

GEORGIA CRISTINA DE AGUIAR

**USO DO ÁCIDO ESTEÁRICO (C18:0) NA MITIGAÇÃO DA DEPRESSÃO DE
GORDURA DO LEITE INDUZIDA POR ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO
(CLA) *trans-10, cis-12* EM OVELHAS LEITEIRAS.**

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/UDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Aguiar, Georgia Cristina de
Uso do ácido esteárico (C18:0) na mitigação da depressão de
gordura do leite induzida por ácido linoleico conjugado (CLA)
trans-10, cis-12 em ovelhas leiteiras / Georgia Cristina de Aguiar. --
2019.

70 p.

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

1. Composição do leite. 2. Expressão gênica. 3. Glândula
mamária. 4. Nutrigenômica. 5. Suplementação lipídica. I. Estrasulas
de Oliveira, Dimas. II. Universidade do Estado de Santa Catarina,
Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação
em Ciência Animal. III. Título.

GEORGIA CRISTINA DE AGUIAR

**USO DO ÁCIDO ESTEÁRICO (C18:0) NA MITIGAÇÃO DA DEPRESSÃO DE
GORDURA DO LEITE INDUZIDA POR ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO
(CLA) *trans-10, cis-12* EM OVELHAS LEITEIRAS**

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:

Professor Dr. Dímas Estrásulas de Oliveira

Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Membro:

Professor Dr. André Fischer Sbrissia

Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Membro:

Professor Dr. Cláudio Vaz Di Mambro Ribeiro

Universidade Federal da Bahia - UFBA

Lages, 12 de julho de 2019.

*Dedicado aos meus pais, com todo
carinho, amor e gratidão pelos momentos
conquistados até aqui.*

A GRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e os espíritos de luz que guiam meu caminho, me dando suporte em todos os momentos.

Aos meus pais, Jorge e Valdeci, meus primeiros apoiadores nessa jornada que é a vida e na pós-graduação, eles que não medem esforços para meu crescimento pessoal e profissional; por todo amor, cuidado e proteção dedicados diariamente a mim.

As minhas irmãs, Daniela e Gabriela, por todo incentivo. Também aos meus sobrinhos, Mirela e Enzo, pelos momentos de descontração.

As minhas amigas Mayla Regina, Rafaella e Camila pelo encorajamento durante todo o caminho percorrido no mestrado, apoiando e acreditando no meu potencial.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Dimas, pela oportunidade e confiança, além de toda paciência, dedicação e atenção no meu crescimento profissional. Por todos conselhos, conhecimento, experiência, e “puxões de orelha”, solidificando valores éticos e de conduta pessoal.

A Fazenda Estrela da Serra e seus funcionários, pela disponibilidade dos animais utilizados, pelo acolhimento, ajuda e atenção durante todo o período experimental, em especial ao Sr. Paulo e Sra. Vera Gregianin. Também as vinte oito ovelhas que fizeram parte deste trabalho.

As colegas do Grupo de Pesquisa em Nutrigenômica de Ruminantes – NUTRIGER, Rafaella, Charline, Laís, Daniella, Evelyn, Eveline, Priscila e Rayllana, por toda a ajuda, aprendizado, e experiências trocadas no decorrer dos nossos experimentos.

Ao Prof. Dr. Ubirajara, Prof. Dr. Cláudio, técnico de laboratório Maurílio (*in memoriam*) e meu colega e amigo Roberto, pela disponibilidade de espaço, equipamentos e tempo na execução das análises laboratoriais.

Aos professores do PPG em Ciência Animal – UDESC, o qual tive o privilégio de conviver e adquirir conhecimento nesses dois anos. E também, todos os amigos que tive a oportunidade de viver grandes histórias neste período.

Ao PPG em Ciência Animal – UDESC pela oportunidade de adquirir conhecimento e colaborar com a comunidade científica.

A Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina – FAPESC, pelo auxílio financeiro PAP UDESC/FAPESC TR676/2017, possibilitando a realização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo apoio a pesquisa e por conceder a bolsa de estudos, permitindo dedicação exclusiva para execução deste projeto.

Meu muito obrigada!

“Mais importante do que a chegada é a caminhada, e não há caminho sem metamorfose: ela é a ponte que torna possível a nossa travessia até os novos continentes a serem descobertos dentro de nós”. K. Behling

RESUMO

AGUIAR, G. C. Uso do ácido esteárico (C18:0) na mitigação da depressão de gordura do leite induzida por ácido linoleico conjugado CLA *trans-10, cis-12* em ovelhas leiteiras. p.72. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal – Área: Produção Animal). Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Lages, 2019.

O objetivo deste estudo foi verificar se a suplementação com ácido esteárico C18:0 é capaz de aumentar o teor de gordura do leite e/ou superar os efeitos antilipogênicos do CLA *trans-10, cis-12* em ovelhas lactantes. Vinte e oito ovelhas Lacaune (36 ± 3 DEL; $73 \pm 8,1$ kg PV) foram utilizadas em um delineamento inteiramente casualizado ($n=7$ /tratamento) por 21 dias (7 dias de adaptação e 14 dias de coleta de dados), para avaliar da produção, composição e perfil de ácidos graxos do leite, além de avaliar a expressão de genes envolvidos na síntese lipídica da glândula mamária de ovelhas lactantes. Os animais foram submetidos a quatro tratamentos: **a) CLA** (6,4 g de CLA *trans-10, cis-12*, fornecido via oral); **b) C18:0** (28 g de C18:0 fornecido individualmente misturado ao concentrado); **c) CLAC18:0** (6,4 g de CLA *trans-10, cis-12* mais 28 g de C18:0); **d) Controle** (sem adição de suplemento lipídico). A suplementação com C18:0 não alterou o teor e a produção de gordura e reduziu o teor de lactose do leite e o consumo de matéria seca de silagem. Em associação com o CLA (CLA18:0) não foi capaz de inibir os efeitos antilipogênicos do CLA *trans-10, cis-12*. Houve um aumento de C18:0 e ácidos graxos poliinsaturados nos tratamentos com CLA e uma redução nos ácidos graxos <16C. O Peso vivo, escore de condição corporal, produção de leite e demais componentes do leite não sofreram efeitos dos tratamentos. O C18:0 apresentou abundância de RNAm igual (FASN, LPL, FABP4, AGPAT6, SREBP1) ou superior (CD36 e PPAR- γ) ao Controle, e uma redução da expressão de ACACA α PII e SCD. Quando C18:0 foi fornecido associado ao CLA (CLAC18:0) os genes apresentaram abundância de RNAm igual ao CLA (FASN, LPL, CD36, FABP4, SCD, AGPAT6, SREBP1, PPAR- γ). Concluindo, o C18:0 não aumentou o teor de gordura do leite e combinado ao CLA *trans-10, cis-12* não foi capaz mitigar a depressão de gordura do leite.

Palavras-chave: Composição do leite, expressão gênica, glândula mamária, nutrigenômica, suplementação lipídica.

ABSTRACT

AGUIAR, G.C. Use of stearic acid (C18:0) in the milk fat depression mitigation induced by Conjugated linoleic acid CLA *trans-10, cis-12* in dairy sheep. p.72. **Dissertation** (Master in Animal Science – Area: Animal Production). Santa Catarina State University. Program in Animal Science. Lages, 2019

The aim of this study was to verify whether supplementation with C18:0 stearic acid is able to increase milk fat content and / or to overcome the antilipogenic effects of CLA *trans-10, cis-12* in lactating ewes. Twenty eight Lacaune ewes (36 ± 3 DEL; 73 ± 8.1 kg LW) were used in a completely randomized design ($n = 7$ / treatment) for 21 days (7 days of adaptation and 14 days of data collection), to evaluate the production, composition and profile of milk fatty acids, and to evaluate the expression of genes involved in lipid synthesis of the mammary gland of lactating ewes. Os animais foram submetidos a quatro tratamentos: **a) CLA** (6,4 g de CLA *trans-10, cis-12*, fornecido via oral); **b) C18:0** (28 g de C18:0 fornecido individualmente misturado ao concentrado); **c) CLAC18:0** (6,4 g de CLA *trans-10, cis-12* mais 28 g de C18:0); **d) Controle** (sem adição de suplemento lipídico). C18:0 supplementation did not alter fat content and yield and reduced milk lactose content and silage dry matter intake. In combination with CLA (CLAC18:0) it was unable to inhibit the antilipogenic effects of CLA *trans-10, cis-12*. There was an increase of C18:0 and polyunsaturated fatty acids in CLA treatments and a reduction in fatty acids <16C. Live weight, body condition score, milk yield and other milk components were not affected by the treatments. C18:0 showed mRNA abundance equal (FASN, LPL, FABP4, AGPAT6, SREBP1) or higher (CD36 and PPAR- γ) to the Control, and a reduction in ACACAA PII and SCD expression. When C18:0 was supplied in association with CLA (CLAC18:0) the genes showed CLA-like mRNA abundance (FASN, LPL, CD36, FABP4, SCD, AGPAT6, SREBP1, PPAR- γ). In conclusion, C18:0 did not increase milk fat content and combined with *CLA trans-10, cis-12* was not able to mitigate milk fat depression.

Key words: Milk composition, gene expression, mammary gland, nutrigenomics, lipid supplementation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição bromatológica da dieta experimental.....	38
Tabela 2 - Perfil de ácidos graxos dos suplementos lipídicos utilizados na dieta	39
Tabela 3 - Descrição dos primers ovinos utilizados na análise de RT-qPCR	44
Tabela 4 - Produção, composição do leite e desempenho animal em relação aos tratamentos experimentais	48
Tabela 5 - Perfil de ácidos graxos em relação aos tratamentos experimentais	49
Tabela 6 - Concentração dos principais grupos de ácidos graxos na gordura do leite de ovelhas leiteiras e índice de dessaturase para o gene SCD, em relação aos tratamentos experimentais.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Rotas das principais vias de biohidrogenação ruminal.....	26
Figura 2 - Síntese lipídica na glândula mamária	29
Figura 3 - Linha do tempo apresentando o dia de coleta das amostras	40
Figura 4 - Abundância dos genes ACACAA α PII (A) e FASN (B), envolvidos na síntese <i>de novo</i> na glândula mamária de ovelhas lactantes.....	52
Figura 5 -Abundância dos genes LPL (A), CD36 (B), FABP4 (C) e SCD (D), envolvidos na captação, transporte e dessaturação de ácidos graxos na glândula mamária de ovelhas lactantes.....	53
Figura 6 - Abundância do gene AGPAT6, envolvido na síntese de triglicerídeos na glândula mamária de ovelhas lactantes.....	54
Figura 7 - Abundância dos genes SREBP1 (A) e PPAR- γ (B), envolvidos na regulação gênica na glândula mamária de ovelhas lactantes.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

ACACA α PII	Acetil-CoA carboxilase alfa – promotor II
AG	Ácido graxo
AGMI	Ácido graxo monoinsaturado
AGPAT	Acilglicerol fosfato aciltransferase
AGPI	Ácido graxo poliinsaturado
AGS	Ácido graxo saturado
BEN	Balanço energético negativo
C10:0	Ácido cáprico
C16:0	Ácido palmítico
C16:1 <i>cis</i> -9	Ácido palmitoleico
C18:0	Ácido esteárico
C18:2 <i>n</i> -6 <i>cis</i>	Ácido linoleico
C18:3 <i>n</i> -6 <i>cis</i>	Ácido linolênico
C20:0	Ácido araquídico
CD36	Molécula CD36
cDNA	DNA complementar
CLA	Ácido linoleico conjugado
DGAT	Diglicerídeo aciltransferase
DGL	Depressão de gordura do leite
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECC	Escore de condição corporal
EE	Extrato etéreo
EMAG	Éster metílico de ácidos graxos
FABP	Proteína de ligação de ácidos graxos
FACE	Enzima de alongamento de ácido graxo
FASN	Ácido graxo sintase
FDA	Fibra em detergente ácido
FDN	Fibra em detergente neutro
GPAT	Glicerol-3-fosfato aciltransferase
LPL	Lipoproteína lipase
MM	Matéria mineral
mRNA	RNA mensageiro
MS	Matéria seca
PB	Proteína bruta
PPAR- γ	Receptores ativados por proliferadores de peroxissomos gama
PPER	Elementos de resposta do proliferador de peroxissomos
PV	Peso Vivo
RNA	Ácido ribonucleico
S18	Proteína ribossomal S18
SCD	Estearoil-CoA dessaturase
SREBP	Proteína de ligação de elementos reguladores de esterol
TG	Triglicerídeos
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
β -actina	Beta actina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 USO DE SUPLEMENTOS LIPÍDICOS EM RUMINANTES	25
2.2 METABOLISMO DE LIPÍDEOS EM RUMINANTES	25
2.2.1 Metabolismo ruminal de lipídeos.....	25
2.3 SÍNTESE DE GORDURA E ATIVIDADE GÊNICA NA GLÂNDULA MAMÁRIA	27
2.3.1 Síntese <i>de novo</i>	27
2.3.2 Absorção de ácidos graxos pré-formados	28
2.4 ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO – CLA <i>trans-10, cis-12</i>	30
2.4.1 Depressão de gordura do leite pelo CLA <i>trans-10, cis-12</i>	30
2.5 ÁCIDO ESTEÁRICO	31
3 HIPÓTESES	33
4 OBJETIVO	35
5 MATERIAL E MÉTODOS	37
5.1 ANIMAIS, LOCAL E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	37
5.2 DIETA E TRATAMENTOS.....	37
5.3 MEDIÇÕES E AMOSTRAGEM.....	39
5.3.1 Alimentos	39
5.3.2 Leite	40
5.3.3 Pesagem e Escore de Condição Corporal.....	40
5.4 ANÁLISES LABORATORIAIS	41
5.4.1 Alimento.....	41
5.4.2 Composição química do leite	42
5.4.3 Perfil de ácidos graxos do leite.....	42
5.4.4 Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA)	42
5.4.6 Primers.....	43
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
6 RESULTADOS	47
6.1 CONSUMO DE MATÉRIA SECA E DESEMPENHO ANIMAL	47
6.2 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE	47
6.3 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE	48
7 DISCUSSÃO	57
9 REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

Com avanços no melhoramento genético e a intensificação da produção leiteira, houve um aumento nas exigências nutricionais dos animais lactantes. Com isso, lipídeos têm sido utilizados na dieta para aumentar a ingestão de energia, já que esses animais não ingerem alimento suficiente para suprir as suas exigências nutricionais, principalmente no início da lactação (REDDY et al. 1994). Estudos avaliando desempenho animal através de alguma fonte de gordura na dieta apresentam resultados variados, os quais têm sido focados na manipulação da biohidrogenação ruminal, aumento da eficiência produtiva e qualidade dos produtos lácteos (JENKINS, 1993). Para isso, estudos têm sido desenvolvidos na área da biologia da lactação, para elucidar mecanismos envolvidos na síntese dos principais componentes do leite.

Dos componentes do leite, a gordura é a fração mais abundante e é aquela alterada facilmente por fatores externos ao animal, como a dieta (CANNAS et al. 2002; BIONAZ e LOOR, 2011). Contudo, o teor e a produção de gordura do leite são essenciais para produção de derivados lácteos e manutenção das características organolépticas dos produtos, beneficiando a indústria e o produtor rural, que recebe bonificação pelos sólidos totais do leite (SHINGFIELD e GRIINARI, 2007; BIONAZ e LOOR, 2008).

O fornecimento de dietas ricas em carboidratos altamente fermentáveis, forragem com menor tamanho de partículas e/ou uso de ácidos graxos poliinsaturados, leva a formação do ácido linoleico conjugado (CLA) *trans-10, cis-12*, através da biohidrogenação incompleta no rúmen. O isômero *trans-10, cis-12* tem como bioefeito a diminuição na expressão dos fatores de transcrição e dos genes que codificam enzimas lipogênicas na glândula mamária, inibindo a formação de ácidos graxos provenientes de todas as vias de síntese, reduzindo o teor de gordura levando à chamada síndrome da depressão de gordura do leite (DGL) (BAUMAN et al. 2008), a qual tem sido identificada em vacas (BAUMGARD et al. 2000), ovelhas (OLIVEIRA et al. 2012; HUSSEIN et al. 2013) e cabras leiteiras (BALDIN et al. 2013; BALDIN et al. 2014; FERNANDES et al. 2014).

O CLA *trans-10, cis-12* sendo um potente inibidor da síntese de gordura do leite, a indução de DGL por este ácido graxo pode ser utilizada como uma ferramenta para investigar os efeitos de outros ácidos graxos de maneira individual neste cenário de DGL.

Estudos utilizando suplementos lipídicos ricos em C18:0 mostraram que o mesmo possui capacidade de aumentar o teor de gordura do leite e a produção de leite (STEELE e MOORE, 1968; STEELE, 1969; PIANTONI et al. 2015). Entretanto, em estudo investigando a redução de gordura induzida por óleo de peixe (TORAL et al. 2016), o C18:0 não foi capaz de mitigar os efeitos de DGL induzida por esse tipo de suplemento lipídico. No entanto, informações referentes ao efeito do ácido esteárico (C18:0) na DGL induzida pelo CLA *trans*-10, *cis*-12 são escassas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 USO DE SUPLEMENTOS LIPÍDICOS EM RUMINANTES

Com o melhoramento genético de animais leiteiros e maior intensificação da produção, as exigências nutricionais desses animais têm sido aumentadas (ALLEN, 2000). Se sabe que em períodos fisiológicos específicos, como início da lactação, essa exigência nutricional é ainda maior pois os animais passam por um balanço energético negativo (BEN), e então é fornecido uma grande quantidade de concentrado para aumentar o aporte energético da dieta (JENKINS e MCGUIRE, 2006). Koch et al. (2019) alimentaram vacas lactantes com uma dieta com alto teor de concentrado, baixo teor de fibra ou uso de ácidos graxos poliinsaturados, durante dez dias, e mostraram redução na produção e teor de gordura do leite, sendo um efeito indesejável tanto para o produtor como para a indústria.

Contudo, os estudos com suplementos lipídicos vêm ganhando destaque para aumentar o teor de energia das dietas e mitigar os possíveis efeitos adversos causados pelo fornecimento de carboidratos altamente fermentáveis, podendo melhorar a qualidade dos produtos lácteos. Porém, seu uso pode apresentar efeitos variáveis, como redução da digestibilidade de alguns ingredientes da dieta e a interação subsequente entre ácidos graxos devido as alterações ruminais (DOREAU e CHILLIARD, 1997), necessitando que esses ácidos graxos sejam estudados individualmente para uma melhor compreensão.

2.2 METABOLISMO DE LIPÍDEOS EM RUMINANTES

2.2.1 Metabolismo ruminal de lipídeos

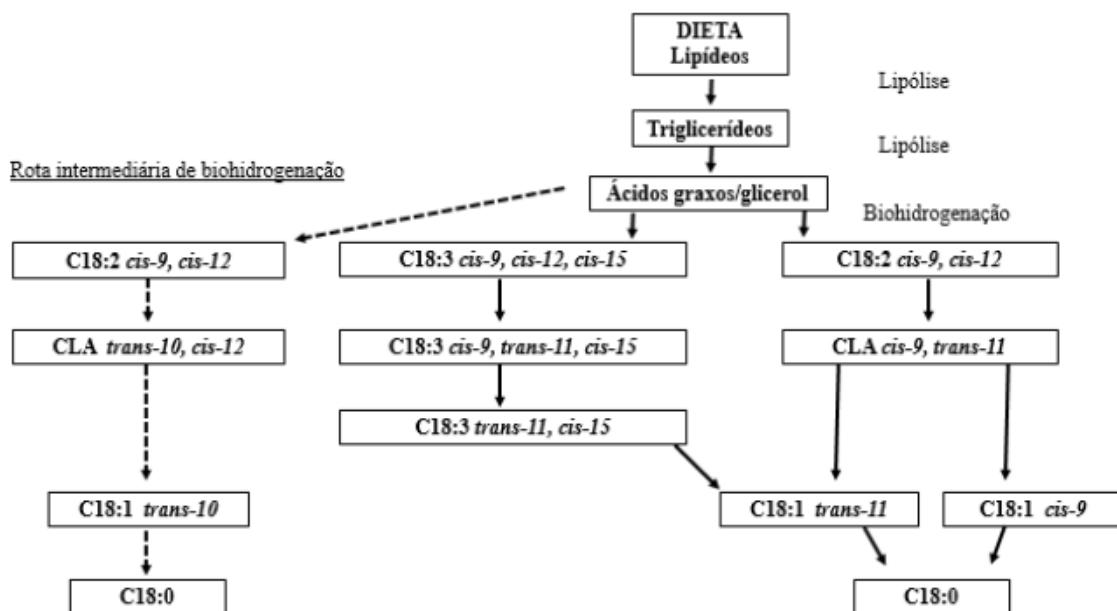
No rúmen, os lipídeos fornecidos via dieta sofrem dois eventos principais a partir da ação dos microrganismos ruminais: I) lipólise/hidrólise microbiana e II) biohidrogenação (Figura 1). No processo de lipólise, os microrganismos hidrolisam os triglicerídeos e galactolipídeos, fazendo a quebra das ligações ésteres, liberando moléculas de glicerol, ácidos graxos livres e galactose no caso dos galactolipídeos (KOZLOSKI, 2011).

A biohidrogenação consiste na ação de isomerases e redutases sobre os ácidos graxos insaturados, alterando a sua isomeria ou transformando-os em ácidos graxos

saturados através da ação das bactérias que ligam moléculas de hidrogênio onde há duplas ligações na cadeia de ácidos graxos (MAIA et al. 2006; JENKINS et al. 2008; LOURENÇO et al. 2010).

Desse modo, os principais ácidos graxos presentes na dieta de ruminantes são os ácidos linolênico (C18:3 *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15) e linoleico (C18:2 *cis*-9, *cis*-12), os quais são reduzidos a ácido esteárico C18:0 (JENSEN, 2002). Entretanto, a rota de biohidrogenação pode passar por caminhos alternativos, onde ocorrem alterações que levam a formação de ácidos graxos intermediários do tipo “*trans*”, como o ácido linoleico conjugado CLA *trans*-10, *cis*-12 (SHINGFIELD e WALLACE, 2014; MA et al. 2014).

Figura 1: Rotas das principais vias de biohidrogenação ruminal.



Fonte: Bauman et al. 1999. Adaptado pelo próprio autor.

Linhas contínuas demonstram biohidrogenação ruminal em ambiente normal, dos ácidos linolênico e linoleico (C18:3 *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 e C18:2 *cis*-9, *cis*-12). Linhas pontilhadas demonstram a rota alternativa de biohidrogenação, gerando ácidos graxos intermediários.

2.2.2 Digestão, absorção e utilização de ácidos graxos

No duodeno, chegam aproximadamente 80 a 90% de ácidos graxos livres (LOOK et al. 2006), sendo aderidos às partículas de alimentos que seguem para próxima porção do intestino delgado. No jejuno, por ação da bile e enzimas pancreáticas, os ácidos graxos desprendem-se das partículas de alimentos formando as micelas (MOORE & CHRISTIE, 1984).

Durante o processo de absorção dos lipídeos nos enterócitos, os ácidos graxos maiores que 10 carbonos são re-esterificados com o glicerol, formando triglicerídeos, que associados a fosfolipídeos, colesterol livre e apoproteínas formam os quilomícrons e lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) para serem liberados no sistema linfático e na corrente sanguínea (KOZLOSKY, 2011).

2.3 SÍNTSE DE GORDURA E ATIVIDADE GÊNICA NA GLÂNDULA MAMÁRIA

O leite é constituído por água, gordura, proteína, lactose, minerais e vitaminas. Desses, a gordura é um dos componentes mais abundantes, composta por aproximadamente 98% de triglicerídeos, menos de 1% de fosfolipídeos, colesterol e ácidos graxos livres (BENCINI e PULINA, 1997; BERNARD et al. 2008).

Os ácidos graxos para a síntese lipídica na glândula mamária de ruminantes provêm de duas fontes: I) ácidos graxos da síntese *de novo*, a qual dá origem aos ácidos graxos <16C e parte dos C16 e; II) ácidos graxos pré-formados, captados da corrente sanguínea, sendo parte dos C16 e maiores que C16, que são absorvidos da dieta no intestino delgado e em caso de BEN mobilizados das reservas corporais até serem captados na glândula mamária (BAUMAN e GRIINARI, 2003; McDONALD et al., 2010).

2.3.1 Síntese *de novo*

Para iniciar a lipogênese da síntese *de novo* na glândula mamária de ruminantes é necessário um iniciador, que frequentemente é o acetil-CoA (BAUMAN e DAVIS, 1974), derivado do acetato produzido durante a fermentação ruminal de carboidratos. Durante a lactação a enzima acetil-CoA carboxilase alfa (ACACA α) é responsável pela formação de malonil-CoA, que sofre a ação da enzima ácido graxo sintase (FASN) que realiza o alongamento dos ácidos graxos até 16 carbonos na glândula mamária (Figura 2), SMITH (1994). Contudo, a enzima acil-tioesterase I atua nesse processo juntamente com a FASN, podendo interromper o alongamento da cadeia de ácidos graxos antes de atingir 16C, realizando cortes na cadeia, formando os ácidos graxos de cadeias curta e média, o que tem sido relacionado com a manutenção da fluidez do leite (SMITH, 1980).

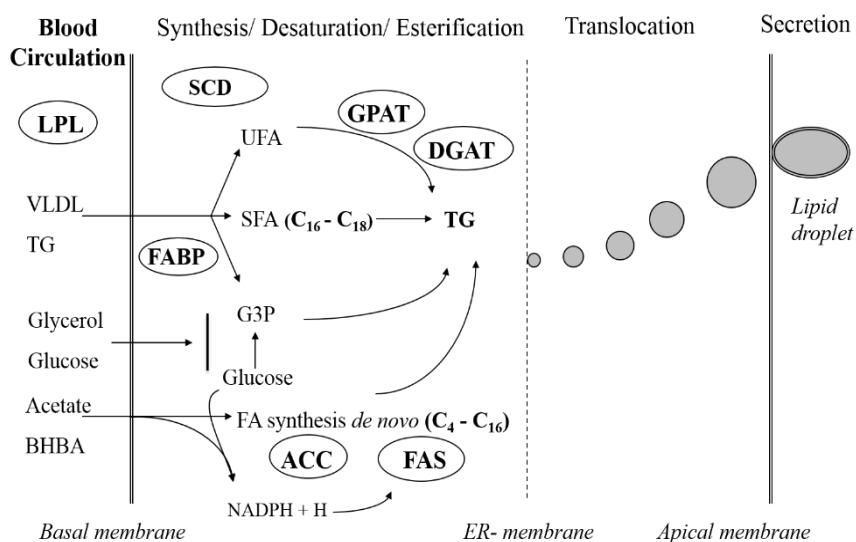
2.3.2 Absorção de ácidos graxos pré-formados

Para que ocorra a absorção de ácidos graxos pré-formados (Figura 2), há a ação da lipoproteína lipase (LPL) que capta e hidrolisa os triglicerídeos dos quilomícrons e VLDL, liberando os ácidos graxos para serem captados pela glândula mamária através do translocador de ácido graxo (Molécula CD36) (DOEGE e STAHL, 2006; ALMEIDA et al. 2007; BADAQUI et al. 2007). Os ácidos graxos de cadeia longa possuem transporte intracelular lento, exigindo transportadores específicos, como a proteína de ligação de ácidos graxos (FABP) (BAUMGARD et al. 2002; NAFIKOV et al. 2013).

Ainda, uma porção dos ácidos graxos que chegam na glândula mamária na forma saturada passam por uma dessaturação, onde a enzima estearoil-CoA dessaturase (SDC) introduz uma dupla ligação *cis* entre os carbonos 9 e 10 dos ácidos graxos, convertendo principalmente C16:0, C18:0 e C18:1 *trans-11*, em C16:1 *cis-9*, C18:1 *cis-9* e CLA *cis-9, trans-11*, respectivamente (GRINARI et al. 2000; BIONAZ e LOOR, 2008).

Como na gordura do leite a principal forma em que os ácidos graxos se encontram é como triglicerídeos, primeiro passo para a sua síntese é a conversão de glicerol em ácido lisofosfatídico na posição sn-1, realizada pela enzima glicerol-3-fosfato aciltransferase (GPAT). Em seguida, há a conversão do ácido lisofosfatídico em ácido fosfatídico adicionando um grupo acil a posição sn-2 pela enzima acilglicerol-3-fosfato aciltransferase (AGPAT). E por último, a enzima diglycerídeo aciltransferase (DGAT) esterifica os ácidos graxos na posição sn-3, finalizando a síntese de triglicerídeos (SMITH, 2000; BERNARD et al. 2008; ZHU et al. 2015).

Figura 2: Síntese lipídica da glândula mamária.



Fonte: Rico, 2013.

Os genes envolvidos na síntese de gordura do leite compartilham um mecanismo regulatório em comum (BAUMGARD et al. 2002). Os elementos reguladores de esterol (SREBP1) e os receptores ativados por proliferadores de peroxissomo (PPAR- γ) são os principais fatores de transcrição regulando os genes da via da síntese *de novo* e aqueles envolvidos na captação de ácidos graxos da corrente sanguínea (HARVATINE e BAUMAN, 2006).

O SREBP1 é um fator de transcrição que regula a expressão de várias enzimas essenciais para síntese de colesterol, ácidos graxos e triglicerídeos (EBERLÉ et al. 2004), ainda existe a isoforma 1 (SREBP1), que controla basicamente as enzimas envolvidas na síntese de gordura na glândula mamária (HARVATINE e BAUMAN, 2006). O SREBP1 transloca-se para o núcleo, ligando-se a elementos reguladores de esterol nas regiões promotoras de genes alvo, estimulando a transcrição dos genes alvos (HUSSEIN et al. 2013).

O PPAR- γ é um fator de transcrição que regula a expressão dos genes através da ligação aos elementos de resposta do proliferador de peroxissomo (PPER) dos genes alvos. O complexo formado se liga ao gene alvo e inicia a transcrição do mesmo (BERGER e MOLLER, 2002).

2.4 ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO – CLA *trans-10, cis-12*

O ácido linoleico conjugado (CLA) é uma mistura de isômeros posicionais e geométricos do ácido linoleico, o qual possui duplas ligações conjugadas separadas por uma única ligação simples entre carbonos (SHINGFIELD e WALLACE, 2014). Dentre esses, existem dois isômeros mais estudados em função dos seus efeitos biológicos, sendo eles o CLA *cis-9, trans-11* e CLA *trans-10, cis-12*. O isômero *cis-9, trans-11* possui características que inibe o crescimento de tumores (PARIZA et al., 2001) e o isômero *trans-10, cis-12* possui a capacidade de inibir a síntese de gordura em tecidos lipogênicos, como a glândula mamária e tecido adiposo (BAUMGARD et al. 2000).

O CLA *trans-10, cis-12* é formado pela biohidrogenação incompleta no rúmen (Figura 1), associado ou não a presença de ácidos graxos poliinsaturados na dieta (BAUMAN E GRIINARI, 2003). Desse modo, a biohidrogenação incompleta inicia a partir do ácido linoleico (C18:2 *cis-9, cis-12*), onde há a ação de enzimas isomerases e redutases, formando CLA *trans-10, cis-12*. Após esse processo, ocorre a redução do CLA *trans-10, cis-12* em C18:1 *trans-10*, e subsequentemente C18:1 *trans-10* em C18:0 (Figura 1) (BAUMAN et al. 1999).

Ambos isômeros de CLA são encontrados naturalmente em produtos lácteos, sendo que o *trans-10, cis-12* representa de 3 a 5% da gordura do leite em condições normais (BAUMAN et al. 1999; PALMQUIST et al. 2005).

2.4.1 Depressão de gordura do leite pelo CLA *trans-10, cis-12*

A síndrome da depressão de gordura do leite (DGL) é atribuída ao aumento do CLA *trans-10, cis-12* e ao C18:1 *trans-10*, formados através da biohidrogenação incompleta no rúmen (ALVES e BESSA, 2014), sendo o CLA *trans-10, cis-12* o principal inibidor da síntese de gordura do leite em ruminantes.

Desse modo, foi visto em trabalhos prévios que ovelhas (OLIVEIRA et al. 2012 e HUSSEIN et al. 2013) e cabras lactantes (BALDIN et al. 2013; BALDIN et al. 2014; FERNANDES et al. 2014) suplementadas com CLA *trans-10, cis-12* também apresentaram redução no teor e produção de gordura, na concentração de ácidos graxos oriundos da síntese de novo e aumento nos ácidos graxos provenientes da corrente sanguínea.

Harvatine e Bauman (2006) e Harvatine et al. (2008) avaliaram que a redução no teor de gordura do leite pelo CLA trans-10, cis-12 era ocasionada pela inibição de fatores de transcrição, principais reguladores da síntese de lipídeos. Dessa forma, quando os fatores de transcrição são reduzidos, faz com que a expressão dos genes envolvidos na síntese de lipídeos seja também reduzida. Baumgard et al. (2002) identificaram que o CLA trans-10, cis-12 reduziu a expressão dos genes ACACA, FASN, SCD, LPL, GPAT e AGPAT6 na glândula mamária de vacas lactantes.

Assim, identificou-se o CLA trans-10, cis-12 como um potente inibidor dos genes envolvidos na lipogênese da glândula mamária, possuindo capacidade de induzir a depressão de gordura do leite em ruminantes (BAUMGARD et al. 2002).

2.5 ÁCIDO ESTEÁRICO

O ácido esteárico (C18:0) é um ácido graxo saturado de cadeia longa, o qual é formado majoritariamente pela biohidrogenação de ácidos graxos no rúmen (Figura 1). O C18:0 é encontrado no leite de animais ruminantes, representando 5 a 15% da gordura do leite (SAMPATH e NTAMBI, 2005). Ainda, pode ser encontrado em gorduras hidrogenadas, as quais vêm sido utilizadas na suplementação de animais lactantes.

A utilização de C18:0 na suplementação de ruminantes tem mostrado grande variabilidade, sendo observado efeitos positivos no aumento do teor de gordura e/ou produção de leite (STEELE E MOORE, 1968; STEELE, 1969; PIANTONI et al. 2015). Em contrapartida, Boerman et al. (2017) incluíram diferentes níveis de C18:0 na dieta de vacas lactantes, não foi observando efeitos sobre os componentes do leite. Esta variabilidade dos resultados da suplementação de C18:0 pode estar associada ao nível e a forma que esse suplemento foi utilizado, além da interação do suplemento com demais componentes da dieta e o estado fisiológico dos animais.

Enjalbert et al. (2000) infundiram uma mistura de ácidos graxos contendo C16:0, C18:0 e C18:1 cis-9 no duodeno de vacas lactantes e observaram aumento no teor de gordura do leite e aumentos dos ácidos graxos C16:0 e C18:0 e sugeriram que a disponibilidade de ácidos graxos pré-formados no intestino delgado facilita a utilização pela glândula mamária. Assim, sendo o ácido esteárico o principal ácido graxo formado pela biohidrogenação ruminal e o principal substrato para a manutenção da fluidez do leite, busca-se compreender melhor seu metabolismo através de novos estudos.

2.5.1 Uso do ácido esteárico na mitigação de DGL

A DGL pode ser causada pela quantidade de carboidratos altamente fermentáveis fornecida aos animais, e/ou uso de ácidos graxos poliinsaturados de origem vegetal e/ou de pescado na dieta, sendo que estes últimos apresentam maior capacidade de deprimir a gordura do leite (BAUMAN e GRIINARI, 2003; FUENTES et al. 2011; RICO et al. 2014b). Acredita-se que a DGL causada pelo óleo de peixe na dieta de ruminantes inibe o último processo de redução de ácido vacênico (C18:1 *trans-11*) em ácido esteárico (C18:0), reduzindo a concentração de C18:0 e aumentando C18:1 *trans-11* em animais suplementados com lipídeos a base de óleo de peixe (ABUGHAZALEH et al. 2006).

Em dois estudos suplementando ovelhas lactantes com doses semelhantes de óleo de peixe foi possível observar tanto a redução no teor e produção de gordura, quanto nos ácidos graxos oriundos da síntese *de novo* e da corrente sanguínea. Ainda, houve redução da abundância de RNAm dos principais genes lipogênicos e fatores de transcrição (CARREÑO et al. 2016; FRUTOS et al. 2017), concluindo que o óleo de peixe altera a biohidrogenação ruminal, assim como altera os genes que codificam as enzimas lipogênicas.

Desse modo, surgiram alguns estudos utilizando a suplementação de C18:0 na tentativa de mitigar a depressão de gordura do leite induzida por óleo de peixe. Toral et al. (2016) submeteram ovelhas lactantes a três tratamentos: Controle, óleo de peixe (20 g) e óleo de peixe combinado com C18:0. Como esperado pelos autores, o tratamento com óleo de peixe aumentou a concentração de ácidos graxos potencialmente inibidores de lipogênese, em consequência, reduziu o teor e a produção de gordura do leite em ambos tratamentos contendo óleo de peixe. A adição de C18:0 na dieta de ovelhas lactantes não superou o efeito de DGL induzida por óleo de peixe.

Em função de alguns estudos mostrarem aumentos do teor de gordura do leite em vacas utilizando a suplementação com ácido esteárico (C18:0) e a escassez de informações referentes ao efeito do ácido esteárico (C18:0) na DGL induzida pelo CLA *trans-10, cis-12*, o objetivo central desse estudo foi verificar se o ácido esteárico é capaz de superar a DGL induzida pelo fornecimento de CLA *trans-10, cis-12*.

3 HIPÓTESES

- A suplementação com ácido esteárico (C18:0) na dieta de ovelhas leiteiras irá aumentar o teor de gordura do leite.
- O ácido esteárico (C18:0) irá mitigar os efeitos antilipogênicos do ácido linoleico conjugado (CLA) *trans-10, cis-12*.

4 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi verificar se a suplementação de C18:0 pode aumentar o teor de gordura do leite, e ainda, ser capaz de inibir os efeitos antilipogênicos causados pelo ácido linoleico conjugado (CLA) *trans-10, cis-12* em ovelhas lactantes.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS, LOCAL E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal – CETEA, da Universidade do Estado de Santa Catarina (nº de protocolo 5642240818). O experimento foi realizado na Fazenda Estrela da Serra, localizada no município de Bom Retiro - Santa Catarina (latitude 27°47'50'' sul; longitude 49°29'21'' oeste).

Foram utilizadas vinte e oito ovelhas multíparas da raça Lacaune, com 36 ± 2 dias em lactação, apresentando uma produção média de $1,8 \pm 0,4$ kg de leite/dia, peso vivo (PV) $70,5 \pm 9,6$ kg e escore de condição corporal (ECC) $3,0 \pm 0,5$. As ovelhas foram separadas em quatro grupos homogêneos de acordo com a produção, dias em lactação e peso vivo, onde cada grupo se manteve confinado em quatro baias coletivas (8 m^2), separadas por tratamentos. As baias possuíam comedouros individuais, onde recebiam as dietas experimentais e água *ad libitum*, durante 21 dias (7 dias de adaptação e 14 dias de coleta de dados).

5.2 DIETA E TRATAMENTOS

A dieta basal fornecida aos animais foi formulada de acordo com o NRC (2007), sendo composta por concentrado e silagem de milho (Tabela 1). O concentrado continha milho moído (58%), farelo de soja (38%) e núcleo mineral (4%) para ovinos. Era fornecido 1,8 kg de concentrado/ovelha/dia e 32 kg de silagem/baia/dia, em base natural, dividido em duas refeições (após a ordenha da manhã e da tarde).

Tabela 1: Composição bromatológica da dieta experimental.

Composição	Concentrado	Silagem de milho
MS (%)	87,4	27,6
PB (% MS)	23,6	7,18
EE (% MS)	3,52	3,27
MM (%)	6,14	3,79
FDN (%MS)	33,7	57,8
FDA (%MS)	4,72	26,2
FDA/FDN	0,14	0,45
CNF (%MS)	32,92	27,88

MS: matéria seca; PB: proteína bruta; EE: extrato etéreo; MM: matéria mineral; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; CNF: carboidratos não-fibrosos. Composição do núcleo mineral utilizado no concentrado: Ca (mín) 241 (máx) 304 g/kg; P 61 g/kg; S 35g/kg; Mg 20 g/kg; Co 20 mg/kg; Cu 350 mg/kg; Cr 350 mg/kg; Fe 3.0000 mg/kg; I 80 mg/kg; Mn 2.000 mg/kg; Mo 500 mg/kg; Se 23 mg/kg; Zn 6.000 mg/kg; F (máx) 610 mg/kg; Monensina sódica 2.000 mg/kg (Tortuga, DSM Latam, Ovinofós núcleo produção com monensina: núcleo para ovinos 25 kg).

Os animais foram submetidos a quatro tratamentos: a) **CLA *trans-10, cis-12*** (6,4 g de CLA *trans-10, cis-12*); b) **C18:0** (28 g de C18:0); c) **CLA *trans-10, cis-12* e C18:0** (6,4 g de CLA e 28 g de C18:0); e d) **Controle:** dieta sem suplementação lipídica. A composição lipídica dos suplementos utilizados nos tratamentos está detalhada na Tabela 2.

Para os tratamentos C18:0 e CLA *trans-10, cis-12* + C18:0, foi misturado diariamente 28g de ácido esteárico em 200g de concentrado, afim de garantir o consumo total do suplemento lipídico pelos animais. Após o consumo desses 200g, era fornecido o restante do concentrado (700 g), totalizando 900 g de concentrado por refeição. Já para o tratamento CLA *trans-10, cis-12*, foi fornecido diretamente 900 g de concentrado por refeição, e tanto no tratamento CLA e CLA + C18:0 foi administrado 6,4g de CLA *trans-10, cis-12* via oral, uma vez ao dia. Igualmente ocorreu para o tratamento Controle, 900 g de concentrado/refeição e 25 mL de água, assegurando o mesmo manejo de dosificação. Após a ingestão do concentrado, foi fornecido silagem de milho *ad libitum*.

Tabela 2: Perfil de ácidos graxos dos suplementos lipídicos utilizados na dieta.

Ácido graxo	Suplementos (%)	
	C18:0 ¹	CLA ²
ΣC4 a C11:0	0,12	Nd
C14:0	0,08	Nd
C15:0	0,03	Nd
C16:0	9,68	4,10
C17:0	0,15	Nd
C18:0	86,98	3,60
C18:1 <i>cis</i> -9	0,10	27,40
C18:2 <i>cis</i> -6	0,10	Nd
C18:2 <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12	Nd	1,20
CLA <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11	Nd	29,80
CLA <i>trans</i> -10, <i>cis</i> 12	Nd	29,90
C20:0	0,61	Nd
C21:0	0,02	Nd
C22:0	0,41	Nd
C23:0	0,04	Nd
C24:0	0,14	Nd
AG's Saturados	98,27	
AG's Insaturados	0,20	
AG's Monoinsaturados	0	3,00
AG's Poliinsaturados	0,10	

Nd: não detectado. ¹Suplemento contendo 87% de C18:0, Prius F100 Nat Dry, Auster Nutrição Animal Ltda. ² Suplemento contendo 29,9% de CLA *trans*-10, *cis*-12, Conjugated Linoleic Acid (CLA), BASF Animal Nutrition. Adaptado pelo próprio autor.

5.3 MEDIÇÕES E AMOSTRAGEM

5.3.1 Alimentos

O concentrado e o suplemento lipídico (C18:0) fornecido aos animais eram pesados individualmente, e a silagem de milho por baia, diariamente, nos períodos da manhã e tarde. As sobras de alimento eram pesadas após cada refeição para determinar o consumo de matéria seca.

Foi feito uma amostra composta daquelas coletadas do concentrado, a cada mistura dos ingredientes (total de 6) em todo o período experimental. Já a silagem de milho foi retirada diretamente em vários pontos do silo, desconsiderando-se as bordas e a base, uma

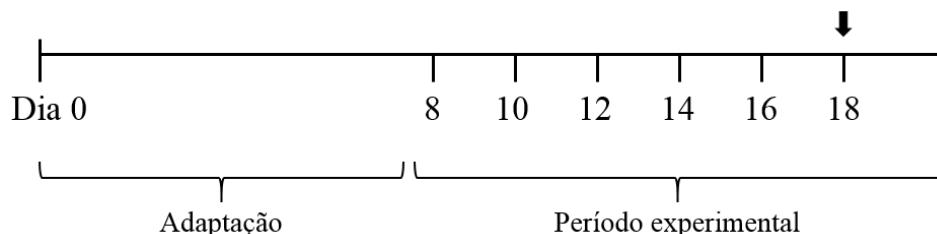
única vez e feito uma amostra composta. As amostras foram armazenadas a -20°C para posterior análise bromatológica.

5.3.2 Leite

As coletas de leite foram realizadas no dia zero (um dia antes do início da adaptação) e a cada dois dias após o início do período de coleta (Figura 3), nas duas ordenhas (6 e 14 h), utilizando uma ordenhadeira mecânica e tubos específicos de coleta de leite. Assim, o leite era pesado individualmente, diariamente a cada ordenha.

Após a pesagem, o leite da manhã e da tarde era homogeneizado e coletado aproximadamente 40 mL em frascos com bronopol (Bronopol, D & F Systems Inc., USA) e armazenados a -4°C, para posterior análise da composição. No último dia foram coletadas amostras para análise do perfil de ácidos graxos, em frasco sem bronopol e armazenadas a -20°C.

Figura 3: Linha do tempo apresentando o dia de coleta das amostras.



Dias que ocorreram a coleta de leite para composição química. O caractere (↓) indica o dia que houve coleta de leite para análise de perfil de ácidos graxos.

Fonte: FERNANDES, 2012. Adaptado pelo próprio autor.

5.3.3 Pesagem e Escore de Condição Corporal

Foram realizadas a pesagem e avaliação de ECC dos animais, nos dias 0 e 20 do período experimental, individualmente, em balança mecânica. O ECC foi realizado por apenas um avaliador, usando a escala de 1 a 5, onde 1 são animais muito magros e 5 muito gordos.

5.3.4 Biópsias

As biópsias foram realizadas em 24 animais (6 ovelhas/tratamento), no último dia do período experimental. Foi realizando assepsia do úbere com solução de álcool iodado (10%). Os animais passaram por anestesia local prévia, com 8 mL de Cloridrato de Lidocaína, divididos em dois pontos do úbere: inserção da linha média do úbere e acima da cisterna da glândula direita.

Após 15 minutos, iniciou o procedimento de biópsia, utilizando uma agulha co-axial (Hospifer; Porto Alegre, RS, Brasil) e ferramenta específica para biópsia Geotek Medikal (EstaCore disposable biopsy cannula/GEC 1412, TIC. SAN. LTD. STI, Yenimahalle-Ankara, Türkiye). Em seguida, os animais receberam aplicação de 2 mL de anti-inflamatório (Flunixin Meglumine – 1 mg/kg) e 2 mL de antibiótico (Cloridrato de Ceftiofur – 1 mg/kg) intramuscular.

Foram coletados aproximadamente 50 mg ($\pm 0,01$) de tecido/animal. As amostras foram lavadas com solução fisiológica, armazenadas em criotubos com solução fosfato-salino – PBS, alocadas em botijão de nitrogênio a -196°C, e transportadas para o CAV-UDESC para posterior análise de expressão gênica.

5.4 ANÁLISES LABORATORIAIS

5.4.1 Alimento

As análises bromatológicas dos alimentos foram realizadas no Laboratório de análises bromatológicas (LANABRO) no CAV- UDESC. Sendo que as frações de matéria seca (MS), extrato etéreo (EE) e matéria mineral (MM) foram analisados através do método de Weende (1864). A proteína bruta (PB) foi analisada com o equipamento Leco (Leco® FP528, LECO Corporation), através do método de Dumas. As porções de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram determinadas de acordo com o método nº 973.18 do AOAC (1997), utilizando equipamento ANKOM A200 I (Tecnologia ANKON, Macedon NY, USA). Para determinação de FDN da silagem de milho e concentrado, foi utilizado alfa-amilase termoestável e corrigida para cinzas.

5.4.2 Composição química do leite

Os componentes proteína, gordura, lactose e sólidos totais do leite foram analizados através de espectrometria completa de absorção de infravermelho, utilizando o equipamento Dairy Spec FT (DairySpec, Bentley Instruments, Curitiba), no laboratório de leite do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV-UDESC).

5.4.3 Perfil de ácidos graxos do leite

As amostras de leite para perfil de ácidos graxos foram descongeladas, transferidas para tubos Falcon e centrifugadas a 3000 rpm, por 15 minutos a 4°C, separando a gordura dos demais componentes da amostra de leite. A gordura foi coletada da fase superior e acondicionada em criotubos estéreis, congeladas e enviadas para Universidade Federal da Bahia (UFBA), onde foi realizada a análise de perfil de ácidos graxos do leite.

Foram utilizadas aproximadamente 50 mg/amostra de gordura para metilação, de acordo com a técnica de O’Fallon et al., (2007). Os ésteres metílicos de ácido graxo foram determinados através de cromatógrafo de gás (modelo Focus GC; Thermo Scientific, Milan, Italy), equipado com detector 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). Foi utilizado hidrogênio 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 31 minutos (KRAMER et al., 1997). Foram utilizados três padrões de ácidos graxos como referência (Supelco FAME mix #C4-C24, CLA *trans*-9, *cis*-11 #16413, and CLA *trans*-10, *cis*-12 #04397, Sigma Aldrich), sendo que os isômeros *cis/trans* 18:1 foram identificados conforme a ordem de eluição na cromatografia gasosa (KRAMER et al. 1997).

5.4.4 Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA)

As amostras foram descongeladas, pesadas e imersas em QiAzol Lysis Reagent (Qiagen Sciences, Germantown, MD, EUA). O tecido foi triturado e homogeneizado com o auxílio de um homogeneizador de tecidos portátil (Scienlabor, Ribeirão Preto, SP,

Brasil). A extração de RNA foi realizada com o Kit RNeasy Lipid Tissue (Qiagen Sciences), seguindo o protocolo de utilização do próprio kit. Foi utilizado DNase (Sigma-Aldrich) para remover possível contaminação por DNA. Posteriormente, foi verificado a pureza de RNA utilizando o espectrofotômetro NanoDrop, ND-2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), avaliando a concentração de RNA da amostra e relação_{260/280} ($2,05 \pm 0,02$). O RNA foi diluído ($2\mu\text{g}$ de RNA/ μL) para realizar a síntese do DNA complementar (cDNA). A síntese de cDNA foi realizado com o uso do Kit GeneAmp (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) com “random primers” e “enzyme mix”, em equipamento termociclador (MJ96+, Biocycler, Biosystems Importadora, Curitiba, PR, Brasil).

5.4.5 PCR Quantitativo em tempo real

O RT-qPCR foi realizado em placa de 48 poços (Micro Amp, Applied Biosystems), utilizando uma curva padrão, $5\text{ }\mu\text{l}$ de cDNA e $10\text{ }\mu\text{l}$ de mix: H₂O livre de RNA, Primer e SyberGreen (GoTaq q PCR Master Mix, Promega, Madison, WI, EUA), totalizando o volume de $15\text{ }\mu\text{l}$ por poço, em triplicatas. Os “primers” utilizados foram desenhados especificamente para cada gene de interesse. A curva padrão utilizada continha sete pontos com um “pool” de cDNA de todas as amostras em uma diluição seriada (100, 50, 25, 12, 6,25, 3,12 e 1,56%).

A placa foi quantificada no aparelho StepOne Real-Time (Applied BioSystems), e os dados analisados com software StepOne versão 2.1 (Applied BioSystems), gerando curvas de dissociação para verificar a presença de um único produto. Em seguida, foi gerado uma equação de regressão com os valores do ciclo de RT-qPCR, afim de verificar a eficiência da reação. As reações apresentaram coeficiente de determinação superior a 0,98 e eficiência entre 90 e 110%.

5.4.6 Primers

A sequência dos primers utilizados para avaliação da expressão gênica foi projetada e disponibilizada pelo banco de dados de anotações de sequências de nucleotídeos – GenBank (NCBI, Bethesda, MD, EUA), sintetizados pela Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA) e validados quanto a especificidade e eficiência antes da utilização. Os primers utilizados foram utilizados em trabalhos prévios, os quais estão detalhados na Tabela 3. Foi avaliado

dois genes “*housekeeping*” (Beta-actina e proteína ribossomal S18) e onze genes de interesse (Tabela 3).

Tabela 3: Descrição dos primers ovinos utilizados na análise de RT-qPCR.

Gene	Primers*	Acesso
ACACA PII	F: GCCTTGAGCTCTGAGGGCTC R: CACGGAGCCAATTATGAATCG	Ticiani et al. (2016)
FASN	F: GGCGTCTTCTGACCAAGA R: CGTGACGCCTGCTTTTG	Ticiani et al. (2016)
SCD	F: CCGCCCTGAAATGAGAGATG R: CATGAGGATGATGTTCTCCAAAC	Sandri et al. (2017)
CD36	F: TGTGTTGGAGGGATTCT R: CCTTGGCTAGATAACGAACACTCG	Hussein et al. (2013)
FABP3	F: GGACAGCAAGAATTTCGATGA R: CGATGATTGTTGAGGCTTG	Hussein et al. (2013)
FABP4	F: ATGCCAAACCCACTGTGAT R: GGCCAATTGAAGGACATCT	NM_001114667.1
GPAT	F: GCATTGGTCGGTGTAAAGCAT R: TTCTTCCACTTCAAGGTTGC	Hussein et al. (2013)
AGPAT6	F: ACTTCCAGTACATCAGCCTGCGGC R: CGTAAAAGCGAGAGCTATCTG	Hussein et al. (2013)
DGAT1	F: CACTGGGACCTGAGGTGTCA R: AACCGTGCCTGCTTAAGATC	Hussein et al. (2013)
SREBP1	F: CCAGCTGACAGCTCCATTG R: TGCGGCCACAAGGA	Hussein et al. (2013)
PPAR- γ	F: CCAAGAATATCCCCGGCT R: AGGCCAGCATCGTGTAAA	Hussein et al. (2013)
β – actina	F: GCCTTGCCATCACTGCAAT R: TGAGCTCTCCTGCCCTCTG	Ticiani et al. (2016)
S18	F: GCCCTGAGGCTCTCTTCCA R: CGGATGTCGACGTCACACTT	Ticiani et al. (2016)

*Os primers são reportados em sequência 5' – 3'. ACACA PII: Acetil-CoA carboxilase alfa; FASN: Ácido graxo sintetase; SCD: Estearoil-CoA dessaturase; CD36: Mólecula CD36; FABP3: Proteína ligadora de ácido graxo 3; FABP4: Proteína ligadora de ácido graxo 4; LPL: Lipase lipoproteica; GPAT: Glicerol-3-fosfato aciltransferase; AGPAT6: Acilglicerolfosfato aciltransferase 6; DGAT1: Diglicerídeo aciltransferase 1; SREBP1: Proteína de ligação de elementos reguladores de esterol; PPAR- γ : Receptores ativados por proliferadores de peroxissomo; β -actina: Beta-actina; RPS18: Proteína Ribossomal S18.

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pelo programa estatístico SAS (SAS Institute, 2009), através do procedimento MIXED, com o nível de 5% de significância e declarando tendência entre 5 e 10%. Os tratamentos foram considerados como efeito fixo e os animais como efeito aleatório. Os dados de consumo diário de MS, produção e composição do leite foram analisados através de medidas repetidas no tempo, utilizando os dados de

produção e composição do dia “0” como co-variável. Para os dados de peso vivo e escore de condição corporal foram utilizados os dados do dia zero como co-variável em suas respectivas análises. Foi considerado os tratamentos como efeito fixo e os animais como efeito aleatório para análise de perfil de ácidos graxos do leite. A média geométrica dos genes *housekeeping* (proteína ribossomal S18 e β-actina) foi considerada como co-variável para os dados de expressão gênica. Os valores de resíduos estudentizados fora de $\pm 2,5$ foram considerados “outliers”, sendo identificados e excluídos da análise estatística.

6 RESULTADOS

6.1 CONSUMO DE MATÉRIA SECA E DESEMPENHO ANIMAL

Os animais consumiram toda a dieta fornecida, sendo que o concentrado foi fornecido individualmente e a silagem por baia (7 animais/baia). Desse modo, as sobras eram pesadas após cada refeição, medindo o consumo diário durante todo o período experimental. Os resultados de consumo de MS de concentrado e silagem estão detalhados na Tabela 4.

O CLA diminuiu o consumo de concentrado, comparado aos tratamentos CLAC18:0, C18:0 e Controle, em 10,3 ($P=0,005$), 9,5 ($P=0,01$) e 12,8% ($P=0,0001$), respectivamente (Tabela 4). Já o C18:0 reduziu o consumo de silagem, comparado aos tratamentos CLAC18:0, CLA e Controle, em 21,4 ($P=0,0004$), 17,6 ($P=0,004$) e 25,4% ($P=0,0001$), respectivamente (Tabela 4). O peso vivo e escore de condição corporal não foram afetados pelos tratamentos (Tabela 4).

6.2 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE

Não foi observado efeito de tratamento sobre a produção de leite, proteína, lactose, sólidos totais e teor de proteína (Tabela 5). Os tratamentos CLA e CLAC18:0 reduziram o teor de gordura do leite em 12 ($P=0,0003$) e 14% ($P=0,0001$), respectivamente, comparado ao C18:0. Ainda, a produção de gordura do leite foi reduzida no tratamento CLA em 18% ($P=0,005$), e apresentou tendência de redução de 10% para CLAC18:0, comparados ao C18:0 (Tabela 5).

O tratamento CLAC18:0 tendeu a reduzir 3% o teor de sólidos totais do leite, comparado ao CLA ($P=0,07$), e ambos tratamentos CLA e CLAC18:0 reduziram os sólidos totais, comparado ao tratamento C18:0, em 4,4 ($P=0,006$) e 7,3% ($P=0,0001$), respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4: Produção, composição do leite e desempenho animal em relação aos tratamentos experimentais.

	Tratamentos ¹					Valor P ³
	CLA	C18:0	CLAC18:0	CONT.	EPM ²	
Leite (kg/dia)	1,34	1,48	1,49	1,45	0,07	0,55
Gordura (%)	5,6 ^b	6,4 ^a	5,5 ^b	6,4 ^a	0,14	0,0001
Proteína (%)	4,4	4,4	4,4	4,5	0,05	0,65
Lactose (%)	4,9	4,8	4,6	4,9	0,04	0,60
Sólidos totais (%)	15,9 ^b	16,7 ^a	15,5 ^c	16,7 ^a	0,18	0,0001
Gordura (g/dia)	74,5 ^b	91,2 ^a	82,0 ^b	91,9 ^a	4,12	0,01
Proteína (g/dia)	57,6	65,3	57,5	63,9	3,11	0,15
Lactose (g/dia)	66,3	71,7	68,9	70,6	3,92	0,79
Sólidos totais (g/dia)	213,2	244,7	230,3	242,1	11,8	0,25
CMSconc (kg/dia) ⁴	0,95 ^b	1,05 ^a	1,06 ^a	1,09 ^a	0,02	0,001
CMSsil (kg/dia) ⁵	24,7 ^b	20,4 ^c	25,9 ^{ab}	27,3 ^a	1,01	0,0001
PV (kg)	74,8	70,9	71,9	74,6	1,55	0,23
ECC (1-5)	3,1	3,4	3,3	3,6	0,40	0,72

*Médias seguidas por letras minúsculas diferem os tratamentos entre si ($P<0,05$). ¹Os tratamentos foram CLA (6,4g/animal/dia de CLA *trans-10, cis-12*), C18:0 (28g/animal/dia de C18:0), CLAC18:0 (6,4g de CLA *trans-10, cis-12* e 28g de C18:0 animal/dia) e Controle na dieta basal; ²Erro médio padrão; ³Valor de P: Nível de significância ($P<0,05$); ⁴Consumo de matéria seca de concentrado, calculado individualmente; ⁵Consumo de silagem, calculado por animal, a seguir: CLA (24,7kg/6 animais = 4,1 kg/animal/dia), C18:0 (20,4 kg/7 animais = 2,9 kg/animal/dia), CLAC18:0 (25,9 kg/7 animais = 3,7 kg/animal/dia), Controle (27,3/7 animais = 3,9 kg/animal/dia).

6.3 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE

Os tratamentos CLA e CLAC18:0 não diferiram entre si, em relação aos ácidos graxos de cadeia curta. No entanto, o CLAC18:0 reduziu a concentração dos ácidos graxos C6:0, C8:0 e C10:0 comparado ao tratamento C18:0, em 43 ($P=0,04$), 66 ($P=0,007$) e 46% ($P=0,03$), respectivamente (Tabela 5). Ainda, a concentração de C16:1 foi reduzida nos tratamentos CLA (30%; $P=0,03$) e CLAC18:0 (12%; $P=0,01$), comparados ao tratamento C18:0 (Tabela 5). No geral, a concentração dos AG's <16C foi reduzida nos tratamentos CLA e CLAC18:0, comparados ao tratamento C18:0. Além disso, onde o tratamento C18:0 não diferiu do Controle.

Foi observado uma maior concentração do ácido graxo C18:0 nos tratamentos CLA e CLAC18:0 em 26 ($P=0,05$) e 24% ($P=0,06$), comparado ao tratamento C18:0 e Controle (Tabela 5). Como esperado, a concentração de CLA *trans-10, cis-12* foi maior nos tratamentos CLA e CLAC18:0 (89; $P=0,0007$ e 87%; $P=0,004$), comparado ao tratamento C18:0. Ainda, o C18:1 *trans-10* apresentou maior concentração nos

tratamentos CLA (65%; P=0,003) e C18:0 (53%; P=0,04), comparados ao Controle (Tabela 5), e não houve diferença para CLAC18:0. Outros ácidos graxos de importância (C16:0, C18:1 *cis*-9, C18:1 *trans*-11 e CLA *cis*-9, *trans*-11) não foram alterados pelos tratamentos (Tabela 5).

Tabela 5: Perfil de ácidos graxos em relação aos tratamentos experimentais. (continua)

AG's (%)	Tratamentos ¹					EMP ²	Valor P ³
	CLA	C18:0	CLAC18:0	CONT.			
C4:0	0,77	0,69	0,76	0,59	0,20	0,57	
C6:0	0,73 ^{ab}	0,99 ^a	0,56 ^b	0,68 ^{ab}	0,35	0,05	
C8:0	0,89 ^{ab}	1,30 ^a	0,44 ^b	0,75 ^{ab}	0,47	0,006	
C10:0	3,88 ^{ab}	5,81 ^a	3,16 ^b	5,02 ^{ab}	1,83	0,02	
C10:1	0,16 ^b	0,48 ^a	0,19 ^b	0,50 ^a	0,03	0,001	
C12:0	3,38	4,32	3,95	5,30	0,68	0,15	
C13:0	0,14 ^b	0,29 ^a	0,15 ^b	0,31 ^a	0,03	0,001	
C14:0	10,8	10,3	12,4	11,9	0,79	0,23	
C14:0 <i>iso</i>	0,18	0,15	0,18	0,11	0,06	0,23	
C14:0 <i>anteiso</i>	0,32 ^a	0,33 ^a	0,21 ^b	0,14 ^c	0,07	0,003	
C14:1	0,23	0,30	0,32	0,47	0,12	0,36	
C15:0	0,84 ^c	1,54 ^a	0,93 ^{bc}	1,22 ^b	0,13	0,004	
C16:0	27,00	27,70	23,30	24,70	3,01	0,71	
C16:0 <i>iso</i>	0,28	0,19	0,35	0,35	2,80	0,57	
C16:1	0,82 ^b	1,17 ^a	1,03 ^b	1,43 ^a	0,23	0,02	
C16:1 <i>cis</i> -7	0,37	0,30	0,27	0,32	0,07	0,34	
C17:0	0,75 ^{ab}	0,81 ^a	0,61 ^b	0,79 ^a	0,09	0,02	
C18:0	11,70 ^a	8,62 ^b	11,37 ^a	7,49 ^b	1,02	0,01	
C18:1 <i>cis</i> -9	17,70	16,90	17,49	16,67	1,19	0,91	
C18:1 <i>trans</i> -10	3,65 ^a	2,74 ^a	2,45 ^{ab}	1,29 ^b	0,48	0,02	
C18:1 <i>trans</i> -11	1,60	1,66	1,65	1,60	0,22	0,99	
C18:1 <i>cis</i> -11	0,65	0,60	0,51	0,53	0,04	0,25	
CLA <i>cis</i> 9, <i>trans</i> -11	0,88	0,85	0,74	0,85	0,10	0,78	
CLA <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12	0,27 ^a	0,04 ^b	0,22 ^a	0,03 ^b	0,03	0,003	

*Médias seguidas por letras minúsculas diferentes diferem entre si; ¹Os tratamentos foram CLA (6,4g/animal/dia de CLA *trans*-10, *cis*-12), C18:0 (28g/animal/dia de C18:0), CLAC18:0 (6,4g de CLA *trans*-10, *cis*-12 e 28g de C18:0 animal/dia) e Controle; ²Erro médio padrão; ³Valor de P: Nível de significância; ⁵Outros: ácidos graxos não identificados.

Tabela 5: Perfil de ácidos graxos em relação aos tratamentos experimentais. (continuação)

AG's (%)	Tratamentos ¹					Valor P ³
	CLA	C18:0	CLAC18:0	CONT.	EMP ²	
C18:2 n-6 cis	2,61 ^a	2,26 ^a	1,49 ^b	1,44 ^b	0,44	0,05
C18:3 n-3	0,23 ^a	0,19 ^b	0,17 ^b	0,19 ^b	0,01	0,03
C18:3 n-6	0,06 ^{bc}	0,06 ^{ac}	0,04 ^b	0,08 ^a	0,009	0,02
C20:0	0,21 ^a	0,18 ^b	0,20 ^a	0,16 ^b	0,01	0,08
C20:1 n-9	0,08	0,07	0,06	0,06	0,009	0,30
C20:2 n-6	0,44 ^a	0,11 ^b	0,36 ^a	0,07 ^b	0,13	0,001
C20:4 n-6	0,15	0,23	0,16	0,14	0,07	0,21
Outros ⁵	0,13	0,15	0,15	0,15	0,04	0,84

*Médias seguidas por letras minúsculas diferentes diferem entre si; ¹Os tratamentos foram CLA (6,4g/animal/dia de CLA *trans-10, cis-12*), C18:0 (28g/animal/dia de C18:0), CLAC18:0 (6,4g de CLA *trans-10, cis-12* e 28g de C18:0 animal/dia) e Controle na dieta basal; ²Erro médio padrão; ³Valor de P: Nível de significância; ⁵Outros: ácidos graxos não identificados.

Os AG's agrupados por origem e dessaturação estão detalhados na Tabela 6. Assim, os tratamentos CLA e CLAC18:0 não sofreram efeito de tratamento. Tanto o tratamento CLA quanto CLA18:0 reduziram os AG's menores de 16 carbonos, em 13 (P=0,02) e 16% (P=0,02), respectivamente, comparados ao Controle. Já o CLA aumentou a concentração de AG's poliinsaturados em 19% (P=0,03) comparado ao CLAC18:0 (Tabela 6). Enquanto os AG's saturados e monoinsaturados foram inalterados (Tabela 6).

O fornecimento de CLA *trans-10, cis-12* reduziu a dessaturação dos AG's C16:0/C16:1 e C18:0/C18:1 *cis-9* pela enzima estearoil-CoA dessaturase, nos tratamentos CLA e CLAC18:0 em 33 (P=0,03) e 9% (P=0,01), respectivamente, comparados ao C18:0 (Tabela 6).

Tabela 6: Concentração dos principais grupos de ácidos graxos na gordura do leite de ovelhas leiteiras e índice de dessaturase para o gene SCD, em relação aos tratamentos experimentais.

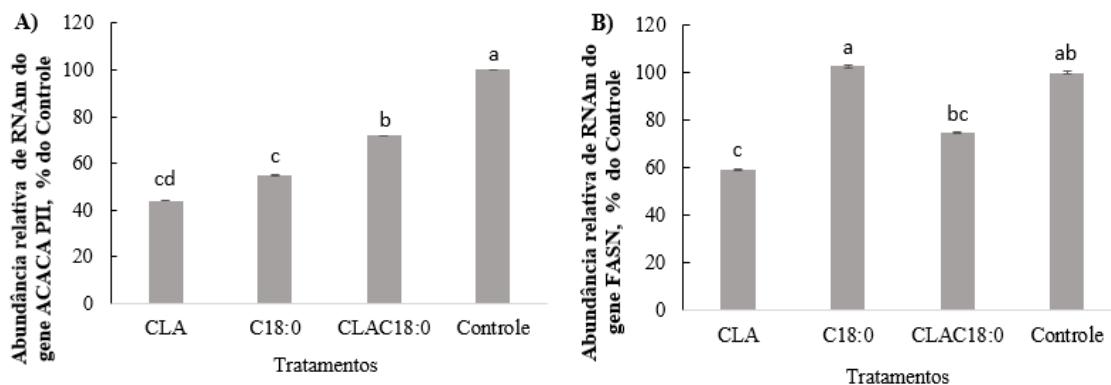
AG's (%)	Tratamentos ¹					Valor P ⁸
	CLA	C18:0	CLAC18:0	CONT.	EMP ⁷	
$\sum <C16^2$	52,40 ^b	58,78 ^{ab}	52,63 ^b	62,85 ^a	2,84	0,04
$\sum AGS^3$	62,17	65,10	62,01	67,66	2,37	0,29
$\sum AGMI^4$	25,65	24,21	24,03	22,61	1,33	0,49
$\sum AGPI^5$	4,78 ^a	4,19 ^{ab}	3,87 ^b	3,78 ^b	0,27	0,07
Índice de Dessaturação ⁶						
14:1/(14:0+14:1)	0,02	0,02	0,02	0,03	0,009	0,27
16:1/(16:0+16:1)	0,02 ^b	0,03 ^a	0,02 ^b	0,03 ^a	0,002	0,02
18:1 <i>cis</i> -9/ (18:0+18:1 <i>cis</i> -9)	0,60 ^b	0,67 ^a	0,61 ^b	0,69 ^a	0,02	0,0009
CLA <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11/ (18:1 <i>trans</i> -11+ CLA	0,37	0,34	0,31	0,34	0,03	0,59
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11)						

*Médias seguidas por letras minúsculas diferentes diferem entre si; ¹Os tratamentos foram CLA (6,4g/animal/dia de CLA *trans*-10, *cis*-12), C18:0 (28g/animal/dia de C18:0), CLA + C18:0 (6,4g de CLA *trans*-10, *cis*-12 e 28g de C18:0 animal/dia) e Controle na dieta basal; ²Somatório de ácidos graxos menos que 16 carbonos; ³Somatório de ácidos graxos saturados; ⁴Somatório de ácidos graxos monoinsaturados; ⁵Somatório de ácidos graxos poliinsaturados; ⁶Relação produto/(substrato + produto) para gene SCD Ex: CLA *trans*-10, *cis*-12/(C18:1 *trans*-10+CLA *trans*-10, *cis*-12); ⁷Erro médio padrão; ⁸Valor de P: Nível de significância.

6.4 EXPRESSÃO GÊNICA DA GLÂNDULA MAMÁRIA

Na glândula mamária, a abundância de RNAm de ACACA α PII foi reduzida no tratamento CLA comparado ao CLAC18:0 em 39% ($P=0,002$). O C18:0 reduziu a abundância de RNAm da ACACA α PII em 45% ($P=0,0001$) comparado ao Controle (Figura 4A) e a abundância de RNAm da FASN foi reduzida no tratamento CLA em 41% ($P=0,01$), comparado ao Controle. Ainda, houve uma tendência do tratamento CLAC18:0 em reduzir a FASN em 27,2% ($P=0,08$) comparado ao C18:0 (Figura 4B).

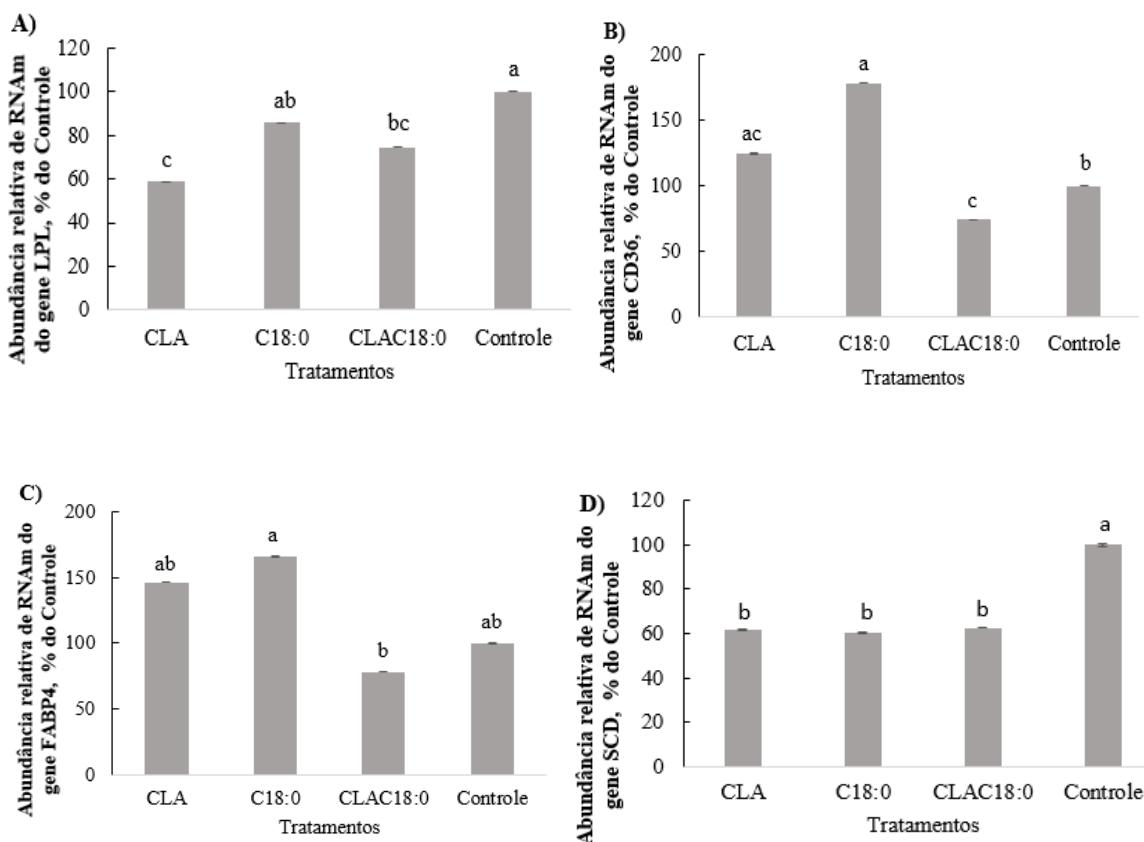
Figura 4: Abundância dos genes ACACA α PII (A) e FASN (B), envolvidos na síntese *de novo* na glândula mamária de ovelhas lactantes.



*Valores apresentados como a média, letras minúsculas diferem os tratamentos entre si ($P<0,05$). Os tratamentos foram CLA (6,4g/animal/dia de CLA *trans*-10, *cis*-12), C18:0 (28g/animal/dia de C18:0), CLAC18:0 (6,4g de CLA *trans*-10, *cis*-12 e 28g de C18:0 animal/dia) e Controle.

A abundância de RNAm da LPL foi reduzida no tratamento CLAC18:0, em 25% ($P=0,05$), comparado ao Controle (Figura 5A). A suplementação com C18:0 aumentou a abundância de RNAm do translocador molécula CD36 comparado ao CLAC18:0, em 58% ($P=0,012$) (Figura 5B) e a abundância de RNAm da FABP4 foi reduzida pelo CLAC18:0 em 53% ($P=0,013$) em relação ao tratamento C18:0 (Figura 5C). Comparado ao Controle, a abundância de RNAm de SCD foi reduzida em 38 ($P=0,003$), 40 ($P=0,005$), e 37% ($P=0,003$) nos tratamentos C18:0, CLA e CLAC18:0, respectivamente (Figura 5D).

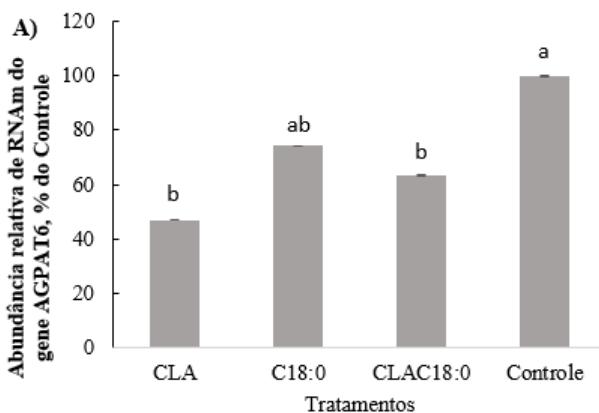
Figura 5: Abundância dos genes LPL (A), CD36 (B), FABP4 (C) e SCD (D), envolvidos na captação, transporte e dessaturação de ácidos graxos na glândula mamária de ovelhas lactantes.



*Valores apresentados como a média, letras minúsculas diferem os tratamentos entre si ($P<0,05$). Os tratamentos foram CLA (6,4g/animal/dia de CLA *trans*-10, *cis*-12), C18:0 (28g/animal/dia de C18:0), CLAC18:0 (6,4g de CLA *trans*-10, *cis*-12 e 28g de C18:0 animal/dia) e Controle.

Não foi observado efeito de tratamento para os genes envolvidos na síntese de triglicerídeos GPAT e DGAT. No entanto, a abundância de RNAm do gene AGPAT6 foi reduzida nos tratamentos CLA e CLAC18:0 em 53 (P=0,004) e 36% (P=0,04), respectivamente, comparado ao Controle (Figura 6).

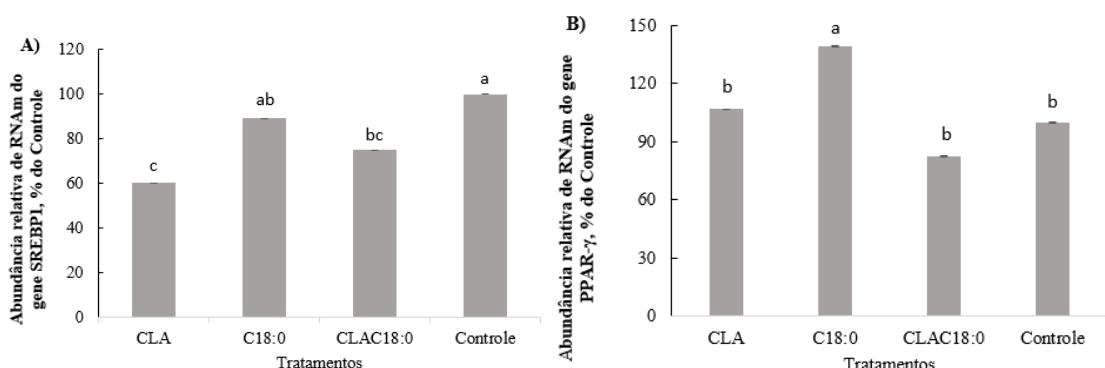
Figura 6: Abundância do gene AGPAT6, envolvido na síntese de triglicerídeos na glândula mamária de ovelhas lactantes.



*Valores apresentados como a média, letras minúsculas diferem os tratamentos entre si ($P<0,05$). Os tratamentos foram CLA (6,4g/animal/dia de CLA *trans*-10, *cis*-12), C18:0 (28g/animal/dia de C18:0), CLAC18:0 (6,4g de CLA *trans*-10, *cis*-12 e 28g de C18:0 animal/dia) e Controle.

Os tratamentos CLA e CLAC18:0 reduziram a abundância de RNAm da SREBP1 em 25 ($P=0,0059$) e 40% ($P=0,065$) comparado ao Controle. Ainda, a abundância de RNAm de SREBP1 não foi alterada quando comparado os tratamentos CLA com CLAC18:0 (0,8 e 0,9; $P=0,26$) e C18:0 com Controle (1,1 e 1,2; $P=0,42$) (Figura 7A). A abundância de RNAm de PPAR- γ não foi influenciada pelos tratamentos CLA e CLAC18:0 ($P=0,15$). No entanto, o C18:0 aumentou em 28% ($P=0,03$) a abundância de RNAm de PPAR- γ comparado ao Controle (Figura 7B).

Figura 7: Abundância dos genes SREBP1 (A) e PPAR- γ (B), envolvidos na regulação gênica na glândula mamária de ovelhas lactantes.



*Valores apresentados como a média, letras minúsculas diferem os tratamentos entre si ($P<0,05$). Os tratamentos foram CLA (6,4g/animal/dia de CLA *trans*-10, *cis*-12), C18:0 (28g/animal/dia de C18:0), CLAC18:0 (6,4g de CLA *trans*-10, *cis*-12 e 28g de C18:0 animal/dia) e Controle.

A abundância de RNAm dos genes FASN, LPL, FABP4, AGPAT6 e SREBP1 não sofreu efeito dos tratamentos C18:0 e Controle. Contudo, o fornecimento isolado de C18:0 aumentou a abundância de RNAm dos genes CD36 e PPAR- γ , que em contrapartida, reduziu a abundância de RNAm de ACACA α PII e SCD, comparados ao Controle. O C18:0 associado ao CLA *trans-10, cis-12* (CLAC18:0) não resultou em efeito sobre a abundância de RNAm dos genes FASN, LPL, CD36, FABP4, SCD, AGPAT6, SREBP1 e PPAR- γ , comparado ao tratamento CLA. No entanto, CLAC18:0 aumentou em 39% a abundância de RNAm de ACACA α PII, comparado ao CLA.

A suplementação com C18:0 demonstrou baixo potencial para mitigar os efeitos antilipogênicos de CLA *trans-10, cis-12*.

7 DISCUSSÃO

O CLA *trans-10, cis-12* causa efeitos inibitórios na síntese de gordura do leite em vacas (BAUMGARD et al. 2000, GRIINARI e BAUMAN, 2006), ovelhas (OLIVEIRA et al. 2012, HUSSEIN et al. 2013, BALDIN et al. 2013) e cabras (FERNANDES et al. 2014). Com base nisso, buscávamos compreender neste estudo se o C18:0 seria capaz de mitigar, pelo menos parcialmente, tais efeitos.

Foi observado o fornecimento de CLA *trans-10, cis-12* reduziu o teor de gordura do leite, além de apresentar maior concentração dos ácidos graxos CLA *trans-10, cis-12* e C18:1 *trans-10*, reduzindo também AG's menores que 16 carbonos provenientes da síntese *de novo*, confirmando que houve depressão de gordura do leite nos tratamentos CLA e CLAC18:0. No entanto, não foram observadas mudanças na produção de leite e teor de gordura do leite em ambos os tratamentos com suplementação de C18:0, mas apresentou redução no CMS da silagem. Desse modo, os resultados deste trabalho estão de acordo com os encontrados por Boerman et al. (2017), onde não observaram efeito na produção de leite ou teor/produção de gordura do leite em vacas suplementadas com C18:0.

Além disso, o tratamento C18:0 não foi capaz de aumentar o teor e produção de gordura do leite quando comparado ao Controle, e nem superar os efeitos antilipogênicos do CLA *trans-10, cis-12* fornecido isolado ou associado ao CLA *trans-10, cis-12* (CLAC180). Tal resposta pode estar ligada a baixa eficiência da transferência de C18:0 para glândula mamária, acarretada pela baixa digestibilidade intestinal do suplemento utilizado neste estudo (TORAL et al. 2006). Em relação a digestibilidade de C18:0, Glasser et al. (2008) realizaram uma meta-análise com um banco de dados de 77 experimentos com ácidos graxos de 18 carbonos, descrevendo que a absorção é comprometida no fluxo duodenal em dietas com alto teor de lipídeos. Corroborando com essa ideia, Rico et al. (2014b) suplementaram vacas lactantes com C16:0 e C18:0, constatando menor eficiência na absorção e no aumento do teor de gordura do leite pelo C18:0. Piantoni et al. (2015) calcularam a digestibilidade do suplemento C16:0 utilizado por Piantoni et al. (2013) e do C18:0 utilizado, descrevendo 48,1% de digestibilidade para o C16:0 e 28,4% para o C18:0, ressaltando também a baixa transferência do C18:0 para gordura do leite, comparado ao C16:0. Ainda, outros estudos têm sugerido que o C18:0

pode ter baixa solubilidade, prejudicando sua incorporação às micelas, reduzindo a absorção (PANTOJA et al. 1995; DRACKLEY, 2000).

Contudo, esperava-se que por ser o principal ácido graxo produzido pela biohidrogenação ruminal (PALMQUIST et al. 2005), a suplementação aumentaria a disponibilidade de C18:0 no duodeno, favorecendo a absorção do ácido graxo. Assim, trazendo resultados positivos como os já encontrados por Steele e Moore (1968), Steele (1969) e Piantoni et al. (2015), que mostram que a administração de C18:0 têm efeitos positivos quanto ao aumento da produção de leite, teor de gordura e ácidos graxos pré-formados.

O fornecimento de CLA *trans-10, cis-12* reduziu os AG's <16C provenientes da síntese *de novo*, concomitantemente nos tratamentos CLA e CLAC18:0, estando de acordo com os resultados encontrados por Lock et al. (2008) e Shingfield et al. (2009). Em contrapartida, os AG' poliinsaturados foram aumentados no tratamento CLA em relação ao CLAC18:0, o que sugere que a maior concentração de AG poliinsaturados no tratamento CLA seja pela sua própria composição (DRESCH, 2012).

Além disso, ambos os tratamentos que receberam CLA *trans-10, cis-12* na dieta (CLA e CLAC18:0) aumentaram a concentração do ácido graxo C18:0, em relação ao tratamento C18:0 e Controle. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Fernandes et al. (2014), Baldin et al. (2013), e Baldin et al. (2014), onde encontraram aumento do AG C18:0 com a suplementação de CLA *trans-10, cis-12* em cabras leiteiras. Isto pode ser explicado pela própria composição do suplemento fornecido aos animais (CLA *trans-10, cis-12*), o qual possui 3,9% de C18:0, ou ainda, que o CLA *trans-10, cis-12* e demais ácidos graxos fornecidos na dieta de forma não protegida sofreram biohidrogenação ruminal, chegando ao produto final C18:0 (JENKINS et al. 2008b; MAIA et al. 2010). Ainda, sugere-se que a baixa concentração de C18:0 no próprio tratamento pode ser acarretada pela baixa digestibilidade do suplemento, como já explanado nesta discussão. O fornecimento de C18:0 isolado ou em associação ao CLA *trans-10, cis-12* não foi capaz de modular o perfil de ácidos graxos, onde o tratamento CLAC18:0 apresentou os mesmos efeitos acarretados por CLA *trans-10, cis-12*.

O CLA *trans-10, cis-12* é bastante conhecido pela sua capacidade suppressora na expressão dos genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de gordura do leite na glândula mamária, sendo mais acentuada na síntese *de novo* (HUSSEIN et al. 2013; VYAS et al. 2013). Desse modo, o CLAC18:0 e C18:0 diminuíram a expressão gênica de ACACAA α PII, estando de acordo com resultados encontrados por Kadegowda et al.

(2009), Qi et al. (2014) e Horstmann (2019), onde a abundância de RNAm ACACAA α PII foi reduzida com a suplementação de C18:0. Ainda, Hansen e Knudsen (1987) e Kadegowda et al. (2009) sugeriram três razões para o efeito inibitório de ACACAA α : ácido esteárico inibe a síntese *de novo* regulando negativamente a expressão gênica de ACACA, também por uma possível competição da acil-CoA de cadeia longa, com a acil-CoA de cadeia média, as quais possuem funções distintas, realocando ácidos graxos nas posições sn-2 e sn-3 do esqueleto de triglicerídeos, e por último que a acil-CoA de cadeia longa causa um efeito supressor na ACACA.

Além disso, vale ressaltar que a redução da abundância de RNAm de ACACAA α PII no CLAC18:0, pode ser causado pelo efeito do CLA *trans-10, cis-12*, podendo ser explicado pela redução da abundância de RNAm da proteína de regulação SREBP1, a qual tem papel importante na transcrição gênica. Desse modo, Kadegowda et al. (2009) descrevem que a SREBP1 é um gene alvo de PPAR- γ , e que a expressão gênica de ambas enzimas possui grande importância na expressão dos genes ACACA PII, FASN e SCD. Assim, quando há pouca abundância de RNAm da SREBP1 e PPAR- γ , consequentemente espera-se que outros genes dependentes dessas enzimas reguladoras sejam afetados, pelo efeito transcracional inibitório causado pelo CLA *trans-10, cis-12*.

Em relação a abundância de RNAm da SCD, o tratamento C18:0 e CLAC18:0 reduziram a expressão de SCD, indicando que a capacidade de dessaturação de ácidos graxos pode ter sido comprometida com a suplementação lipídica de ácidos graxos saturados. Em contraste, o tratamento C18:0 aumentou abundância de RNAm de PPAR- γ , indo contra os resultados encontrados por Kadegowda et al. (2009), o qual confirma que SCD é um gene alvo de PPAR- γ .

O tratamento C18:0 aumentou a abundância de RNAm da CD36, a qual desempenha uma função muito importante no transporte de ácidos graxos pré-formados para dentro da glândula mamária de animais lactantes (BIONAZ e LOOR, 2008). A CD36 é bastante seletiva, tendo preferência por ácidos graxos de cadeia longa, principalmente o C18:0 (GLATZ et al. 2010), sugerindo que essa molécula seja o principal transportador de C18:0 na glândula mamária. Assim, Yonezawa et al. (2004) e Kadegowda et al. (2009) descreveram que a abundância de RNAm de CD36 foi aumentada quando células mamárias de vacas leiteiras foram cultivadas em estearato, o que está de acordo com os resultados encontrados neste estudo. No entanto, não foi observado o mesmo comportamento no tratamento CLAC18:0, indicando que o CLA *trans-10, cis-12* inibiu a abundância de RNAm de CD36, e que C18:0 não foi capaz de superar esse efeito. Além

disso, o tratamento C18:0 não estimulou o aumento da abundância de RNAm de LPL, principal gene envolvido na captação de ácidos graxos pré-formados na corrente sanguínea para que ocorra a ação de CD36. De tal modo, Ahnadi et al. (2002) suplementou cabras leiteiras com diferentes óleos vegetais, o que aumentou a concentração de C18:0 no leite, mas não apresentou diferença de tratamento para LPL, sugerindo que a captação de AG's de cadeia longa pela glândula mamária pode estar relacionada à outras enzimas que não a LPL.

Como discutido acima, a suplementação de C18:0 não foi capaz de aumentar o teor de gordura do leite, mas estimulou principalmente a expressão dos genes CD36 e PPAR- γ . O CLAC18:0 apresentou os mesmos efeitos que o CLA, para ACACA α PII, FASN, LPL, CD36, FABP4, SCD, AGPAT, SREBP1 e PPAR- γ , mostrando que o C18:0 não é capaz de reverter a síndrome de depressão de gordura do leite causada por CLA *trans-10, cis-12*.

8 CONCLUSÃO

A suplementação com C18:0 não foi capaz de aumentar o teor de gordura do leite e nem superar os efeitos antilipogênicos do CLA *trans-10, cis-12*. O CLA *trans-10, cis-12* afetou negativamente a produção de gordura do leite, a expressão dos genes envolvidos na síntese *de novo*, captação, internalização, dessaturação, síntese de triglicerídeos e fatores de transcrição, confirmado o efeito supressor sendo fornecido isoladamente e/ou juntamente com C18:0. A suplementação de C18:0 neste estudo não foi suficiente para mitigar a DGL induzida por CLA *trans-10, cis-12* em ovelhas com 36 dias de lactação.

9 REFERÊNCIAS

- ABUGHAZALEH, A. A.; JENKINS, T. C.. Docosahexaenoic Acid Promotes Vaccenic Acid Accumulation in Mixed Ruminal Cultures When Incubated with Linoleic Acid. **Journal Of Dairy Science**, Clemson, v. 87, n. 4, p.1-4, dez. 2004.
- AHNADI, C. E., N. BESWICK, L. DELBECCHI, J. J. KENNELLY, P. LACASSE.. Addition of fish oil to diets for dairy cows. II. Effects on milk fat and gene expression of mammary lipogenic enzymes. **J. Dairy Res.** 69:521–531, 2002.
- ALLEN, M. D.. Effects of Diet on Short-Term Regulation of Feed Intake by Lactating Dairy Cattle. **Journal Of Dairy Science**, Michigan, v. 83, n. 1, p.1-27, fev. 2000.
- ALMEIDA, K. A., STRUNZ, C. M. C., MARANHÃO, R. C., MANSUR, A. P.. Polimorfismo S447X da lipase lipoprotéica: influência sobre a incidência de doença arterial coronariana prematura e sobre os lipídeos plasmáticos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [s.l.], v. 88, n. 3, p.1-1, mar. 2007.
- ALVES, S. P.; BESSA, R. J. B.. He trans-10,cis-15 18:2: a Missing Intermediate of trans-10 Shifted Rumen Biohydrogenation Pathway?: 2. **Lipids**, Wiley [s.l.], v. 49, n. 6, p.527-541, 28 mar. 2014..
- BADAQUI, B., SERRADILLA, J.M., TOMÀS, A., URRUTIA, B., ARES, J.L., CARRIZOSA, J., SÀNCHEZ, A., JORDANA, J., AMILLIS, M.. Short Communication: Identification of Two Polymorphisms in the Goat Lipoprotein Lipase Gene and Their Association with Milk Production Traits. **Journal Of Dairy Science**, [s.l.], v. 90, n. 6, p.3012-3017, jun. 2007.
- BALDIN, M., GAMA, M. A. S., DRESCH, R., HAVARTINE, K. J., OLVEIRA, D. E.. A rumen unprotected conjugated linoleic acid supplement inhibits milk fat synthesis and improves energy balance in lactating goats1. **Journal Of Animal Science**, [s.l.], v. 91, n. 7, p.3305-3314, 1 jul. 2013.
- BALDIN, M., SOUZA, J., TICIANI, E., SANDRI, E. C., DRESCH, R., BATISTEL, F., OLIVEIRA, D. E.. Milk fat response to calcium salts of palm or soybean in a normal or milk fat depression scenario in dairy ewes. **Livestock Science**, v. 206, p. 109–112, 2017.
- BALDIN, M.; DRESH, R.; SOUZA, J.; FERNANDES, D.; GAMA, M.A.S.; HAVARTINE, K. J.; OLIVEIRA, D.E.. CLA induced milk fat depression reduced dry matter intake and improved energy balance in dairy goats. **Small Ruminant Research**, [s.l.], v. 116, n. 1, p.44-50, jan. 2014.
- BAUMAN, D. E.; BAUMGARD, L. H.; CORL, B.A.; J.M.. GRIINARI. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. **Proceedings Of The American Society Of Animal Science**, Helsinki, v. 1, n. 1, p.1-15, 1999.
- BAUMAN, D. E.; DAVIS, C. L. Biosynthesis of milk fat. In: LARSON, B. L.; SMITH, V. R. **Lactation: A Comprehensive Treatise**. New York: Academic, v. 2, p. 31–75. 1974.

BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J. M.. Nutritional regulation of milk fat synthesis. **Annual Reviews Nutrition**, Cornel, 23: 203-27, fev. 2003.

BAUMAN, D. E.; PERFIELD II, J. W.; HAVARTINE, K. J.; BAUMGARD, L. H.. Regulation of Fat Synthesis by Conjugated Linoleic Acid: Lactation and the Ruminant Model. **The Journal Of Nutrition**, [s.l.], v. 138, n. 2, p.403-409, 1 fev. 2008.

BAUMGARD, L. H.; MATITASHVILI, E.; DWYER, D. A.. *trans*-10, *cis*-12 Conjugated Linoleic Acid Decreases Lipogenic Rates and Expression of Genes Involved in Milk Lipid Synthesis in Dairy Cows. **Journal Of Dairy Science**, Cornel, v. 85, n. 9, p.1-9, 2002.

BAUMGARD, L.H.; CORL, B. A.; DEBRA, A. D.; SAEBO, A., BAUMAN, D. E.. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. **American Journal Of Physiology-regulatory, Integrative And Comparative Physiology**, [s.l.], v. 278, n. 1, p.179-184, jan. 2000.

BELL, S.J.; BRADLEY, D.; FORSE, R.A.; BISTTRIAN, B.R. The new dietary fats in health and disease. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v.97, p.280-286, 1997.

BENCINI, R.; PULINA, G. The quality of sheep milk: a review. **Wool Technology and Sheep Breeding**, v.45, p.182-220, 1997.

BERGER, J.; MOLLER, D. E.. The Mechanisms of Action of PPARs. **Annual Review Of Medicine**, [s.l.], v. 53, n. 1, p.409-435, fev. 2002.

BERNARD, L.; LEROUX, C.; CHILLIARD, Y.. Expression and Nutritional Regulation of Lipogenic Genes in the Ruminant Lactating Mammary Gland. **Advances In Experimental Medicine And Biology**, [s.l.], p.67-108, jun. 2008.

BIONAZ, M.; LOOR J.J. Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. **BMC Genomics**. 9:366. 2008.

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, jul. 2008.

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. **Journal Of Dairy Science**, [s.l.], v. 100, n. 4, p.2729-2738, abr. 2017.

CANNAS, A.; NUDDA, A. F. S.; PULINA, G.. Nutritional strategies to improve lactation persistency in dairy ewes. **Researchgate**, Nova York. p.17-59, nov. 2002.

CARREÑO, D., HERVÁS, G., TORAL, P. G., CASTRO-CARRERA, T., FRUTOS, P.. Fish oil-induced milk fat depression and associated downregulation of mammary lipogenic genes in dairy ewes. **Journal Of Dairy Science**, [s.l.], v. 99, n. 10, p.7971-7981, out. 2016.

CORL, B. A.; BAUMGARD, L. H.; DWYER, D.A.; GRIINARI, J. M.; PHILLIPS, B. S.; BAUMAN, D. E..The role of Δ9-desaturase in the production of *cis*-9, *trans*-11

CLA. **The Journal Of Nutritional Biochemistry**, [s.l.], v. 12, n. 11, p.622-630, nov. 2001.

DESVERGNE, B., FEIGE, J. N., CASALS-CASAS, C.. PPAR-mediated activity of phthalates: A link to the obesity epidemic?. **Molecular And Cellular Endocrinology**, Elsevier BV, [s.l.], v. 304, n. 1-2, p.43-48, 25 maio 2009.

DIIS, R. R. Milk fat synthesis. Page 141 in Biochemistry of lactation. T. B. Mvpham, ed. Elsevier Science. Publ., Amsterdam, Nvth, 1983.

DOEGE, H., STAHL, A.. Protein-Mediated Fatty Acid Uptake: Novel Insights from In Vivo Models. **Physiology**, [s.l.], v. 21, n. 4, p.259-268, ago. 2006.

DOREAU, M., CHILLIARD, Y.. Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals. **British Journal Of Nutrition**, Saint Genes Champanelle, v. 78, n. 1, p.15-35, jan. 1997.

DRACKLEY, J. K.. Lipid Metabolism: Digestion, Absorption and Transport of Dietary Lipids. In: D'MELLO, J.P.F.. **Farm Animal Metabolism and Nutrition**. Edinburgh: Cabi Publishing, Cap. 5. p. 105-127. 2000.

DRESCH, R. **Parâmetros produtivos, perfil de ácidos graxos do leite e balanço energético de cabras alimentadas com dieta contendo fonte não protegida de ácido linoleico conjugado (CLA)**. 2012. 65 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência Animal, Produção Animal, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2012

EBERLE, D., CLEMENT, K., MEYRE, D., SAHBATOU, M., VAXILLAIRE, M., GALL, A. L., FERRÉ, P., BASDEVANT, A., FROGUEL, P., FOUFELLE, F.. SREBF-1 Gene Polymorphisms Are Associated With Obesity and Type 2 Diabetes in French Obese and Diabetic Cohorts. **Diabetes**, [s.l.], v. 53, n. 8, p.2153-2157, 26 jul. 2004.

ENJALBERT, F.; NICOT, M. C.; BAYOURTHE, C.; MONCOULONT, R.. Effects of Duodenal Infusions of Palmitic, Stearic, or Oleic Acids on Milk Composition and Physical Properties of Butter. **Journal Of Dairy Science**, [s.l.], v. 83, n. 7, p.1428-1433, jul. 2000.

FERNANDES, D., GAMA, M. A., RIBEIRO, C. V. D. M., LOPES, F. C. F., OLIVEIRA, D. E.. Milk fat depression and energy balance in stall-fed dairy goats supplemented with increasing doses of conjugated linoleic acid methyl esters. **Animal**, [s.l.], v. 8, n. 04, p.587-595, 18 mar. 2014.

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. **Journal Of Dairy Science**, Leon, v. 100, n. 12, p.1-13, ago. 2017.

FUENTES, M. C., CASAMIGLIA, S., FIEVEZ, V., BLANCH, M., MECADAL, D.. Effect of pH on ruminal fermentation and biohydrogenation of diets rich in omega-3 or omega-6 fatty acids in continuous culture of ruminal fluid. **Animal Feed Science And Technology**, [s.l.], v. 169, n. 1-2, p.35-45, out. 2011.

- GLASSER, F., SCHMIDELY, P., SAUVANT, D., DOREAU, M.. Digestion of fatty acids in ruminants: a meta-analysis of flows and variation factors: 2. C18 fatty acids. **Animal**, Cambridge, v. 2, n. 5, p.691-704, maio 2008.
- GLATZ, J. F. C., LUIKEN, J. J. F. P., BONEN, A.. Membrane Fatty Acid Transporters as Regulators of Lipid Metabolism: Implications for Metabolic Disease. **Physiological Reviews**, American Physiological Society, [s.l.], v. 90, n. 1, p.367-417, jan. 2010.
- GRANADOS-RIVERA, L. D., HERNANDEZ-MENDO, O., GONZALEZ-MUÑOZ, S. S., BURGUÑO-FERREIRA, J. A., MENDOZA-MARTÍNEZ, G. D., ARRIAGA-JORDAN, C. M.. Effect of palmitic acid on the mitigation of milk fat depression syndrome caused by trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid in grazing dairy cows. **Archives Of Animal Nutrition**, [s.l.], v. 71, n. 6, p.428-440, 4 out. 2017.
- GRIINARI, J. M., CORL, B. A., LACY, S. H., CHOUINARD, P. Y., NURMELA, K. V. V., BAUMAN, D. E.. Conjugated Linoleic Acid Is Synthesized Endogenously in Lactating Dairy Cows by Δ9-Desaturase. **The Journal Of Nutrition**, [s.l.], v. 130, n. 9, p.2285-2291, 1 set. 2000.
- HANSEN, H.O., KNUDSEN, J. Effect of Exogenous Long-Chain Fatty Acids on Lipid Biosynthesis in Dispersed Ruminant Mammary Gland Epithelial Cells: Esterification of Long-Chain Exogenous Fatty Acids. **Journal Of Dairy Science**, [s.l.], v. 70, n. 7, p.1344-1349, jul. 1987.
- HARVATINE, K. J., BAUMAN, D. E.. 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. **The Journal Of Nutrition**, [s.l.], v. 136, n. 10, p.2468-2474, 1 out. 2006.
- HARVATINE, K.J.; BOISCLAIR, Y.R.; BAUMAN, D.E. Recent advances in the regulation of milk fat synthesis. **Animal**, v.3, p.40–54, 2008.
- HORSTMANN, R.. **Efeito do ácido esteárico (c18:0) sobre a produção, composição, perfil de ácidos graxos do leite e expressão de genes lipogênicos em ovelhas.** 2019. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência Animal, Produção Animal, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2019.
- HURLEY, W. L.. Mammary Gland Function During Involution. **Journal Of Dairy Science**, [s.l.], v. 72, n. 6, p.1637-1646, jun. 1988.
- HUSSEIN, M., HAVARTINE, K. H., WEERASINGHE, W. M. P. B., SINCLAIR, L. A., BAUMAN, D. E.. Conjugated linoleic acid-induced milk fat depression in lactating ewes is accompanied by reduced expression of mammary genes involved in lipid synthesis. **Journal Of Dairy Science**, [s.l.], v. 96, n. 6, p.3825-3834, jun. 2013.
- JAMES, A.T., MARSH, J.B.. The formation of hydroxystearic acids during the conversion of stearic to oleic acid by liver and yeast preparations. **Biochimica Et Biophysica Acta**: The National Institute for Medical Research, London, v. 57, n. 1, p.170-171, 1962.
- JENKINS, T. C., MCGUIRE, M. A.. Major Advances in Nutrition: Impact on Milk Composition. **Journal Of Dairy Science**, Clemson, v. 89, n. 4, p.1-9, abr. 2006.

JENKINS, T.C. Lipid Metabolism in the Rumen. **Journal Of Dairy Science**, v. 76, n. 12, p.3851-3863, dez. 1993.

JENKINS, T.C., WALLACE, R. J., MOATE, P. J., MOSLEY, E. E.. Board-Invited Review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. **Journal Animal Science**. v. 86. p. 397-412, 2008.

JENKINS, T. C., WALLACE, R. J., MOATE, P. J., MOSLEY, E. E., JENSEN, R. G.. The Composition of Bovine Milk Lipids: January 1995 to December 2000. **Journal Of Dairy Science**, Connecticut, v. 85, n. 2, p.295-350, 2002.

KADEGOWDA, A. K., BIONAZ, M., PIPEROVA, L. S., ERDMAN, R. A., LOOR, J. J.. Peroxisome proliferatoractivated receptor- γ activation and long-chain fatty acids alter lipogenic gene networks in bovine mammary epithelial cells to various extents. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 4276–4289, 2009.

KAY, J. K., MACKLE, T. R., AULDIST, M. J., THOMSON, N. A., BAUMAN, D. E.. Endogenous Synthesis of cis-9, trans-11 Conjugated Linoleic Acid in Dairy Cows Fed Fresh Pasture. **Journal Of Dairy Science**, [s.l.], v. 87, n. 2, p.369-378, fev. 2004.

KOCH, L. E., JENKINS, T. C., BRIDGES, W. C.. Changes in fermentation and animal performance during recovery from classical diet-induced milk fat depression using corn with differing rates of starch degradability. **Journal Of Dairy Science**, Clemson, v. 102, n. 6, p.5079-5093, jun. 2019.

KOZLOSKI, G. V.. **Bioquímica dos Ruminantes:** Digestão e absorção dos lipídeos. 3. ed. Santa Maria: Editora Ufsm, p. 131. 2011.

KRAMER, K. G., FELLNER, V., DUGAN, M. E., SAUER, F. D., MOSSOBA, M. M., YURAWECZ, M. P.. 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.

LOOK, A. L., HARVATINE, K. J., DRACKLEY, J. K., D. E. BAUMAN.. Concepts in fat and fatty acid digestion in ruminants. **Intermountain Nutrition: Concepts In Fat And Fatty Acid Digestion In Ruminants**, Ilinóis, p.85-100, 2006.

LOURENÇO, M., RAMOS-MORALES, E., WALLACE, R. J.. The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. **Animal**, [s.l.], v. 4, n. 7, p.1008-1023, 23 mar. 2010.

MA, L., COOK, K. L., BAUMAN, D. E., HARVATINE, K. J.. Milk fat depression induced by conjugated linoleic acid and a high-oil and low-fiber diet occurs equally across the day in Holstein cows. **Journal Of Dairy Science**, Pennsylvania, p.1-5, jul. 2014.

MAIA, M.R.G.; CHAUDHARY, L.C.; FIGUERES, L.; WALLACE, R.J. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. **Springer Nature**. [s.l.], v. 91, n. 4, p.303-314, 28 out. 2006.

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

McKAIN, N., LARSON, T. R., GRAHAM, I. A., WALLACE, R. J.. Toxicity of

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

NAFIKOV, R. A., SCHOONMAKER, J. P., KOM, K. T., NOACK, K., GARRICK, D. J., KOEHLER, K. J., MONICK-BORMANN, J., REECY, J. M., SPARLOCK, D. E., BEITZ, D. C.. Association of polymorphisms in solute carrier family 27, isoform A6 (SLC27A6) and fatty acid-binding protein-3 and fatty acid-binding protein-4 (FABP3 and FABP4) with fatty acid composition of bovine milk. **Journal Of Dairy Science**, [s.l.], v. 96, n. 9, p.6007-6021, set. 2013.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of small ruminants**. p.362. 2007.

OLIVEIRA, D. E., GAMA, M. A. S., FERNANDES, D., TEDESCHI, L. O, BAUMAN, D. E.. An unprotected conjugated linoleic acid supplement decreases milk production and secretion of milk components in grazing dairy ewes. **Journal Of Dairy Science**, [s.l.], v. 95, n. 3, p.1437-1446, mar. 2012.

PALMQUIST, D. L., JENKINS, T. C.. Fat in lactation rations: Review. **Journal Dairy Science**. 63:1–14, 1980.

PALMQUIST, D. L.. Milk fat: Origin of fatty acids and influence of nutritional factors thereon. Pages 43–92 in Advanced Dairy Chemistry: v.2: Lipids. 3rd ed. P. F. Fox and P. L. H. McSweeney, ed. Springer, New York, NY. 2006.

PALMQUIST, D., LOOK, A. L., SHINGFIELD, K. J., BAUMAN, D. E.. Biosynthesis of Conjugated Linoleic Acid in Ruminants and Humans. **Advances In Food And Nutrition Research**, [s.l.], p.179-217, 2005.

PANTOJA, J., FIRKINS, J. L., EASTRIDGE, M. L.. Site of digestion and milk production by cows fed fats differing in saturation, esterification, and chain length. *J. Dairy Sci.* 78:2247–2258, 1995.

PARIZA, M. W., PARK, Y., COOK, M. E. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Progress in Lipid Research*, v 40, p. 283-298, 2001.

PARK, Y., STORKSON, J. M., NTAMBI, J. M., COOK, M. E., SIH, C. J., PARIZA, M. W.. Inhibition of hepatic stearoyl-CoA desaturase activity by trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid and its derivatives. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular And Cell Biology Of Lipids**, [s.l.], v. 1486, n. 2-3, p.285-292, jul. 2000.

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

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

QI, Lizhi.; YAN, S.; SHENG, R.; ZHAO, Y.; GUO, X.. 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.

REDDY, P.V., MORRIL, J.L., NAGARAJA, T.G.. Release os fatty acids from raw or processed soybeans and subsequente effects on fiber digestibilities. **Journal of Dairy Science**, v.77, p.341-346, 1994.

RICO, D.E. YING, Y. HARVARTINE, K.J. The effect of rumen digesta inoculation on the time course of recovery from classical diet-induced milk fat depression in dairy cows. **Journal Of Dairy Science**, [s.l.], v. 97, n. 6, p.3752-3760, jun. 2014.

RICO, J. E. N. The Impact of Feeding Palmitic and Stearic Acid to Lactating Dairy Cows. 2013. Tese (Animal Science - Master of Science) - Michigan State University, Michigan, EUA, 2013.

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. **Journal Of Dairy Science**, [s.l.], v. 97, n. 2, p.1057-1066, fev. 2014b.

SAMPATH, H., NTAMBI, J. M.. The Fate and Intermediary Metabolism of Stearic Acid. **Symposium On Dietary Stearic Acid**, Wisconsin, v. 40, n. 12, p.1-5, dez. 2005.

SAS Institute Inc. **SAS**: Users Guide. Version 9.0. ed. Cary, NC, 2009.

SHINGFIELD, K. J., WALLACE, R. J.. CHAPTER 1. Synthesis of Conjugated Linoleic Acid in Ruminants and Humans. **Catalysis Series**, Royal Society of Chemistry, [s.l.], p.1-65, jul. 2014.

SHINGFIELD, Kevin J., GRIINARI, J. Mikko. Role of biohydrogenation intermediates in milk fat depression. **European Journal Of Lipid Science And Technology**, Wiley. [s.l.], v. 109, n. 8, p.799-816, ago. 2007.

SKLAN, D., ARIELI, A., CHALUPA, W., KRONFELD, D.S..Digestion and absorption of lipids and bile acids in sheep fed stearic acid, oleic acid, or tristearin. **Journal of Dairy Science** 68 1667–1675. 1985.

SMITH, S. The animal fatty acid synthase: One gene, one polypeptide, seven enzymes. **The FASEB Journal**, v. 8, p. 1248–1259, 1994.

SMITH, S.. Mechanism of Chain Length Determination in Biosynthesis of Milk Fatty Acids. **Journal Of Dairy Science**, [s.l.], v. 63, n. 2, p.337-352, fev. 1980.

SMITH, Steven J. et al. Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking Dgat. **Nature Genetics**, [s.l.], v. 25, n. 1, p.87-90, maio 2000.

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

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

TORAL, P. G., HERVÁS, G., CARREÑO, D., P. FRUTOS. Does supplemental 18:0 alleviate fish oil-induced milk fat depression in dairy ewes? **Journal Of Dairy Science**, Leon, v. 99, n. 2, p.1-13, dez. 2016.

TORAL, P.G., P. FRUTOS., P. GÓMEZ-CORTÉS., M. JUAREZ., M.A. FUENTE.. Changes in milk fatty acid profile and animal performance in response to fish oil supplementation, alone or in combination with sunflower oil, in dairy ewes. **Journal Of Dairy Science**, [s.l.], v. 93, n. 4, p.1604-1615, abr. 2010.

VYAS, D., MOALLEM, U., TETER, B. B., A. R. K. FARDIN-KIA., ERDMAN R. A.. Milk fat responses to butterfat infusion during conjugated linoleic acid-induced milk fat depression in lactating dairy cows. **Journal Of Dairy Science**, Baltimore, p.1-14, jan. 2013.

YONEZAWA, T., YONEKURA, S., KOBAYASHI, Y., HAGINO, A., KATOH, K., OBARA, Y.. Effects of long-chain fatty acids on cytosolic triacylglycerol accumulation and lipid droplet formation in primary cultured bovine mammary epithelial cells. **Journal Dairy Science**. 87:2527–2534. 2004.

ZHU, J. J., LUO, J., SUN, Y. T., SHI, H. B., LI, J., WU, M., YU, K., BAILE, A. B., LOOR, J. J.. Short communication: Effect of inhibition of fatty acid synthase on triglyceride accumulation and effect on lipid metabolism genes in goat mammary epithelial cells. **Journal Of Dairy Science**, [s.l.], v. 98, n. 5, p.3485-3491, maio 2015.