P</i> -value	
	13.5	16.1	18.2	20.4		Linear	Quadratic
Wk 5	12.1	10.7	10.2	12.5	0.42	0.79	0.03
Wk 6	16.6	14.7	15.2	17.7	0.68	0.52	0.11
Wk 7	25.0	23.8	21.1	26.6	1.05	0.81	0.11
Wk 8	26.9	28.1	27.0	31.1	0.90	0.17	0.41
Wk 9	30.3	31.8	31.2	35.8	1.00	0.08	0.43
Wk 10	37.7	45.1	41.0	41.5	1.36	0.56	0.20
Wk 11	47.5	62.0	55.2	63.1	1.95	0.02	0.40

446

447

448

449

450

451

452

453

454

455

456 **Table 4.** Interaction between mammary gland and week for parenchyma area
 457 (mm²/gland) in heifers (n = 60) fed different TS concentrations in whole milk during the
 458 preweaning period

Week	Mammary gland		<i>P</i> -value
	Front	Rear	
Wk 5	11.3	11.5	0.84
Wk 6	16.3	15.8	0.72
Wk 7	23.8	24.4	0.76
Wk 8	27.4	29.0	0.37
Wk 9	31.0	33.5	0.21
Wk 10	40.2	42.7	0.34
Wk 11	53.5b	61.1a	0.05

459

460

461

462

463

464

465

466

467

468

469

470 **Table 5.** Average palpation scores in heifers (n = 60) fed different TS concentrations in
 471 whole milk (WM) during the preweaning period

Week	Treatment (% TS in WM)				<i>P</i> -value	SEM
	13.50	16.10	18.20	20.40		
Wk 5	2.4	2.2	2.4	2.6	0.47	0.09
Wk 6	2.9	2.8	2.9	3.1	0.63	0.10
Wk 7	3.6	3.7	3.5	3.8	0.88	0.10
Wk 8	3.6	4.0	3.8	4.4	0.09	0.09
Wk 9	4.2	4.0	4.3	4.6	0.26	0.10
Wk 10	4.3	4.9	4.6	4.9	0.16	0.09
Wk 11	4.8	5.4	5.3	5.3	0.16	0.10

472

473

474

475

476

477

478

479

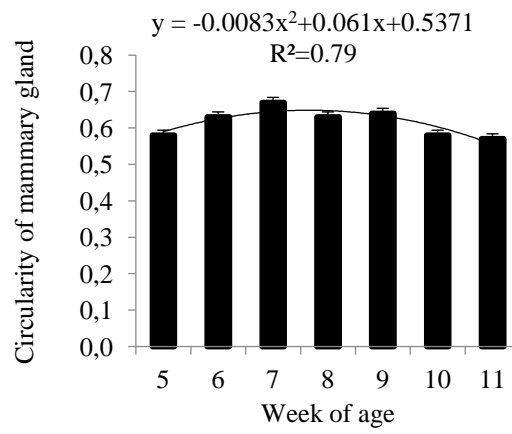
480

481

482

483

484 **Figure 1.** Circularity of mammary gland in heifers fed different TS concentrations
485 (13.5, 16.1, 18.2, and 20.4%) in whole milk during the preweaning period. Error bars
486 represent SE.



487

488 **Furini. Figure 1.**