

RAFAELLA HORSTMANN

**EFEITO DO ÁCIDO ESTEÁRICO (C18:0) SOBRE A PRODUÇÃO,
COMPOSIÇÃO, PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE E EXPRESSÃO DE
GENES LIPOGÊNICOS EM OVELHAS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, Área de Concentração: Produção Animal.

Orientador: Dimas Estrasulas de Oliveira

LAGES

2019

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UEDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Horstmann, Rafaella

Efeito do ácido esteárico (C18:0) sobre a produção, composição, perfil de ácidos graxos do leite e expressão de genes lipogênicos em ovelhas. / Rafaella Horstmann. -- 2019. 65 p.

Orientador: Dimas Estrasulas de Oliveira
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação , Lages, 2019.

1. Ovelha leiteira. 2. Ácido graxo saturado. 3. Lipogênese.
I. Oliveira, Dimas Estrasulas de . II. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação . III. Título.

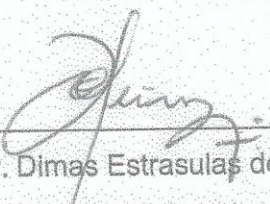
RAFAELLA HORSTMANN

**EFEITO DO ÁCIDO ESTEÁRICO (C18:0) SOBRE A PRODUÇÃO,
COMPOSIÇÃO, PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE E EXPRESSÃO DE
GENES LIPOGÊNICOS EM OVELHAS**


Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, Área de Concentração: Produção Animal.

Banca examinadora:


Orientador: _____


Zootecnista, Prof. Dr. Dimas Estrasulas de Oliveira
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Membro: _____


Zootecnista, Prof. Dr. Henrique M. N. Ribeiro Filho
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Membro: _____


Zootecnista, Prof. Dr. Cláudio Vaz Di Mambro Ribeiro
Universidade Federal da Bahia - UFBA

Lages, 22 de fevereiro de 2019.

*Aos meus pais, com todo
o meu amor e gratidão, por me
permitirem chegar até aqui.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por guiar meus caminhos e ser meu amparo em todos os momentos.

Aos meus pais, Reginaldo e Rubia, à quem devo todas as minhas conquistas por dedicarem suas vidas à minha formação pessoal e profissional. Também ao meu irmão, Bruno, pela compreensão e carinho.

Aos meus avós, maiores incentivadores do meu crescimento profissional, por todo o amor e proteção. Aos meus tios Junior e Caroline, e as meninas, Duda e Marcela, por me receberem em sua casa e por compreenderem minha rotina.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Dimas Estrasulas de Oliveira, ao qual nutro profunda admiração pela excelência profissional, valores éticos e conduta pessoal.

Agradeço pela oportunidade, confiança e por todo o crescimento profissional que adquiri seguindo seus passos.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Ciência Animal – UDESC, em especial aos professores, Dr. Henrique M. N. Ribeiro Filho, Dr. André Thaler Neto, Dr. André Fischer Sbrissia e que se estende também ao meu orientador, por compartilharem o conhecimento de forma generosa e livre de vaidades, atuando com integridade e compromisso com a produção animal.

As colegas do NUTRIGER, Eveline C. Sandri, Evelyn Drielle da Silva, Georgia C. de Aguiar, Charline G. Padilha, Daniella C. Bessani e Laís P. Batalha, por toda dedicação em prol do grupo de pesquisa, por toda a ajuda, aprendizado e bom convívio que tivemos trabalhando juntas.

Aos amigos Georgia, Roberto e Maurício, que estiveram sempre comigo e deram um significado especial aos dias vividos aqui, serei sempre grata pelo destino que cruzou nossos caminhos e nos fez construir essa amizade.

Aos também amigos com os quais passei muitos momentos felizes, Charline, Dani, Marie, Fábio, Luis Henrique, Mariana, Laiz, Tiago, Laís, Angélica, Marcos e Biasiolo, pela troca de experiências, boas conversas e descontração.

Aos mestres e amigos, professores Dr. Sergio A. F. de Quadros e Dr. Marcio C. Pereira, pelo incentivo ao ingresso no mestrado, pela inspiração e contribuição profissional dadas pelos seus exemplos.

Ao CEDIMA e LABHEV, por cederem gentilmente seus espaços e equipamentos para a realização das análises. Em especial ao Prof. Dr. Ubirajara M. da Costa, por estar sempre disposto a nos ajudar.

Ao Prof. Dr. Cláudio Vaz Di Mambro Ribeiro (UFB) e sua equipe, pela realização das análises cromatográficas deste estudo.

À Fazenda Estrela da Serra e seus funcionários, por abrirem suas portas para a realização deste trabalho. Especialmente, à família Gregianin, pela confiança e por nos acolher no período experimental de forma tão carinhosa.

Ao Programa de Bolsas de Monitoria de Pós-Graduação – PROMOP da Universidade do Estado de Santa Catarina, pelo período de concessão da bolsa. À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos. Este trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)

- Código de Financiamento 001.

“A maior recompensa pelo trabalho de uma pessoa não é o que ela ganha com isso, mas quem ela se torna por isso”. J. Ruskin.

“Nem todos irão entender a sua jornada. Mas, tudo bem. Não é a deles, é a sua”. Z. Dean.

RESUMO

HORSTMANN, Rafaella. Efeito do ácido esteárico (C18:0) sobre a produção, composição, perfil de ácidos graxos do leite e expressão de genes lipogênicos em ovelhas. p.65. **Dissertação** (Mestre em Ciência Animal – Área: Produção Animal). Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Lages, 2019.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação com ácido esteárico (C18:0) sobre a produção, composição, perfil de ácidos graxos do leite e expressão de genes envolvidos na síntese lipídica da glândula mamária de ovelhas lactantes. Foram utilizadas 30 ovelhas primíparas e múltiparas Lacaune ($66,5 \pm 9,43$ kg), em final de lactação (122 ± 12 DEL), produzindo $1,01 \pm 0,3$ kg de leite/dia. O período experimental foi de 21 dias, sendo 7 dias de adaptação e 14 dias de coleta de dados, em um delineamento inteiramente casualizado. Os tratamentos foram: Controle e C18:0 (28 g/animal/d de C18:0). Quando comparado ao Controle, C18:0 reduziu o consumo de matéria seca (CMS) de silagem em 13,1% ($P = 0,0003$) sem efeitos sobre o peso vivo (PV) e escore de condição corporal (ECC). O C18:0 diminuiu a produção de leite (8,1%, $P = 0,05$), a produção de lactose (3,3%, $P = 0,0004$) e o teor de lactose (3,4%, $P = 0,0002$), em comparação ao Controle. Não foram observados efeitos de tratamento sobre a produção e teor de gordura, proteína e sólidos totais. A expressão gênica de acetil-CoA carboxilase alfa transcrita do Promotor II (ACACA α PII) e sintase de ácidos graxos (FASN) foram reduzidas em 30% ($P = 0,02$) e 26,1% ($P = 0,04$), respectivamente. A suplementação com C18:0 não promove efeitos sobre o teor de gordura no leite de ovelhas em final de lactação e reduz o CMS, a produção de leite, os teores de lactose e a expressão de genes envolvidos na síntese de *novo* de ácidos graxos.

Palavras-chave: Ovelha leiteira; ácido graxo saturado; lipogênese.

ABSTRACT

HORSTMANN, Rafaella. Effect of stearic acid (C18:0) on the production, composition, fatty acid profile of milk and expression of lipogenic genes in sheep. p.65. **Dissertation** (Master in Animal Science – Area: Animal Production). Santa Catarina State University. Program in Animal Science. Lages, 2019.

The objective of this work was to evaluate the effect of supplementation with stearic acid (C18:0) on the yield, composition, milk fatty acid profile and expression of genes involved in the lipid synthesis in the mammary gland of lactating ewes. Thirty Lacaune primiparous and multiparous ewes (66.5 ± 9.43 kg) were used at the late lactation (122 ± 12 DIM), producing 1.01 ± 0.3 kg milk/d. The experimental period was 21 days, with 7 days of adaptation and 14 days of data collection, in a completely randomized design. Treatments were: Control and C18:0 (28 g/ewe/d C18:0). When compared to the control, C18:0 reduced the dry matter intake (DMI) of silage (13.1%, $P = 0.0003$) without effects on body weight (BW) and body score condition (BSC). The C18:0 treatment decreased milk yield (8.1%, $P = 0.05$), lactose yield (3.3%, $P = 0.0004$) and lactose content (3.4% $P = 0.0002$), compared to Control. No treatment effects were observed for the yield and fat content, protein and total solids. The gene expression of acetyl-CoA carboxylase alpha transcribed from Promoter II (ACACA α PII) and fatty acid synthase (FASN) were reduced by 30% ($P = 0.02$) and 26.1% ($P = 0.04$), respectively. Supplementation with C18:0 have no effect on fat milk content in late lactating ewes and reduces DMI, milk yield, lactose content and expression of genes involved in *de novo* fatty acid synthesis.

Keywords: Dairy ewe; Saturated fatty acid; Lipogenesis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Médias dos teores de gordura no leite (%) ao longo do período de coleta de dados (dias 8 a 21) para ambos os tratamentos46
- Figura 2. Expressão gênica dos genes da síntese de *novo* (a) ACACA α PII e (b) FASN na glândula mamária de ovelhas lactantes suplementadas com C18:0¹ comparadas ao Controle48
- Figura 3. Expressão gênica dos genes (a) CD36, (b) FABP3, c) FABP4 e na glândula mamária de ovelhas lactantes suplementadas com C18:0 comparadas ao Controle 48
- Figura 4. Expressão gênica dos genes (a) AGPAT6, (b) DGAT1, c) GPAT e na glândula mamária de ovelhas lactantes suplementadas com C18:0 comparadas ao Controle.....49

LISTA DE ABREVIATURAS

ACACA α	Acetil-CoA carboxilase alfa
AG	Ácido graxo
AGCL	Ácido graxo de cadeia longa
AGMI	Ácido graxo monoinsaturado
AGPI	Ácido graxo poliinsaturado
ATP	Adenosina trifosfato
BHBA	Beta-hidroxibutirato
CLA	Ácido linoleico conjugado
CMS	Consumo de matéria seca
CNF	Carboidrato não-fibroso
CO ₂	Dióxido de carbono
DGL	Depressão de gordura do leite
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
ECC	Escore de condição corporal
EE	Extrato etéreo
EMAG	Ésteres metílicos de ácido graxo
EPM	Erro padrão da média
FABP	Proteína ligadora de ácido graxo
FASN	Ácido graxo sintase
CD36	Translocador de ácidos graxos - Molécula CD36
FDA	Fibra em detergente neutro
FDN	Fibra em detergente ácido
GPAT	Glicerol-3 fosfato acil transferase
LPL	Lipase lipoproteica
MM	Matéria mineral
MS	Matéria seca
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NRC	National Research Council
PB	Proteína bruta
q-RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
PPAR	Receptores ativados por proliferadores de peroxissomo
PV	Peso vivo
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
SCD	Estearoil-CoA dessaturase
SREBP	Proteína de ligação ao elemento regulatório de esterol
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição bromatológica da dieta experimental.....	39
Tabela 2. Composição lipídica do suplemento com C18:0.....	40
Tabela 3. Sequência dos <i>primers</i> ovinos utilizados na análise de RT-qPCR.....	43
Tabela 4. Efeito da suplementação com C18:0 sobre a produção, composição do leite e desempenho animal de ovelhas Lacaune em final de lactação.....	45
Tabela 5. Efeito da suplementação com C18:0 sobre o perfil de ácidos graxos no leite de ovelhas Lacaune em final de lactação.....	47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	Perspectivas sobre a nutrigenômica na produção de leite ovino.....	25
2.2	Metabolismo ruminal de lipídeos	26
2.2.1	Absorção e utilização de ácidos graxos	26
2.3	Metabolismo de ácidos graxos	27
2.3.1	Síntese de gordura na glândula mamária.....	27
2.4	Atividade gênica na síntese lipídica da glândula mamária	28
2.4.1	Lipogênese - síntese <i>de novo</i> de ácidos graxos	29
2.4.2	Utilização e absorção de ácidos graxos pré-formados.....	29
2.4.3	Dessaturação de ácidos graxos	30
2.4.4	Síntese de triglicerídeos	30
2.4.5	Principais reguladores de genes lipogênicos	31
2.5	Suplementação lipídica na dieta de ruminantes	32
2.5.1	Utilização de C18:0 como suplemento lipídico	32
3	HIPÓTESE	35
4	OBJETIVO	37
5	MATERIAL E MÉTODOS	39
5.1	Animais, tratamentos e deLINEAMENTO experimental	39
5.2	Produção e composição de leite	40
5.2.1	Perfil de ácidos graxos do leite.....	41
5.3	Biópsias de glândula mamária	41
5.4	Extração de RNA, síntese de DNA complementar (cDNA) e PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR).....	42
5.5	Cálculos.....	43
5.6	Análise estatística	44
6	RESULTADOS.....	45
6.1	Produção e composição do leite e desempenho animal	45
6.2	Perfil de ácidos graxos do leite e expressão gênica na glândula mamária	46

7	DISCUSSÃO.....	51
8	CONCLUSÕES.....	57
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1 INTRODUÇÃO

Os suplementos lipídicos foram inicialmente utilizados para incrementar o valor energético das dietas, na busca de satisfazer as exigências nutricionais de animais em sistemas de criação intensivos (ENJALBERT et al., 2017). No entanto, outros benefícios, como aumentos produção de leite, de gordura no leite, ganho de peso (LOFTEN, 2014) e modificações no perfil de ácidos graxos – AG's (BOERMAN, SOUZA e LOCK, 2017) já são associados ao uso desse tipo de suplementação.

Dentre os tipos de suplementos, grande importância tem se dado ao uso de fontes de gordura saturada, com o objetivo de prover aumentos na produção de leite e no teor de gordura do leite (LOFTEN et al., 2014). Desses têm se destacado, recentemente, o uso de fontes ricas em ácido palmítico (C16:0) e/ou esteárico (C18:0) (LOFTEN et al., 2014; BOERMAN, SOUZA e LOCK, 2017; SOUZA, PRESEAUT e LOCK, 2018), pela maior contribuição de ambos na regulação do metabolismo e transcrição gênica em ruminantes, em comparação aos AG's insaturados (BIONAZ, THERING e LOOR, 2011).

Atualmente, técnicas moleculares têm expandido a percepção à cerca dos mecanismos moleculares que permeiam a regulação da lipogênese mamária em ruminantes, facilitando o desenvolvimento de estratégias que otimizem e modulem a produção e a qualidade da gordura do leite (SHINGFIELD et al., 2010). Mas apesar desses avanços, os mecanismos que afetam a expressão gênica na modificação do perfil de AG's no leite permanecem pouco compreendidos (CASTRO-CARRERA et al., 2015).

Estudos sobre respostas produtivas e mecanismos moleculares em decorrência da suplementação com AG's saturados na dieta animal têm dado maior ênfase à respostas com vacas (INVERNIZZI et al., 2010; RICO, ALLEN e LOCK, 2014; PIANTONI, LOCK e ALLEN, 2015; BOERMAN, SOUZA e LOCK, 2017). As respostas com ovelhas são muito mais limitadas, apresentam resultados variados e, geralmente, se referem à tentativa de mitigação da síndrome de depressão de gordura no leite (TORAL et al., 2015; TORAL, HERVÁS e FRUTOS, 2018), e embora os ruminantes compartilhem muitas similaridades, existem diferenças sobre o metabolismo lipídico ruminal e mamário (CHILLIARD et al., 2003; SHINGFIELD et al., 2010).

Por esses motivos, este estudo foi elaborado visando a obtenção de respostas sobre os mecanismos que regulam a lipogênese mamária em relação aos efeitos da adição de uma fonte gordura saturada (C18:0) à dieta de ovelhas leiteiras, para auxiliar na compreensão dos processos biológicos da lactação e no aprimoramento de técnicas nutricionais de manipulação da produção e perfil de ácidos graxos no leite.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PERSPECTIVAS SOBRE A NUTRIGENÔMICA NA PRODUÇÃO DE LEITE OVINO

Os países latino-americanos têm buscado, recentemente, o desenvolvimento da indústria leiteira ovina, com o objetivo de prover melhorias na eficiência produtiva e fornecer produtos lácteos de alta qualidade (ANGELES-HERNANDEZ et al., 2018). Nesse sentido, grande importância têm se dado às ferramentas que promovam um aumento no teor de gordura no leite e, conseqüentemente, na sua produção. A gordura é o constituinte que contribui com a maior parte da densidade energética no leite, sendo responsável por propriedades físicas, organolépticas e de manufaturamento que melhoram a qualidade dos produtos lácteos (JENSEN, 2002).

Vantagens ou desvantagens econômicas e produtivas podem existir para a produção de leite com um teor específico de gordura e muitos países impõem limites mínimos estabelecidos para o teor de gordura no leite (TORAL et al., 2015). Por esse e outros motivos, há mais de três décadas há interesse em entender a influência da dieta na regulação da síntese, secreção e composição da gordura do leite (BAUMAN; GRIINARI, 2003; SHINGFIELD et al., 2010). Dessa forma, muitas melhorias têm sido desenvolvidas nas áreas genéticas e produtivas para que haja um aumento na produtividade leiteira de forma a prover retorno financeiro aos produtores de ovelhas leiteiras (ANGELES-HERNANDEZ et al., 2018).

O desenvolvimento de práticas alimentares e de manejo para alterar a composição e melhorar a produção de gordura no leite é possível através do entendimento sobre a influência nutricional na regulação da secreção lipídica (HARVATINE, BOISCLAIR, BAUMAN, 2008; SHINGFIELD et al., 2010). Sob esse aspecto, a nutrição promove de forma eficiente, uma rápida e reversível modulação da síntese e composição de gordura, regulando a secreção e a composição de gordura no leite (CHILLIARD et al., 2007).

A nutrição tradicional tem sido ancorada principalmente à variáveis observáveis, como efeitos diretos da nutrição e manejo sobre respostas produtivas, no entanto, avanços na área de biologia molecular têm provido novas ferramentas para a avaliação do efeitos dos nutrientes sob respostas fisiológicas (OSORIO et al., 2017). O reconhecimento de muitas sequências de cDNA (ácido desoxirribonucleico

complementar) de genes lipogênicos tem permitido a determinação de efeitos dietéticos sobre a expressão de RNAm desses genes no tecido adiposo subcutâneo (TSIPLAKOU et al., 2011) e mamário (CASTRO-CARRERA et al., 2015; FRUTOS, TORAL e HERVÁS, 2017) de pequenos ruminantes. No entanto, apesar dos avanços obtidos até o momento, o conhecimento no que concerne a nutrigenômica e o metabolismo de lipídeos em pequenos ruminantes não é somente pouco difundido como também inconsistente (SHINGFIELD, BONNET e SCOLLAN, 2013).

2.2 METABOLISMO RUMINAL DE LIPÍDEOS

Ruminantes alimentados com pastagens/forragens e concentrados, consomem gordura na forma de galactolipídeos e triglicerídeos. Embora essas fontes forneçam ácidos graxos (AG's) insaturados (ácido linolênico - C18:3 em forragens e ácido linoleico - C18:2, em grãos), a gordura do leite é composta, predominantemente, por ácidos graxos saturados (\pm 70%), sendo os ácidos, palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0), os AG's predominantes (JENSEN, 2002).

A extensa modificação dos lipídeos no rúmen ocorre em dois processos principais: a hidrólise das ligações éster dos galactolipídeos e triglicerídeos e a biohidrogenação dos ácidos graxos insaturados que ficam livres após a hidrólise. O processo de biohidrogenação resulta na conversão de ácidos graxos insaturados em saturados, principalmente o ácido esteárico C18:0, além de intermediários que podem ter efeitos benéficos a saúde humana (CLA *cis*-9, *trans*-11) e ácido vacênico (C18:1 *trans*-11), ou àqueles relacionados à depressão de gordura do leite como o ácido linoleico conjugado (CLA *trans*-10, *cis*-12). Os ácidos linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3) são os principais substratos para a biohidrogenação, que atinge taxas próximas de 70-95% e 85-100% para C18:2 e C18:3, respectivamente (JENKINS et al., 2008).

2.2.1 Absorção e utilização de ácidos graxos

Os ácidos graxos que chegam ao duodeno após sofrerem modificações no rúmen são, principalmente, ácidos graxos livres (80-90%) aderidos às partículas dos

alimentos e destes, aproximadamente 65% são saturados (PALMQUIST; JENKINS, 1980; LOCK et al., 2006). No jejuno, por meio da ação da bile e do suco pancreático os AG's são solubilizados, desprendidos das partículas alimentares e absorvidos (MOORE; CHRISTIE, 1984). Nos enterócitos, ácidos graxos com cadeia maior que 10 carbonos são re-esterificados ao glicerol, formando os triglicerídeos que são acrescidos de outros compostos lipídicos (fosfolipídeos, colesterol livre e esterificado) mais apoproteínas específicas, formando quilomícrons e VLDL, a principal lipoproteína em ruminantes (BAUCHART, 1993), sendo liberados no sistema linfático e na corrente sanguínea (MOORE; CHRISTIE, 1984). Os ácidos graxos com cadeia menor que 10 carbonos, saem do enterócito para a circulação sanguínea sendo ligados a albumina.

A maior parte dos ácidos graxos de cadeia longa e de C18:0 na gordura do leite são oriundos dos triglicerídeos das lipoproteínas da corrente sanguínea (PALMQUIST, 2006). Apesar disso, os mecanismos que compreendem o transporte de ácidos graxos da circulação para a glândula mamária ainda não são completamente elucidados (PALMQUIST, 2006).

2.3 METABOLISMO DE ÁCIDOS GRAXOS

Os maiores sítios do metabolismo de AG's são o fígado, tecido adiposo, e durante a lactação, a glândula mamária (TSIPLAKOU et al., 2011). O tecido adiposo tem como maior função prover energia na forma de ácidos graxos aos demais órgãos do organismo e uma maior proporção dessa energia na forma de AG's é exigida pela glândula mamária durante a lactação (TSIPLAKOU et al., 2011). O transporte de AG's do tecido adiposo para a glândula mamária é uma importante fonte precursora de triglicerídeos, não somente durante o jejum mas também em caso de déficit de gordura na dieta (RUDOLPH et al., 2007). Menos de 10% dos ácidos graxos pré-formados na gordura do leite são derivados da mobilização no tecido adiposo, no entanto, essa proporção aumenta significativamente em período de balanço energético negativo (BAUMAN; GRIINARI, 2001).

2.3.1 Síntese de gordura na glândula mamária

Em mamíferos não lactantes, o fígado e o tecido adiposo são os maiores órgãos que sintetizam lipídeos, no entanto, suas produções são discretas quando comparadas à glândula mamária lactante (BAUMAN; HARVATINE; LOCK, 2011), considerada por Rudolph et al. (2007) como uma “máquina” de sintetizar gordura. As células epiteliais mamárias possuem uma expressiva capacidade de converter nutrientes circulantes em componentes do leite (WANG et al., 2015) e secretam gotículas de gordura, as quais são compostas majoritariamente de triglicerídeos (BIONAZ; LOOR, 2008).

A gordura no leite de ruminantes deriva de duas fontes: dos ácidos graxos pré-formados (>C16:0) circulantes na corrente sanguínea (aproximadamente 50% dos AG's totais da gordura do leite) originados a partir dos ácidos graxos da dieta que foram absorvidos no intestino delgado ou resultantes de mobilização da gordura corporal; e da síntese *de novo* a partir de substratos oriundos do metabolismo ruminal (acetato e BHBA; MCDONALD et al., 2010) que são as principais fontes de carbono necessárias à síntese de AG's na glândula mamária (AKERS, 2002). Em condições de balanço energético positivo, aproximadamente metade dos AG's no leite são obtidos a partir de síntese *de novo*, 40-45% são oriundos da dieta e menos de 10% derivam de mobilização das reservas corporais (PALMQUIST; JENKINS, 1980).

Os ácidos palmítico, esteárico e oleico representam majoritariamente os ácidos graxos na gordura do leite. No entanto, como o C16:0 e C18:0 apresentam ponto de fusão relativamente alto, para que seja mantida a fluidez faz-se necessária a produção de ácidos graxos monoinsaturados pela ação da enzima *estearoil CoA dessaturase* – SCD convertendo C16:0 e C18:0 em palmitoleico (C16:1 cis-9) e oleico (C18:1 cis-9) (LOCK; DE SOUZA, 2015), respectivamente.

2.4 ATIVIDADE GÊNICA NA SÍNTESE LIPÍDICA DA GLÂNDULA MAMÁRIA

O processo de síntese de gordura no leite de ruminantes é um complexo processo *in vivo* (YANG et al., 2017) coordenado por uma gama de genes que têm funções complementares, os quais englobam funções na lipogênese (síntese *de novo*), na absorção e transporte de ácidos graxos, na síntese de triglicerídeos e na formação das gotículas de gordura (BIONAZ; LOOR, 2008). Os principais processos regulados pela expressão gênica para a síntese lipídica serão discutidos a seguir.

2.4.1 Lipogênese - síntese *de novo* de ácidos graxos

A síntese *de novo* resulta na produção de ácidos graxos de cadeias curta e média e uma parte de AG's de C16:0 (HARVATINE, BOISCLAIR e BAUMAN, 2008). As enzimas acetil-CoA carboxilase alfa (ACACA α) e ácido graxo sintase (FASN), são as principais responsáveis pela lipogênese. O primeiro passo é dado pela ACACA α , envolvendo a adição de um carbono de CO₂ a acetil-CoA e hidrólise de ATP para a formação de malonil-CoA (AKERS, 2002). Já a enzima FASN atua catalisando a síntese de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de acetil-CoA e malonil-CoA de forma dependente de NADPH (SMITH; WITKOWSKI; JOSHI, 2003), sendo essencial para o funcionamento da glândula mamária e da produção de gordura no leite (SUBURU et al., 2014).

ACACA α e FASN assim como as demais enzimas lipogênicas chaves, são reguladas por fatores de transcrição como a família de proteína ligadora do elemento regulatório de esterol (SREBP; EBERLE et al., 2004), onde, particularmente, SREBP1 tem importante regulação na síntese de gordura do leite (HARVATINE e BAUMAN, 2006; RUDOLPH et al., 2010).

2.4.2 Utilização e absorção de ácidos graxos pré-formados

Além das principais enzimas da síntese *de novo* (ACACA α e FASN), os tecidos mamário e adiposo secretam a lipoproteína lipase (LPL). A LPL localizada nos capilares das células epiteliais mamárias (RUDOLPH; NEVILLE; ANDERSON, 2007) permite que esses tecidos obtenham os ácidos graxos dos triglicerídeos derivados dos quilomícrons e do VLDL, secretado pelas células do intestino e fígado (TSIPLAKOU et al., 2011), liberando AG's livres, glicerol e monoacilglicerol (RUDOLPH; NEVILLE; ANDERSON, 2007). Os AG's podem então ser dessaturados por ação da enzima estearoil-CoA dessaturase (SCD), resultando na síntese de ácidos graxos insaturados "*cis*-9" (BERNARD; LEROUX; CHILLIARD, 2006).

A captação dos AG's pelas células epiteliais mamárias pode ocorrer por difusão ou via transporte saturável (BERNARD; LEROUX; CHILLIARD, 2006), necessitando de transportadores específicos. Palmquist (2006) sugeriu que as

proteínas que desempenham um papel nesse transporte são as translocadoras de ácidos graxos (CD36) localizada no epitélio mamário e a proteína ligadora de ácidos graxos (FABP).

2.4.3 Dessaturação de ácidos graxos

Na glândula mamária, os ácidos graxos oriundos da corrente sanguínea são modificados por meio de um processo de dessaturação, o que explica a presença da maioria dos ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) encontrados na gordura do leite (KINSELLA, 1970). A SCD é responsável tanto pela manutenção da fluidez do leite (LOCK; DE SOUZA, 2015) quanto para a síntese de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI's), sendo responsável por introduzir uma dupla ligação *cis* entre os carbonos 9 e 10 dos AG's, correspondendo a maior proporção de *cis*-9 *trans*-11 CLA e parte considerável do *cis*-9 C18:1 presentes no leite (BERNARD et al., 2013). A enzima SCD é a responsável por esses importantes processos, e possui alta atividade nos tecidos mamário, adiposo e, em menor escala, no tecido intestinal (PALMQUIST, 2006). Os níveis de dessaturação de C18:0 na glândula mamária estão, segundo Glasser et al. (2008), positiva e linearmente relacionados ao nível de captação mamária de ácido esteárico.

2.4.4 Síntese de triglicerídeos

O passo final na síntese de gordura da glândula mamária, os AG's são esterificados a glicerol via glicerol-3-fosfato aciltransferase (GPAT), acilglicerol-3-fosfato-aciltransferase (AGPAT) e diacilglicerol aciltransferase (DGAT) e os triglicerídeos são secretados no leite como glóbulos de gordura (BERNARD; LEROUX; CHILLIARD, 2006).

A GPAT promove a acetilação de glicerol-3-fosfato, sendo o primeiro passo para a síntese de triglicerídeos (GONZALEZ-BARO, LEWIN e COLEMAN, 2006). No passo subsequente, a AGPAT é responsável pela acetilação para formação de

diacilglicerol que posteriormente é convertido em triacilglicerol por ação da DGAT (SHINDOU et al., 2008).

A enzima DGAT é responsável por esterificar ácidos graxos de cadeia longa e curta na posição sn-3. Apesar da regulação total da atividade ter sido relatada no fígado e tecido adiposo (PALMQUIST, 2006) e haver pouca informação disponível sobre sua atividade na glândula mamária, é provável que a DGAT esteja altamente ativa na glândula mamária lactante devido a maior disponibilidade de ácidos graxos.

2.4.5 Principais reguladores de genes lipogênicos

A família PPAR (receptores ativados por proliferadores de peroxissomo) atua como mediadora das mudanças transcricionais adaptativas que ocorrem em função da lactação na glândula mamária ovina (Osorio et al., 2017), assim como na glândula mamária bovina (BIONAZ, THERING e LOOR, 2011). Existem três isoformas de PPAR, α , β , e γ , eles atuam no controle da expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico quanto no processo inflamatório. Uma maior abundância de RNAm de PPAR γ é encontrada no tecido adiposo (BIONAZ et al., 2013; SHI et al., 2013a). A atividade transcricional de PPAR γ está associada positivamente com a regulação gênica da síntese *de novo* (ACACA α , FASN) e da dessaturação de ácidos graxos (SCD) de cadeia longa. O estudo de Barber et al., (2003) com ovelhas leiteiras confirmou a atividade da SREBP1 como chave na regulação da síntese lipídica na glândula mamária de pequenos ruminantes. Estudos também demonstraram que PPAR γ tem importante função no controle do metabolismo lipídico da glândula mamária de cabras (KANG et al., 2015; SHI et al., 2013b).

O fator de transcrição SREBP1 atua como principal regulador da síntese lipídica (EBERLE et al., 2004), tendo sua importância destacada na síntese de lipídeos em bovinos e camundongos (HARVATINE; BAUMAN, 2006; RUDOLPH et al., 2010). Além disso, em vacas leiteiras, a SREBP1 é o fator de transcrição chave para a ativação transcricional na síntese de gordura no leite no início e durante a lactação (LOOR; BIONAZ; DRACKLEY, 2013). Num experimento com ratos

verificou-se que a inibição da atividade da SREBP1 ocasiona a diminuição de 41% da concentração de gordura no leite (MCDONALD et al., 2010).

2.5 SUPLEMENTAÇÃO LIPÍDICA NA DIETA DE RUMINANTES

A suplementação com gordura na dieta de ruminantes é importante, particularmente, em animais de alta produção, para os quais o atendimento das exigências em energia é prejudicado pela restrição da ingestão nos períodos pré e pós-parto. Além disso, em períodos de balanço energético positivo, a suplementação lipídica pode promover aumentos na produção de leite, de gordura no leite e ganho de peso (LOFTEN et al., 2014). Apesar de grande parte dos suplementos lipídicos disponíveis comercialmente serem compostos por misturas de AG's, os suplementos lipídicos ricos em ácidos graxos individuais estão cada vez mais disponíveis no mercado. Em vacas lactantes, atualmente, nos estudos sobre o efeito individual da suplementação com ácidos graxos saturados maior foco tem sido dado ao ácido palmítico (C16:0, PIANTONI et al., 2013; RICO et al., 2017; SOUZA e LOCK, 2019). Por outro lado, embora com efeitos positivos, estudos sobre os efeitos da suplementação individual de C18:0 sobre produção e composição do leite (STEELE; MOORE, 1968; STEELE, 1969; PIANTONI, LOCK e ALLEN, 2015) e a digestibilidade de nutrientes (PIANTONI, LOCK e ALLEN, 2015) têm tido menor ênfase e resultados mais variados.

2.5.1 Utilização de C18:0 como suplemento lipídico

As respostas produtivas com a utilização de fontes puras de C18:0 foram descritas em poucos estudos com grande variabilidade nas respostas encontradas (STEELE e MOORE, 1968; STEELE, 1969; PIANTONI, LOCK e ALLEN, 2015; BOERMAN, SOUZA E LOCK, 2017). O tipo e o nível de inclusão dos suplementos utilizados, a interação do suplemento com os demais componentes da dieta e o estado fisiológico dos animais, são possíveis causas da variabilidade entre os estudos.

Utilizando uma fonte relativamente pura de C18:0 na dieta de vacas, Steele e Moore (1968), observaram um aumento na produção de gordura no leite e nenhum

efeito na produção de leite. Steele (1969), utilizou um nível semelhante de inclusão (85% de C18:0 na dieta de vacas leiteiras, fornecido ~4,2% do consumo de matéria seca), observou um aumento na produção de leite sem efeitos na produção ou concentração de gordura no leite. Piantoni, Lock e Allen (2015) forneceram C18:0 à 2% do consumo diário de MS e observaram um aumento na ingestão de alimentos, produção de leite e de gordura, com as respostas mais evidentes em vacas de maior produtividade.

Enjalbert et al. (2000), mostraram que a suplementação de ácido esteárico na dieta de vacas aumenta a produção de ácidos graxos pré-formados no leite, tendo a composição principal de C18:0 e outros AG's de 18 carbonos com variação no grau de saturação. Boerman, Souza e Lock (2017) utilizaram níveis crescentes (0,80, 1,5 e 2,3%) de inclusão de C18:0 na dieta de vacas lactantes e observaram que com o aumento no nível de suplementação houve aumento no consumo, mas não houve efeitos sobre a produção e componentes do leite. Ainda, o aumento da suplementação reduziu a digestibilidade de C16:0, C18:0 e ácidos graxos totais, resultando em um aumento na concentração de C18:0 e *cis*-9 C18:1 na gordura do leite, mas não suficiente para apresentar efeito sobre a produção de gordura.

Recentemente, Toral, Hervás e Frutos (2018) em um estudo que testou inclusão de 2% da MS de óleo de peixe sozinho ou em combinação com ácido esteárico (C18:0, 2% da MS), em ovelhas lactantes, observaram uma redução de 20% na concentração e produção de gordura no leite, indicando que seu uso não foi capaz de reverter a síndrome de depressão de gordura no leite causada pelo fornecimento de óleo de peixe.

3 HIPÓTESE

A suplementação com ácido esteárico aumenta o teor de gordura no leite, assim como, aumenta o seu conteúdo no perfil de ácidos graxos do leite, afetando positivamente a expressão de genes envolvidos na captação, internalização, dessaturação e síntese de triglicerídeos da glândula mamária ovina.

4 OBJETIVO

Avaliar o efeito da suplementação com ácido esteárico (C18:0) sobre a produção, composição, perfil de ácidos graxos do leite e expressão de genes envolvidos na síntese lipídica da glândula mamária de ovelhas lactantes.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS, TRATAMENTOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade do Estado de Santa Catarina, sob o protocolo nº 8256060618. Foram utilizadas 30 ovelhas Lacaune ($66,5 \pm 9,4$ kg), primíparas (6) e múltíparas (24), em final de lactação (122 ± 12 DEL), produzindo $1,0 \pm 0,3$ kg de leite/dia. O período experimental foi de 21 dias, sendo 7 dias de adaptação e 14 dias de coleta de dados, em um delineamento inteiramente casualizado. O peso vivo (PV) e o escore de condição corporal (ECC) foram medidos ao início e ao final do período experimental.

Os animais foram alocados em baias coletivas para cada tratamento (15 animais por baia), com comedouros individuais onde foram fornecidas as dietas: Controle e C18 (32 g do suplemento de C18:0 com 87% de C18:0). A dieta basal (Tabela 1) foi composta por silagem de milho, milho moído (56%), farelo de soja (40%) e núcleo vitamínico/mineral (4%), formulada de acordo com as recomendações do NRC (2007) e água *ad libitum*. A dieta C18 consistiu em dieta basal + 28 g/dia ($\approx 2\%$ MS) de C18:0 (Prius F100 Nat Dry, Auster Nutrição Animal Ltda.) (Tabela 2), em forma sólida, fornecido completamente misturado ao concentrado.

Tabela 1. Composição bromatológica da dieta experimental

Composição	Silagem de milho	Concentrado
Matéria seca, %	27,2	87,8
Proteína bruta, % MS	6,9	23,3
Extrato etéreo, % MS	3,4	3,8
Matéria mineral, % MS	4,2	8,6
Carboidratos não-fibrosos, % MS ¹	34,3	40,9
Fibra em detergente neutro, % MS	51,1	23,2
Fibra em detergente ácido, % MS	23,3	5,4
Energia Metabolizável, Mcal/Kg MS ²	2,7	3,0

¹ Porcentagem de carboidratos não fibrosos calculados de acordo com o NRC (2001). ² Energia metabolizável (Mcal/kg de MS) calculado de acordo com o NRC (2001).

O tratamento foi fornecido substituindo 32 g de concentrado pela dose de C18:0 (16 g de suplemento por refeição, totalizando 32 g/dia de suplementação)

misturada a 184 g de concentrado de forma a garantir o consumo total da dose de ácido esteárico (28 g de C18:0). Após o consumo total, forneciam-se 300 g restantes completando o fornecimento de concentrado (500 g/refeição).

As ovelhas foram ordenhadas mecanicamente diariamente as 06h00min e as 13h30min. Após a ordenha, os animais permaneceram nas baias onde receberam 500 g de concentrado de forma individual. A silagem de milho foi fornecida a 110% do consumo diário esperado de forma a não restringir o consumo por baia, posteriormente ao consumo total do concentrado. Desta forma, o consumo de concentrado foi calculado individualmente por animal de cada tratamento e o consumo de volumoso calculado por tratamento.

Tabela 2. Composição lipídica do suplemento com C18:0.

Ácidos graxos	%
C4:0	0,12
C14:0	0,08
C15:0	0,03
C16:0	9,68
C17:0	0,15
C18:0	86,98
C20:0	0,61
C21:0	0,02
C22:0	0,41
C23:0	0,04
C24:0	0,14
C18:1 <i>cis</i> -9	0,10
C18:2 <i>cis</i> -6	0,10
AG's Poliinsaturados	0,10
AG's Trans	0
AG's Monoinsaturados	0
AG's Saturados	98,27
AG's Insaturados	0,20
AG's Totais	98,47

¹ Suplemento contendo 87% de C18:0 (Prius F100 Nat Dry, Auster Nutrição Animal Ltda., Hortolândia, São Paulo, Brasil).

5.2 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DE LEITE

A produção (kg/dia) e a composição do leite foram medidas no dia 0 e a cada 2 dias do período experimental. As amostras foram coletadas individualmente

nas duas ordenhas diárias, acondicionadas proporcionalmente em tubos contendo conservante (Bronopol; D & F Control Systems Inc., USA) e armazenadas a 4°C para posterior análise da composição (gordura, proteína, lactose e sólidos totais) determinada por meio do método de análise infravermelho (DairySpec; Bentley Instruments).

5.2.1 Perfil de ácidos graxos do leite

Amostras coletadas no último dia do período experimental foram armazenadas em tubo estéril sem conservante e congeladas a -20°C. Para análise do perfil de AG's, as amostras de leite foram descongeladas e centrifugadas a 3000 RPM por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, a camada superior da gordura foi transferida para um microtubo estéril, congelada e enviada à Universidade Federal da Bahia – UFBA, para a quantificação por cromatografia gasosa. Aproximadamente 50 mg/amostra de gordura foram submetidas a metilação de acordo com O'Fallon et al. (2007). Os ésteres metílicos de ácido graxo foram determinados utilizando cromatógrafo de gás (modelo Focus GC; Thermo Scientific, Milan, Italy), equipado com detector de ionização de chama e coluna capilar de sílica fundida SP-2560 (100 m x 25 mm x 0.2 µm de espessura de filme; Supelco, Bellefonte, Pennsylvania). Hidrogênio foi utilizado como gás carreador (1 ml/min) e nitrogênio como gás auxiliar. As temperaturas do injetor e detector foram ajustadas a 250°C, em razão da taxa de 15:1. A temperatura do forno foi ajustada a 70°C por 4 minutos, aumentando 13°C/min até 175°C, sendo mantida por 27 min, aumentando 4°C/min até 215°C e mantida por mais 31 minutos (Kramer et al., 1997). Os EMAG foram identificados por comparação com três EMAG de referência (Supelco FAME mix #C4-C24, CLA *trans*-9, *cis* 11 #16413, and CLA *trans*-10, *cis* 12 #04397; Sigma Aldrich). Os isômeros *cis/trans*-18:1 foram identificados de acordo com a ordem de eluição reportadas sob as mesmas condições cromatográficas (Kramer et al., 1997).

5.3 BIÓPSIAS DE GLÂNDULA MAMÁRIA

No dia 14 do período experimental, após a ordenha da manhã (2-4 horas) foram realizadas biópsias de tecido mamário em 10 animais de cada tratamento. Previamente ao procedimento, utilizou-se anestesia local com aplicação subdérmica de cloridrato de lidocaína (2 mL/animal) acima do local da incisão. A amostra (~75 mg/biópsia) foi coletada por meio de uma incisão no ponto médio da metade direita do úbere, utilizando instrumento de biópsia de núcleo descartável Bard Max-Core (Bard Biopsy Systems, Covington, GA, USA) com agulha coaxial. Após a coleta, verificou-se a homogeneidade do tecido coletado, procedeu-se lavagem do tecido com soro fisiológico, acondicionamento em criotubos contendo 2 mL de PBS (solução tampão fosfato-salina) e armazenamento em nitrogênio líquido até a extração de RNA. Imediatamente após a retirada do instrumento de biópsia, realizou-se sutura da incisão com Nylon número 1 e administrou-se 2 mL de flunixinina meglumina por animal. Os animais permaneceram em observação por 2 dias e foram ordenhados manualmente para remoção de coágulos pós-procedimento.

5.4 EXTRAÇÃO DE RNA, SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA) E PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (RT-qPCR)

O RNA total foi extraído das amostras de tecido mamário e utilizando o kit RNeasy Lipid Tissue Mini (Qiagen Sciences, USA) com tratamento com DNase (RNase-free DNase set, Qiagen Sciences, USA) direto na coluna para evitar contaminação das amostras por DNA. A concentração e a pureza do RNA (relação 260/280) foram verificadas com o espectrofotômetro (NanoDrop ND2000; NanoDrop Technologies, USA). O RNA total foi transcrito a DNA complementar (cDNA) utilizando kit específico (GoScript™ Reverse Transcription Mix, Random Primers - A2801, Promega, USA). A reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) foi realizada em triplicatas em placas de 48 poços (MicroAmp™, Applied Biosystems, USA), com volume de reação de 15µL e 30 ng of cDNA. A análise quantitativa da RT-qPCR foi realizada utilizando GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, USA) e com uso de primers específicos para cada gene de interesse, em um equipamento StepOne Real-Time (Applied BioSystems, USA). A abundância de mRNA de cada gene de interesse foi medida por PCR quantitativa e os primers estão relacionados na Tabela 2. Os dados obtidos foram analisados pelo software

StepOne 2.1 (Applied Biosystems, USA). Ao final de cada corrida foram geradas curvas de dissociação a fim de verificar a presença de um único produto da reação.

Tabela 3. Sequência dos primers ovinos utilizados na análise de q-RT-PCR.

Gene	Primers ¹	Acesso
ACACA α PII	F: GCCTTGAGCTCTGAGGGCTC R: CACGGAGCCAATTATGAATCG	Ticiani et al. (2016)
FASN	F: GGCCGTCTTTCTGACCAAGA R: CGTGACGCCTTGCTTTTTG	Ticiani et al. (2016)
SCD	F: CCGCCCTGAAATGAGAGATG R: CATGAGGATGATGTTTCTCCAAAC	Sandri et al. (2018)
CD36	F: TGTGTTTGGAGGGATTCT R: CCTTGGCTAGATAACGAACTCTG	Hussein et al. (2013)
FABP3	F: GGACAGCAAGAATTTTCGATGA R: CGATGATTGTGGTAGGCTTG	Hussein et al. (2013)
FABP4	F: ATGGCCAAACCCACTGTGAT R: GGCCCAATTTGAAGGACATCT	NM_001114667.1
GPAT	F: GCATTGGTTCGGTGTAAAGCAT R: TTCTTTCCACTTCAAGGTTGC	Hussein et al. (2013)
AGPAT6	F: ACTTCCAGTACATCAGCCTGCGGC R: CGTGAAAGCGAGAGCTATCCTG	Hussein et al. (2013)
DGAT1	F: CACTGGGACCTGAGGTGTCA R: AACCGTGCGTTGCTTAAGATC	Hussein et al. (2013)
BACT	F: GCCTTTGCCATCACTGCAAT R: TGAGCTCTCCTGCCCTCTTG	Ticiani et al. (2016)
RPS18	F: GCCCTGAGGCTCTCTTCCA R: CGGATGTCGACGTCACTT	Ticiani et al. (2016)

¹ Os *primers* são reportados em sequência 5' – 3'. ACACA α PII: Acetil-CoA carboxilase alfa transcrita do promotor II; FASN: Ácido graxo sintetase; SCD: Esteroil-CoA dessaturase; CD36: Ácido graxo translocase, molécula CD36; FABP3: Proteína ligadora de ácido graxo 3; FABP4: Proteína ligadora de ácido graxo 4; LPL: Lipase lipoprotéica; GPAT: Glicerol-3-fosfato aciltransferase; AGPAT6: Acilglicerolfosfato aciltransferase 6; DGAT1: Diglicerídeo aciltransferase 1; BACT: Beta-actina; RPS18: Proteína Ribossomal S18.

5.5 CÁLCULOS

Foram calculados os índices de dessaturase para três pares de ácidos graxos (C14:1/C14:0, C16:1/C16:0 e C18:1 *cis*-9/C18:0) que representam o produto e substrato da enzima *esteroil CoA dessaturase* – SCD, de acordo com a equação definida por Kelsey et al. (2003), onde: índice de dessaturase = (produto da SCD)/(produto da SCD + substrato da SCD).

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pelo programa estatístico SAS (SAS, 2009) através do procedimento MIXED, a nível de 5% de significância e tendência quando entre 5 e 10%. Os dados de consumo diário de MS, produção e composição do leite foram analisados através do uso de medidas repetidas no tempo com o tratamento como efeito fixo e os animais como efeito aleatório. Para as análises de peso vivo, escore de condição corporal, perfil de ácidos graxos e expressão gênica, o tratamento foi considerado como efeito fixo e os animais como efeito aleatório. A produção e composição do leite no dia 0 “zero” e a média geométrica de genes *housekeeping* (proteína ribossomal S18 e beta-actina) foram usadas como co-variáveis nas suas respectivas análises.

6 RESULTADOS

6.1 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE E DESEMPENHO ANIMAL

A produção, composição do leite e desempenho animal estão apresentadas na Tabela 4. A produção de leite (kg/dia) diminuiu 8,1% ($P = 0,05$) com a suplementação de C18:0 quando comparado ao Controle (Tabela 4). O tratamento com C18:0 diminuiu a produção (kg/dia) e o teor (%) de lactose, em 3,3 ($P = 0,0004$) e 3,4% ($P = 0,0002$), respectivamente, quando comparado ao Controle (Tabela 4).

Tabela 4. Efeito da suplementação com C18:0 sobre a produção, composição do leite e desempenho animal de ovelhas Lacaune em final de lactação.

	Tratamentos ^a			Valor-P ^g		
	Cont.	C18:0	EPM ^f	Trat.	Tempo ^h	Trat. x Tempo ⁱ
Leite, kg/d	1,06	0,97	0,03	0,05	0,02	0,86
Gordura, kg/d	0,07	0,07	0,21	0,25	0,35	0,82
Proteína, kg/d	0,07	0,07	0,56	0,44	<,0001	0,77
Lactose, kg/d	0,070	0,068	0,05	0,0004	<,0001	0,69
Sólidos totais, kg/d	0,26	0,26	0,19	0,92	<,0001	0,98
Gordura, %	6,94	7,17	0,01	0,11	0,003	0,90
Proteína, %	5,06	5,02	0,004	0,46	0,003	0,81
Lactose, %	4,83	4,66	0,003	0,0002	0,08	0,69
Sólidos totais, %	17,93	17,92	0,01	0,98	0,001	0,83
CMSconc, kg/d ^b	0,85	0,85	0,0004	0,97	0,90	0,18
CMSsil kg/d ^c	1,18	1,03	0,34	0,0003	0,12	-
PV, kg ^d	67,02	66,27	0,28	0,63	-	-
ECC ^e	3,05	3,08	0,04	0,87	-	-

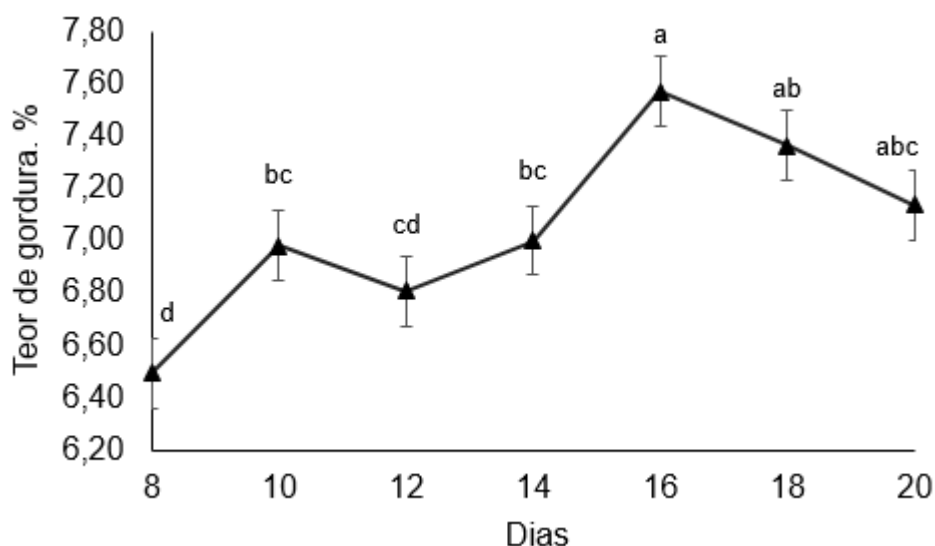
^a Os tratamentos foram Controle e C18:0 com o fornecimento de 28g/animal/dia de C18:0 (87% de C18:0) na dieta basal; ^b CMSconc: Consumo de matéria seca de concentrado, calculado individualmente; ^c CMSsil: Média do Consumo de matéria seca de silagem de milho, calculado por baia/tratamento; ^d Peso vivo; ^e Escore de condição corporal; ^f Erro padrão da média; ^g Nível de significância ($P < 0,05$); ^h Significância do tempo de administração dos tratamentos; ⁱ interação entre tratamento e coleta.

O consumo (kg/dia) observado de matéria seca da silagem foi reduzido em 13,1% com a suplementação de C18:0 ($P = 0,0003$) quando comparado ao Controle (Tabela 4). Não foram observados efeitos de tratamento para a produção e teor de

gordura, proteína e sólidos totais, bem como, no consumo de matéria seca de concentrado, peso vivo e escore de condição corporal (Tabela 4).

As médias dos teores de gordura no leite durante a período de coletas de dados experimentais estão demonstradas na Figura 1. A partir do décimo sexto dia de administração dos tratamentos, observa-se que há uma estabilização nos teores de gordura com ausência de diferença ($P \geq 0,05$) entre os dias 16, 18 e 21.

Figura 1. Médias dos teores de gordura no leite (%) ao longo do período de coleta de dados (dias 8 a 21), para ambos os tratamentos.



¹ Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$).

6.2 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE E EXPRESSÃO GÊNICA NA GLÂNDULA MAMÁRIA

O perfil de AG's do leite está apresentado na Tabela 5. O tratamento com C18:0 aumentou o teor dos ácidos butírico (C4:0), cáprico (C6:0) e caprílico (C8:0), em, respectivamente, 8,93 ($P = 0,03$), 10,61 ($P = 0,003$) e 15,1% ($P = 0,001$), quando comparado ao Controle (Tabela 5). Além disso, houve redução de 10,4% no total de ácidos graxos poliinsaturados na gordura do leite pela administração do tratamento com C18:0 (Tabela 5).

Tabela 5. Efeito da suplementação com C18:0 sobre o perfil de ácidos graxos no leite de ovelhas Lacaune em final de lactação.

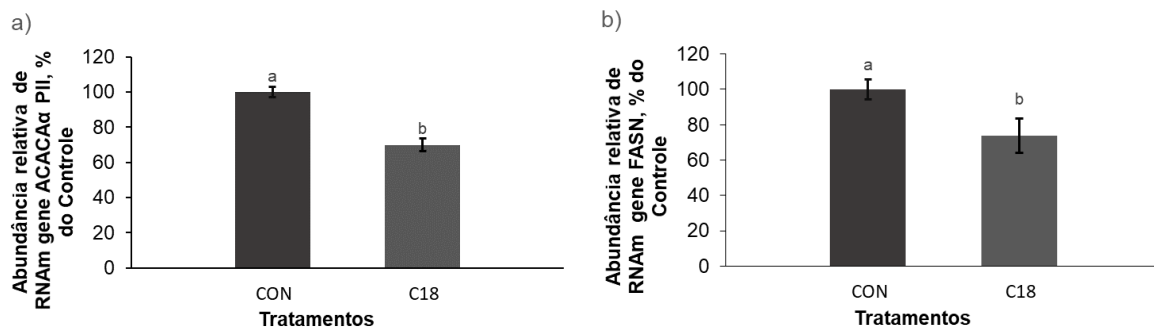
Ácidos graxos (%)	Tratamentos ^a		EPM ^h	Valor-P ⁱ
	Cont.	C18		
C4:0	1,12	1,22	0,12	0,03
C6:0	1,79	1,98	0,09	0,003
C8:0	2,39	2,75	0,03	0,001
C10:0	9,35	9,67	0,10	0,39
C12:0	5,91	5,59	0,45	0,20
C13:0	0,22	0,23	0,002	0,81
C14:0	12,43	11,94	0,07	0,17
C14:1	0,20	0,20	0,002	0,94
C15:0	0,96	1,02	0,01	0,21
C16:0	28,08	27,12	0,15	0,23
C16:1	0,92	0,92	0,01	0,99
C18:0	8,58	9,06	0,09	0,36
C18:1 <i>trans</i> -11	1,12	1,15	0,02	0,64
C18:1 <i>cis</i> -9	16,49	16,68	0,11	0,73
C18:2	2,04	1,89	0,02	0,17
C18:3	0,23	0,20	0,003	0,13
CLA <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11	0,61	0,59	0,01	0,81
CLA <i>trans</i> -10 <i>cis</i> -12	0,05	0,05	0,001	0,52
∑ <C16 ^b	36,14	36,18	0,28	0,97
∑ AG's Saturados ^c	73,91	74,21	0,14	0,68
∑ AGMI ^d	18,93	19,32	0,11	0,51
∑ AGPI ^e	4,42	3,96	0,06	0,05
∑ AG's não-identificados ^f	6,96	6,81	0,07	0,59
<i>Dessaturases</i> ^g				
C14:1/C14:0	0,016	0,019	0,0003	0,12
C16:1/C16:0	0,031	0,032	0,001	0,69
C18:1 <i>cis</i> -9/C18:0	0,66	0,66	0,002	0,84

^a Os tratamentos foram Controle e C18 com o fornecimento de 28g/animal/dia de C18:0 (87% de C18:0) na dieta basal; ^b Somatório de AG's maiores de 16C; ^c Somatório de AG's saturados; ^d Somatório de AG's monoinsaturados; ^e Somatório de AG's poliinsaturados; ^f Somatório de ácidos graxos não-identificados; ^g índices de dessaturação calculados pela relação produto/(substrato + produto) para a enzima SCD (KELSEY, et al., 2003); ^h Erro padrão da média; ⁱ Nível de significância (P<0,05).

O perfil dos demais AG's do leite, incluindo o próprio C18:0 (P = 0,36) e aqueles que foram agrupados por sua classificação (saturados, mono e poliinsaturados), não sofreram alteração com a administração do tratamento com C18:0 (P > 0,05) (Tabela 5).

Quanto aos efeitos da suplementação de C18:0 sobre a expressão de genes lipogênicos na glândula mamária, o tratamento com C18:0 reduziu a abundância relativa de RNAm dos genes ligados à síntese de *novo*.

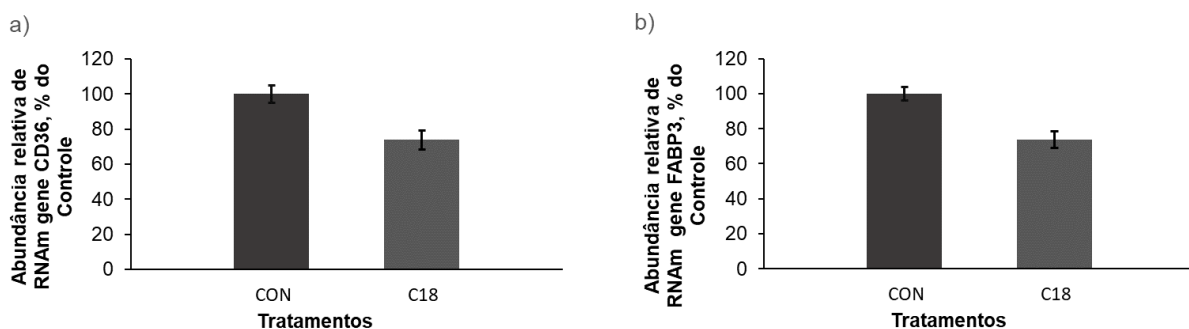
Figura 2. Expressão gênica dos genes da síntese de *novo* (a) ACACA α PII e (b) FASN na glândula mamária de ovelhas lactantes suplementadas com C18:0¹ comparadas ao Controle.

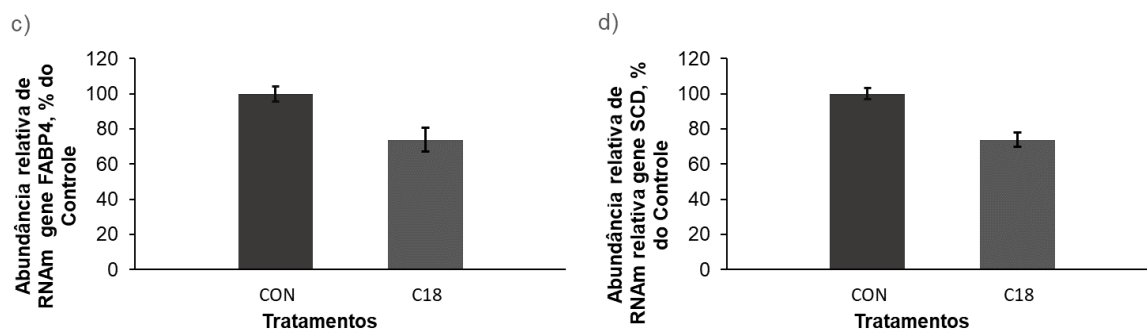


¹ Os valores são apresentados como a média \pm EPM. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$).

A expressão de ACACA α PII e FASN foram reduzidas em 30% ($P = 0,02$) e 26,1% ($P = 0,04$) (Figura 2), respectivamente, pela administração de C18:0 quando comparado ao Controle.

Figura 3. Expressão gênica dos genes (a) CD36, (b) FABP3, c) FABP4 e na glândula mamária de ovelhas lactantes suplementadas com C18:0¹ comparadas ao Controle.

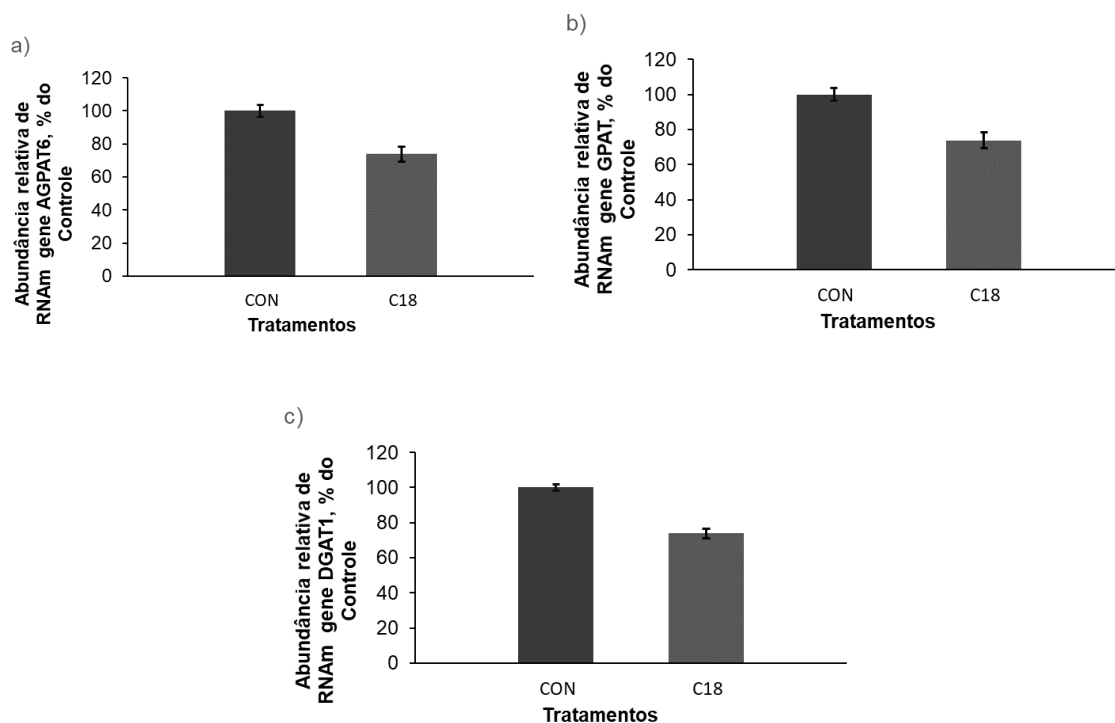




¹ Os valores são apresentados como a média \pm EPM. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$).

Não houve efeito do C18:0 ($P > 0,05$) sobre a expressão gênica dos genes envolvidos nos processos de internalização, transporte, dessaturação de AG's (Figura 3), bem como, naqueles envolvidos na síntese de triglicerídeos (Figura 4).

Figura 4. Expressão gênica dos genes (a) AGPAT6, (b) DGAT1, c) GPAT e na glândula mamária de ovelhas lactantes suplementadas com C18:0¹ comparadas ao Controle.



¹ Os valores são apresentados como a média \pm EPM. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$).

7 DISCUSSÃO

Estudos prévios que avaliaram a suplementação com fontes ricas em C18:0 (<85%) sobre respostas produtivas em vacas (STEELE, 1969; ENJALBERT et al., 2000; PIANTONI, LOCK e ALLEN, 2015; BOERMAN, SOUZA e LOCK, 2017; SOUZA, PRESEULT e LOCK, 2018; RICO, ALLEN e LOCK, 2014) e ovelhas leiteiras (TORAL et al., 2015; TORAL, HERVÁS e FRUTOS, 2018), demonstraram respostas variadas na produção de leite, gordura e componentes. No presente estudo, não houve respostas sobre a produção e teor de gordura, proteína e sólidos. No entanto, o C18:0 ocasionou um menor consumo de MS da silagem, decréscimos na produção e no teor de lactose, acompanhados de uma queda na produção de leite.

Nossos resultados relativos aos decréscimos no teor e na produção de lactose, estão de acordo com os encontrados por Boerman, Souza e Lock (2017), em um estudo com níveis crescentes de suplementação de C18:0 na dieta de vacas da raça Holandês, observaram uma tendência na redução da produção de lactose ($P=0,10$) com o aumento nas doses de C18:0. Diferindo daqueles encontrados por Steele (1969), que obteve aumentos na produção de lactose com a inclusão de C18:0 à 5% do consumo de MS da dieta. E de de Toral, Hervás e Frutos (2018), que reportaram que não houve efeito de doses de C18:0 sobre os teores de lactose ($P > 0,10$), quando estas foram suplementadas em combinação com óleo de peixe na tentativa de reverter a depressão de gordura do leite (DGL).

As possíveis causas para a variação nas respostas encontradas com o uso de fontes de gordura saturada, sobre a produção e o teor de lactose entre os diferentes estudos, não está completamente documentada. No entanto, algumas inferências já foram estabelecidas, como por exemplo, a de Cant, Depeters e Baldwin (1993), que sugerem que aumentos no suprimento de AG's oriundos da suplementação lipídica ocasionariam uma maior eficiência no uso de glicose para a síntese de lactose por poupar acetato da oxidação pelos tecidos. Rico, Allen e Lock (2014), sugeriram que pode haver diferenças na partição de energia conforme a suplementação de AG's, com economia de glicose, permitindo sua utilização em outros processos na síntese do leite.

De forma contrária ao exposto acima, Bionaz et al. (2013) em sua revisão, sugeriram que os AG's podem afetar a expressão gênica e, mais especificamente, fazem uma série de inferências sobre a importância dos isotipos de PPAR na gliconeogênese. Dentre elas, destaca-se a importância de PPAR- β no controle negativo do maior transportador de glicose, o GLUT1 (transportador de glicose 1), que tem sua expressão altamente aumentada no tecido mamário de vacas durante a lactação (BIONAZ E LOOR, 2008), atuando como antagonista da síntese de lactose, e conseqüentemente, da produção de leite (BIONAZ et al., 2013). Além disso, outros resultados como os de White, Koser e Donkin (2011) mostraram que o C18:0 diminui a expressão da enzima chave na gliconeogênese, a *piruvato carboxilase*. Os achados na literatura sugerem a possibilidade de alteração na expressão de PPAR- β e GLUT1, devido as respostas que obtivemos até o presente momento com a diminuição nos teores e produção de lactose e produção de leite.

Outra possível explicação para a redução da lactose, pode ter ocorrido devido ao menor CMS de silagem pelo grupo tratado com C18:0, que conseqüentemente, disponibilizaria menos substratos para a síntese de glicose. Ao contrário do que ocorreu neste estudo, Steele e Moore (1968) suplementaram C18:0 para vacas leiteiras em meio de lactação e não encontraram mudanças na CMS. Alguns autores também destacam os efeitos hipofágicos que podem ocorrer com a suplementação de AG's saturados, embora estes efeitos sejam mais pronunciados na utilização de fontes insaturadas de gordura (DRACKLEY et al., 1992; HARVATINE e ALLEN, 2005). Além disso, a digestibilidade do suplemento pode ter sido um fator nos resultados encontrados, Boerman et al. (2015) postularam em sua meta-análise que a conforme ocorre um aumento na chegada de C18:0 ao duodeno, há um decréscimo linear da digestibilidade de C18:0. No entanto, diminuição na digestibilidade de C18:0 que pudesse justificar a ausência de efeitos do ácido esteárico sobre o teor e a produção de gordura neste estudo não pode ser confirmada porque não utilizamos infusão duodenal de C18:0, mas não descartamos a possibilidade de que possam haver propriedades físicas ou organolépticas do suplemento lipídico (ponto de fusão, odor, sabor) que possam ter afetado a digestibilidade e o consumo de silagem, conseqüentemente, afetando os resultados produtivos.

Em nosso estudo, a produção de leite diminuiu em 8,1% com a adição de C18:0 a dieta de ovelhas em estágio final de lactação, este resultado é diferente

daqueles relatados em trabalhos prévios onde o C18:0 aumentou (STEELE, 1969; PIANTONI, LOCK e ALLEN, 2015; BOERMAN, SOUZA e LOCK, 2017) ou não apresentou efeitos sobre a produção de leite (STEELE e MOORE, 1968; ENJALBERT et al., 2000). Como este resultado foi precedido de uma diminuição nos teores e produção de lactose, que por sua vez, é um componente conhecido por sua ação osmorreguladora na captação de água para a glândula mamária (LINZELL; PEAKER, 1971), e está diretamente correlacionada com a produção de leite (MIGLIOR et al., 2007), uma possível limitação na gliconeogênese pelo ácido esteárico pode ter promovido uma redução na produção de leite.

Diferente do esperado, o C18:0 não foi capaz de aumentar os teores de AG's saturados no perfil do leite, nem o seu próprio teor, a exceção ocorreu apenas no aumento dos AG's C4:0, C6:0 e C8:0 e na diminuição dos teores de AGPI. De acordo com Barbano e Sherbon (1980), aumentos na secreção de C4:0 na gordura do leite podem ser resultado de parte de um mecanismo compensatório para ajudar a manter a fluidez do leite, devido ao alto ponto de fusão de AGCL. Os resultados de Enjalbert et al. (1998) sobre infusões duodenais de ácido palmítico, esteárico e oleico em vacas leiteiras, indicaram que houve melhora na biossíntese de C4:0 e C6:0 com a administração dos tratamentos, mas que comparativamente, apenas o C16:0 aumentou a secreção de C4:0 e tendeu a aumentar C6:0 na gordura do leite. Para esses autores, a ausência de efeitos de C18:0 sobre a secreção de C4:0, se deve a absorção insuficiente de C18:0 pela glândula mamária.

Assim como o nosso, existem outros estudos que avaliaram efeitos da dieta sobre a expressão gênica na glândula mamária com alterações na composição de AG's sem afetar a secreção de gordura no leite (SHINGFIELD et al., 2010). Apesar do exposto, não podemos afirmar que estes aumentos foram causados pela administração C18:0, já que não houve um aumento no suprimento de C18:0 na gordura do leite que pudesse favorecer aumentos na secreção de C4:0, C6:0 e C8:0 em comparação com o Controle.

Nossos resultados foram obtidos com 14 dias de suplementação, no entanto, trabalhos prévios com ovelhas leiteiras (TORAL et al., 2010; GÓMEZ-CORTÉS et al., 2011 e CASTRO-CARRERA et al., 2015) indicam que respostas diferentes na composição do perfil de AG's podem ser encontradas com maior tempo de suplementação lipídica. Este fato, somado a outros fatores como o período de lactação dos animais, dose do suplemento e digestibilidade de C18:0 (não avaliada

neste trabalho), poderia ser uma possível justificativa para os resultados encontrados. Por este motivo plotamos uma curva com as médias do teor de gordura (Figura 1) durante o tempo de administração dos tratamentos, e pudemos observar que a partir do 16º dia experimental, houve uma estabilização do teor de gordura ao longo do tempo ($P \geq 0,05$), o que demonstra que o período utilizado para a suplementação foi suficiente em nosso estudo.

Além disso, a energia disponibilizada pela suplementação de AG pode ser direcionada tanto a produção de gordura no leite, para a síntese de leite ou para o uso em outros tecidos (RICO, ALLEN e LOCK, 2014). No trabalho de Piantoni, Lock e Allen (2015) a quantidade de C18:0 absorvido pela glândula mamária foi baixa, e os autores sugerem a possibilidade da ocorrência de uma oxidação extra-hepática dos tecidos na transferência de C18:0 para o leite. No entanto, em um estudo da expressão gênica durante a lactação de camundongos, Rudolph et al. (2007) indicaram que durante a lactação, genes envolvidos na β -oxidação são altamente suprimidos, o oposto de genes lipogênicos que são altamente expressados, provendo substratos para a síntese de gordura.

Há grande reconhecimento sobre o potencial da suplementação lipídica em reduzir a concentração e a produção de AG da síntese *de novo* (GLASSER et al., 2008). Um aumento nos fluxos duodenais de C18:0 e de outros AG's de 18C decrescem linearmente a produção de AG's de cadeia curta e média (C4 a C16) no leite (GLASSER et al., 2008), isso pode ocorrer devido a um decréscimo na oxidação de glicose para a geração de equivalentes na síntese de gordura do leite (STORRY; HALL; JOHNSON, 1973), inibindo diretamente a ACACA α (PALMQUIST e JENKINS, 1980). Apesar desta diminuição nos AG's da síntese *de novo* não terem sido encontradas no perfil de AG's do leite deste estudo, as reduções na abundância de RNAm de ACACA α e FASN, as principais enzimas envolvidas nesta síntese promovidas pela suplementação com C18:0, nos levam a acreditar que possivelmente se tivéssemos um maior tempo de suplementação poderíamos encontrar respostas diferentes.

Os resultados obtidos neste trabalho com a adição de C18:0 à dieta de ovelhas leiteiras em final de lactação, proveu discretas reduções na expressão de ACACA α e FASN. Nossos resultados estão de acordo com os reportados na literatura por KADEGOWDA et al. (2009) e Qi et al. (2014). O estudo de Kadegowda et al. (2009) testou os efeitos de C18:0 e outros AGCL sobre genes lipogênicos em

células epiteliais mamárias bovinas, e encontraram reduções na expressão de ACACA α e FASN (-56 e -69%, respectivamente), em comparação ao Controle. Em seu trabalho, Qi et al. (2014) também relataram efeito supressor de ACACA α e FASN com tratamento com estearato em células mamárias de vacas lactantes. Ao nosso conhecimento, o mecanismo pelo qual um aumento nos suprimentos de C18:0 leva a reduções na expressão de ACACA α e FASN não é completamente estabelecido.

No entanto, hipotetizamos que possa ter ocorrido uma competição do C18:0 com AG's de cadeia curta, isso porque o ácido esteárico é incorporado principalmente na posição *sn*-1 dos TAG, seguida pela posição *sn*-3 (JENSEN, 2002). De acordo com Loften et al. (2014), AG's de maior ponto de fusão são incorporados nas posições *sn*-1 e *sn*-2, enquanto a posição *sn*-3 é destinada, principalmente, aos AG's com ponto de fusão mais baixos como C4:0, C6:0 e C8:0. Hansen e Knudsen (1987) sugerem que AG's, principalmente aqueles incorporados em *sn*-3, podem inibir a síntese *de novo* por competição pelas posições *sn*-2 e *sn*-3 com AG's de cadeia curta e média. Ainda de acordo com esses autores, a adição de C18:0 à dieta promove decréscimos nas quantidades de AG's sintetizados *de novo*. E embora não tenhamos obtido decréscimos na secreção de AG's de cadeia curta e média a nível de composição, a supressão nas expressões de ACACA α e FASN podem nos sugerir a possibilidade da ocorrência deste efeito com maior tempo de suplementação, visto que as mudanças ocasionadas no perfil gênico são obtidas muito mais facilmente do que aquelas mensuradas no perfil lipídico do leite.

8 CONCLUSÕES

A suplementação com ácido esteárico (28g/dia) não foi capaz de aumentar o teor gordura no leite, bem como, seu teor no perfil de ácidos graxos do leite de ovelhas em final de lactação. O C18:0 não promoveu efeitos na expressão dos genes ligados aos processos internalização, transporte, dessaturação e síntese de triglicerídeos, tendo efeito supressor sobre a expressão dos principais genes da síntese *de novo* (ACACA α e FASN). Além disso, a adição de C18:0 à dieta de ovelhas em final de lactação teve efeitos negativos sobre o CMS de silagem e reduziu o teor de lactose e a produção de leite.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKERS, R. M. Milk component biosynthesis: Milk fat biosynthesis. In: AKERS, R. M. **Lactation and the mammary gland**. Iowa: Iowa State Press, 2002. Cap. 4. p. 95-96.

ANGELES-HERNANDEZ, J. C. et al. The application of a mechanistic model to analyze the factors that affect the lactation curve parameters of dairy sheep in Mexico. **Small Ruminant Research**, [s.l.], v. 164, p.58-63, jul. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2018.05.003>.

BARBANO, D.M.; SHERBON, J.W.. Polyunsaturated Protected Lipid: Effect on Triglyceride Molecular Weight Distribution. **J. Dairy Sci.**, [s.l.], v. 63, n. 5, p.731-740, maio 1980. American Dairy Science Association. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(80\)83000-1](http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(80)83000-1).

BARBER, M. C. et al. Induction of transcripts derived from promoter III of the acetyl-CoA carboxylase- α gene in mammary gland is associated with recruitment of SREBP-1 to a region of the proximal promoter defined by a DNase I hypersensitive site. **Biochem. J**, v. 375, p. 489–501, 2003.

BAUCHART, D. 1993. Lipid absorption and transport in ruminants. **J. Dairy Sci.** 76: 3864-3881.

BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J. M. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: Low-fat milk syndrome. **Livestock Production Science**, v. 70, n. 1–2, p. 15–29, 2001.

BAUMAN, D.E.; GRIINARI, J.M. Nutritional regulation of milk fat synthesis. **Annual Review of Nutrition**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.203-227, jul. 2003. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.nutr.23.011702.073408>.

BAUMAN, D.E.; HARVATINE, K.J.; LOCK, A.L.. Nutrigenomics, Rumen-Derived Bioactive Fatty Acids, and the Regulation of Milk Fat Synthesis. **Annual Review of Nutrition**, [s.l.], v. 31, n. 1, p.299-319, 21 ago. 2011. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.nutr.012809.104648>.

BERNARD, L.; LEROUX, C.; CHILLIARD, Y.. Characterisation and nutritional regulation of the main lipogenic genes in the ruminant lactating mammary gland: Characterisation of main lipogenic genes and tools for studying gene expression and regulation. In: SEJRSEN, K.; HVELPLUND, T.; NIELSEN, M. O. (Ed.). **Ruminant Physiology: Digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress**. [s.l.]: Wageningen Academic Publishers, 2006. Cap. 4, p. 298.

BERNARD, L.; LEROUX, C.; CHILLIARD, Y.. Expression and Nutritional Regulation of Stearoyl-CoA Desaturase Genes in the Ruminant Mammary Gland: Relationship with Milk Fatty Acid Composition. In: NTAMBI, J.m. (Ed.). **Stearoyl-CoA Desaturase Genes in Lipid Metabolism**. New York: Springer Science+business Media, 2013. Cap. 13. p. 161-193.

BIONAZ, M.; LOOR, J.J. Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. **Bmc Genomics**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.366, 2008. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-9-366>.

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**, [s.l.], v. 107, n. 02, p.179-191, 6 jul. 2011. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0007114511002777>.

BIONAZ, M. et al. Functional role of PPARs in ruminants: Potential targets for fine-tuning metabolism during growth and lactation. **PPAR Research**, v. 2013, 2013.

BOERMAN, J.P.; SOUZA, J. de; LOCK, A.L. Milk production and nutrient digestibility responses to increasing levels of stearic acid supplementation of dairy cows. **J. Dairy Sci.** [s.l.], v. 100, n. 4, p.2729-2738, abr. 2017. American Dairy Science Association.

BOERMAN, J.P. et al. Intestinal digestibility of long-chain fatty acids in lactating dairy cows: A meta-analysis and meta-regression. **J. Dairy Sci.**, [s.l.], v. 98, n. 12, p.8889-8903, dez. 2015. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-9592>.

CANT, J.p.; DEPETERS, E.j.; BALDWIN, R.I.. Mammary Uptake of Energy Metabolites in Dairy Cows Fed Fat and its Relationship to Milk Protein Depression. **J. Dairy Sci.**, [s.l.], v. 76, n. 8, p.2254-2265, ago. 1993. American Dairy Science Association. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(93\)77562-1](http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(93)77562-1).

CASTRO-CARRERA, T. et al. Dietary sunflower oil modulates milk fatty acid composition without major changes in adipose and mammary tissue fatty acid profile or related gene mRNA abundance in sheep. **Animal**, v. 9, n. 4, p. 582–591, 2015.

CHILLIARD, Y. et al. A Review of Nutritional and Physiological Factors Affecting Goat Milk Lipid Synthesis and Lipolysis. **J. Dairy Sci.**, [s.l.], v. 86, n. 5, p.1751-1770, maio 2003. American Dairy Science Association. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(03\)73761-8](http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(03)73761-8).

CHILLIARD, Y. et al. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. **European Journal of Lipid Science and Technology**, [s.l.], v. 109, n. 8, p.828-855, ago. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.200700080>.

DRACKLEY, J.k. et al. Infusion of Long-chain Fatty Acids Varying in Saturation and Chain Length into the Abomasum of Lactating Dairy Cows. **J. Dairy Sci.**, [s.l.], v. 75, n. 6, p.1517-1526, jun. 1992. American Dairy Science Association. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(92\)77908-9](http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(92)77908-9).

EBERLE, D. et al. 2004. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. **Biochimie**. 86:839-848.

ENJALBERT, F. et al. (1998). Nutrient Metabolism Duodenal Infusions of Palmitic, Stearic or Oleic Acids Differently Affect Mammary Gland Metabolism of Fatty Acids in Lactating Dairy Cows, (NRC 1985), 1525–1533.

ENJALBERT, F. et al. Effects of Duodenal Infusions of Palmitic, Stearic, or Oleic Acids on Milk Composition and Physical Properties of Butter. **J. Dairy Sci.**, [s. L.], n. 83, p.1428-1433, 2000.

ENJALBERT, F. et al. Rumen microbiota and dietary fat: a mutual shaping. **Journal of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 123, n. 4, p.782-797, 16 jul. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.13501>.

FRUTOS, P.; TORAL, P. G.; HERVÁS, G. Individual variation of the extent of milk fat depression in dairy ewes fed fish oil: Milk fatty acid profile and mRNA abundance of candidate genes involved in mammary lipogenesis. **J. Dairy Sci.**, v. 100, n. 12, p. 9611–9622, 2017.

GLASSER, F. et al. Long-Chain Fatty Acid Metabolism in Dairy Cows: A Meta-Analysis of Milk Fatty Acid Yield in Relation to Duodenal Flows and De Novo Synthesis. **J. Dairy Sci.**, [s.l.], v. 91, n. 7, p.2771-2785, jul. 2008. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2007-0383>.

GÓMEZ-CORTÉS, P. et al. Effects of different forage: concentrate ratios in dairy ewe diets supplemented with sunflower oil on animal performance and milk fatty acid profile. **J. Dairy Sci.**, [s.l.], v. 94, n. 9, p.4578-4588, set. 2011. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2010-3803>.

GONZALEZ-BARO, M. R.; LEWIN, T. M.; COLEMAN, R. A. Regulation of Triglyceride Metabolism II. Function of mitochondrial GPAT1 in the regulation of triacylglycerol biosynthesis and insulin action. *Ajp: **Gastrointestinal and Liver Physiology***, [s.l.], v. 292, n. 5, p.1195-1199, dez. 2006.

HARVATINE, K.J.; ALLEN, M.S.. The Effect of Production Level on Feed Intake, Milk Yield, and Endocrine Responses to Two Fatty Acid Supplements in Lactating Cows. **J. Dairy Sci.**, [s.l.], v. 88, n. 11, p.4018-4027, nov. 2005. American Dairy Science Association. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(05\)73088-5](http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(05)73088-5).

HARVATINE, K. J., BAUMAN, D.E. 2006. SREBP1 and thyroid hormone responsive spot 14 (S14) are involved in the regulation of bovine mammary lipid synthesis during diet-induced milk fat depression and treatment with CLA. **J. Nutr.** 136:2468-2474.

HARVATINE, K. J.; BOISCLAIR, Y. R.; BAUMAN, D. E.. Recent advances in the regulation of milk fat synthesis. **Animal**, [s.l.], v. 3, n. 01, p.40-54, 15 set. 2008. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s1751731108003133>.

INVERNIZZI, G. et al. Sustained upregulation of stearoyl-CoA desaturase in bovine mammary tissue with contrasting changes in milk fat synthesis and lipogenic gene networks caused by lipid supplements. **Functional & Integrative Genomics**, [s.l.], v. 10, n. 4, p.561-575, 6 jul. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10142-010-0179-y>.

JENKINS, T.C. et al. 2008. Board-Invited Review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. **J. Anim. Sci.** 86:397-412.

JENSEN, R. G. The Composition of Bovine Milk Lipids: January 1995 to December 2002. **J. Dairy Sci.**, [s.l.], v. 85, n. 2, p.295-350, fev. 2002. American Dairy Science Association

KADEGOWDA, A.K.G. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation and long-chain fatty acids alter lipogenic gene networks in bovine mammary epithelial cells to various extents. **J. Dairy Sci.**, [s.l.], v. 92, n. 9, p.4276-4289, set. 2009. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2008-1932>.

KANG, Y. et al. PPAR γ modulated lipid accumulation in dairy GMEC via regulation of ADRP gene. **Journal of cellular biochemistry**, v. 116, n. 1, p. 192–201, 2015.

KELSEY, J.a. et al. The Effect of Breed, Parity, and Stage of Lactation on Conjugated Linoleic Acid (CLA) in Milk Fat from Dairy Cows. **J. Dairy Sci.**, [s.l.], v. 86, n. 8, p.2588-2597, ago. 2003. American Dairy Science Association. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(03\)73854-5](http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(03)73854-5).

KINSELLA, J.E. 1970. Stearic acid metabolism by mammary cells. **J. Dairy Sci.** 53:1757–1765.

KRAMER, J. K. G. et al. Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. **Lipids**, [s.l.], v. 32, n. 11, p.1219-1228, nov. 1997. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1007/s11745-997-0156-3>.

LINZELL, J. L.; PEAKER, M.. Mechanism of milk secretion. **Physiological Reviews**, [s.l.], v. 51, n. 3, p.564-597, jul. 1971. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.1971.51.3.564>.

LOCK, A. L. et al. 2006. Concepts in fat and fatty acid digestion in ruminants. p.85–100 in **Proc. Intermountain Nutr. Conf.** Utah State Univ., Logan.

LOCK, A. L.; De SOUZA, J.. Role of 16- and 18-Carbon Fatty Acids in Dairy Rations. In: Cornell Nutrition Conference, 2015., 2015, New York. **Cornell Nutrition Conference Proceedings**. [s. L.]: Cornell University, 2015. p. 1 - 12.

LOFTEN, J.r. et al. Invited review: Palmitic and stearic acid metabolism in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, [s.l.], v. 97, n. 8, p.4661-4674, ago. 2014. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-7919>.

LOOR, J. J.; BIONAZ, M.; DRACKLEY, J. K. Systems Physiology in Dairy Cattle: Nutritional Genomics and Beyond. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 1, n. 1, p. 365–392, 2013.

McDONALD, P. et al. Lactation: Dietary factors affecting milk fat depression. In: MCDONALD, P. et al. **Animal Nutrition**. 7. ed. [s. l.]: Pearson, 2010. Cap. 16. p. 435-440.

MIGLIOR, F. et al. Genetic Analysis of Milk Urea Nitrogen and Lactose and Their Relationships with Other Production Traits in Canadian Holstein Cattle. **J. Dairy Sci.**, [s.l.], v. 90, n. 5, p.2468-2479, maio 2007. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2006-487>.

MOE, P.W.. Energy Metabolism of Dairy Cattle. **J. Dairy Sci.**, [s.l.], v. 64, n. 6, p.1120-1139, jun. 1981. American Dairy Science Association. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(81\)82692-6](http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(81)82692-6).

MOORE, J. H., CHRISTIE, W. W. 1984. Digestion, absorption and transport of fats in ruminant animals. In: J. Wiseman (Ed.) *Fats in Animal Nutrition*. pp. 123-149. Butterworths, London, UK.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrients requirements of dairy cattle. 7 th ed. Washington, 2001. National Academic Press. 2001. 381 p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL, NRC. Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids. The National Academies Press, Washington DC. 2007. 384p.

O'FALLON, J. V. et al. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. **J. Animal Sci.**, [s.l.], v. 85, n. 6, p.1511-1521, 1 jun. 2007. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.2527/jas.2006->

OSORIO, J. S. et al. Application of nutrigenomics in small ruminants: Lactation, growth, and beyond. **Small Ruminant Research**, [s.l.], v. 154, p.29-44, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.06.021>.

PALMQUIST, D.L., JENKINS, T.C., 1980. Fat in lactation rations: review. **J. Dairy Sci.** 63:1–14.

PALMQUIST, D.L. 2006. Milk fat: origin of fatty acids and influence of nutritional factors thereon. In: P. F. Fox and P. L. H. McSweeney (Eds.) *Advanced Dairy Chemistry, Volume 2: Lipids*, 3rd Edition. pp. 43-92. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA.

PIANTONI, P., LOCK, A. L., ALLEN, M. S.. 2013. Palmitic acid increased yields of milk and milk fat and nutrient digestibility across production level of lactating cows. **J. Dairy Sci.** 96: 7143-7154.

PIANTONI, P.; LOCK, A. L.; ALLEN, M. S.. Milk production responses to dietary stearic acid vary by production level in dairy cattle. **J. Dairy Sci.**, [s. L.], v. 98, n. 3, p.1938-1949, out. 2015.

QI, L. et al. Effects of Saturated Long-chain Fatty Acid on mRNA Expression of Genes Associated with Milk Fat and Protein Biosynthesis in Bovine Mammary Epithelial Cells. **Asian-australasian Journal of Animal Sciences**, [s.l.], v. 27, n. 3, p.414-421, 1 mar. 2014. Asian Australasian Association of Animal Production Societies. <http://dx.doi.org/10.5713/ajas.2013.13499>.

RICO, J. E.; ALLEN, M.S.; LOCK, A.L.. Compared with stearic acid, palmitic acid increased the yield of milk fat and improved feed efficiency across production level of cows. **J. Dairy Sci.**, [s.l.], v. 97, n. 2, p.1057-1066, fev. 2014. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-7432>.

RICO, J. E. et al. 2017. Nutrient digestibility and milk production responses to increasing levels of palmitic acid supplementation vary in cows receiving diets with or without whole cottonseed. *J. Anim. Sci.*

aRUDOLPH, M. C.; NEVILLE, M. C.; ANDERSON, S. M. Lipid Synthesis in Lactation: Diet and the Fatty Acid Switch. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, [s.l.], v. 12, n. 4, p.269-281, 20 nov. 2007. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10911-007-9061-5>.

RUDOLPH, M. C. et al. Metabolic regulation in the lactating mammary gland: a lipid synthesizing machine. **Physiological Genomics**, [s.l.], v. 28, n. 3, p.323-336, fev. 2007. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/physiolgenomics.00020.2006>.

RUDOLPH, M. C., et al. 2010. Sterol Regulatory Element Binding Protein (Srebf-1) and Dietary Lipid Regulation of Fatty Acid Synthesis in the Mammary Epithelium. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** 299:E918–E927.

SHI, H. et al. PPAR γ regulates genes involved in triacylglycerol synthesis and secretion in mammary gland epithelial cells of dairy goats. **PPAR Research**, v. 2013, 2013a.

SHI, H. B. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ stimulates the synthesis of monounsaturated fatty acids in dairy goat mammary epithelial cells via the control of stearyl-coenzyme A desaturase. **J. Dairy Sci.**, v. 96, n. 12, p. 7844–7853, 2013b.

SHINDOU, H. et al. Recent progress on acyl CoA: lysophospholipid acyltransferase research. **Journal of Lipid Research**, [s.l.], v. 50, n., p.46-51, 17 out. 2008.

SHINGFIELD, K. J. et al. Role of trans fatty acids in the nutritional regulation of mammary lipogenesis in ruminants. **Animal**, [s.l.], v. 4, n. 07, p.1140-1166, 14 abr. 2010. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s1751731110000510>.

SHINGFIELD, K. J.; BONNET, M.; SCOLLAN, N. D. Recent developments in altering the fatty acid composition of ruminant-derived foods. **Animal**, v. 7, n. SUPPL.1, p. 132–162, 2013.

SOUZA, J. de; PRESEAUULT, C.L.; LOCK, A.L.. Altering the ratio of dietary palmitic, stearic, and oleic acids in diets with or without whole cottonseed affects nutrient digestibility, energy partitioning, and production responses of dairy cows. **J. Dairy Sci.**, [s.l.], v. 101, n. 1, p.172-185, jan. 2018. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-13460>.

SOUZA, J. de; LOCK, A.L.. Effects of timing of palmitic acid supplementation on production responses of early-lactation dairy cows. **J. Dairy Sci.**, [s.l.], v. 102, n. 1, p.260-273, jan. 2019. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2018-14976>.

SMITH, S.; WITKOWSKI, A.; JOSHI, A. K. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. **Progress in Lipid Research**, [s.l.], v. 42, n. 4, p.289-317, jul. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0163-7827\(02\)00067-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0163-7827(02)00067-x).

STEELE, W. 1969. The effects of dietary palmitic and stearic acids on milk yield and composition in the cow. **J. Dairy Res.** 36:369–373.

STEELE, W., MOORE, J. H. 1968. The effects of a series of saturated fatty acids in the diet on milk-fat secretion in the cow. **J. Dairy Res.** 35:361–370.

STORRY, J. E.; HALL, A. J.; JOHNSON, V. W.. The effects of increasing amounts of dietary tallow on milk-fat secretion in the cow. **J. Dairy Research**, [s.l.], v. 40, n. 02, p.293-299, jun. 1973. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s002202990001462x>.

SUBURU, J. et al. Fatty acid synthase is required for mammary gland development and milk production during lactation. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, [s.l.], v. 306, n. 10, p.1132-1143, 15 maio 2014. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00514.2013>.

TORAL, P.Q. et al. Milk fatty acid profile and dairy sheep performance in response to diet supplementation with sunflower oil plus incremental levels of marine algae. **Journal Of Dairy Science**, [s.l.], v. 93, n. 4, p.1655-1667, abr. 2010. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2009-2769>.

TORAL, P.G. et al. Comparison of the nutritional regulation of milk fat secretion and composition in cows and goats. **Journal of Dairy Science**, [s.l.], v. 98, n. 10, p.7277-7297, out. 2015. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-9649>.

TORAL, P. G.; HERVÁS, G.; FRUTOS, P. Use of high doses of 18:0 to try to mitigate the syndrome of milk fat depression in dairy ewes fed marine lipids. **Animal Feed Science and Technology**, [s.l.], v. 236, p.68-75, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.12.001>.

TSIPLAKOU, E. et al. Differences in mRNA lipogenic gene expression in the subcutaneous adipose tissue of sheep and goats under the same dietary treatments. **Small Ruminant Research**, [s.l.], v. 99, n. 2-3, p.110-115, ago. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.03.050>.

WANG, H. et al. MicroRNA-24 can control triacylglycerol synthesis in goat mammary epithelial cells by targeting the fatty acid synthase gene. **Journal of Dairy Science**, [s.l.], v. 98, n. 12, p.9001-9014, dez. 2015. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-9418>.

WHITE, H.M.; KOSER, S.L.; DONKIN, S.S.. Differential regulation of bovine pyruvate carboxylase promoters by fatty acids and peroxisome proliferator-activated receptor- α agonist. **Journal of Dairy Science**, [s.l.], v. 94, n. 7, p.3428-3436, jul. 2011. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2010-3960>.

YANG, Y. et al. The effects of cell death-inducing DNA fragmentation factor- α -like effector C (CIDEA) on milk lipid synthesis in mammary glands of dairy cows. **J. Dairy Sci.**, [s. L.], v. 5, n. 100, p.4014-4024, dez. 2017.