

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE ENGENHARIAS, CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

VITOR KOSLOSKI

**QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS A GORDURA
DO LEITE EM BOVINOS DA RAÇA HOLANDESA (*Bos taurus*) SUBMETIDOS A
DIETA COM SUPLEMENTAÇÃO LIPÍDICA**

**PONTA GROSSA
2026**

VITOR KOSLOSKI

**QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS A GORDURA
DO LEITE EM BOVINOS DA RAÇA HOLANDESA (*Bos taurus*) SUBMETIDOS A
DIETA COM SUPLEMENTAÇÃO LIPÍDICA**

Dissertação apresentada para obtenção
do título de mestre na Universidade
Estadual de Ponta Grossa, Zootecnia
(Produção Animal).

Orientadora: Profa. Dra. Viviane Nogaroto
Vicari

Coorientadora: Profa. Dra. Larissa
Glugoski

PONTA GROSSA

2026

K86 Kosloski, Vitor

Quantificação da expressão de genes relacionados a gordura do leite em bovinos da raça holandesa (*Bos taurus*) submetidos a dieta com suplementação lipídica / Vitor Kosloski. Ponta Grossa, 2026.

62 f.

Dissertação (Mestrado em Zootecnia - Área de Concentração: Produção Animal), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Viviane Nogaroto.
Coorientadora: Profa. Dra. Larissa Glugoski.

1. Bovinos leiteiros - Nutrição. 2. Lecitina de soja na alimentação animal. 3. Lipogênese em animais. 4. Gordura do leite - Síntese. 5. Produção leiteira. I. Nogaroto, Viviane. II. Glugoski, Larissa. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Produção Animal. IV.T.

CDD: 636.2412



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Av. General Carlos Cavalcanti, 4748 - Bairro Uvaranas - CEP 84030-900 - Ponta Grossa - PR - <https://uepg.br>

TERMO

TERMO DE APROVAÇÃO

VITOR KOSLOSKI

“Quantificação da expressão de genes relacionados à gordura do leite em bovinos da raça holandesa (*Bos taurus*) submetidos a dieta com suplementação lipídica.”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Zootecnia – Mestrado em Zootecnia, Setor de Ciências Agrárias e Tecnologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Ponta Grossa, 27 de fevereiro de 2026.

Documento assinado digitalmente
gov.br VIVIANE NOGAROTO VICARI
Data: 27/02/2026 18:03:14-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br LARISSA GLUGOSKI
Data: 02/03/2026 09:26:25-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br ADRIANA DE SOUZA MARTINS
Data: 02/03/2026 01:03:56-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br VIVIANE DEMETRIO DO NASCIMENTO
Data: 27/02/2026 20:25:16-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Membros da Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Viviane Nogaroto Vicari – UEPG
Presidente

Prof.^a Dr.^a Larissa Glugoski – UEPG
Membro Interno

Prof.^a Dr.^a Adriana de Souza Martins – UEPG
Membro Interno

Prof.^a Dr.^a Viviane Demetrio do Nascimento – UTFPR
Membro Externo

***“From so simple a beginning endless forms most beautiful and most wonderful
have been, and are being, evolved.”
— Charles Darwin.***

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela minha vida, família, oportunidades e pela força para superar todos os desafios.

À minha família - meu pai Almir José Kosloski, minha mãe Josele Horodecki e minha irmã Luiza Kosloski -, que sempre me apoiaram e incentivaram na escolha da minha profissão e especialização, estando ao meu lado em momentos difíceis, me dando forças para continuar meu caminho com fé e coragem.

À minha orientadora, Profa. Dra. Viviane Nogaroto Vicari, pela orientação dedicada, paciência, ensinamentos teóricos e práticos, além das sugestões valiosas que enriqueceram este trabalho, complementando um projeto iniciado na graduação que buscava unificar diferentes áreas do conhecimento em prol do desenvolvimento científico.

Ao grupo de pesquisa Chromosome Biology: Structure and Function (CBSF Lab), pelo auxílio e ensinamentos, em especial à minha co-orientadora Profa. Dra. Larissa Glugoski e ao Prof. Dr. Matheus Azambuja dos Santos, pela ajuda solícita e didática nas coletas, processamento das amostras e análises experimentais.

Aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (PPZ/UEPG), em especial à Profa. Dra. Adriana de Souza Martins, cujas aulas serviram de base teórica para parte valiosa deste trabalho.

Ao meu grande amor, Letícia Catarina Nazar, pelo apoio incondicional, compreensão e carinho. Você é meu porto seguro nos dias mais difíceis, minha força, inspiração e meu maior orgulho.

Por fim, agradeço ao CNPq e à CAPES pela bolsa e recursos que viabilizaram esta pesquisa.

RESUMO

A fração lipídica do leite é um dos principais determinantes de seu valor nutricional, tecnológico e econômico, sendo influenciada por fatores genéticos, fisiológicos, ambientais e nutricionais. Estratégias nutricionais capazes de modular a composição da gordura do leite, especialmente por meio da suplementação lipídica, têm despertado interesse crescente na bovinocultura leiteira. Entre essas estratégias, a utilização da lecitina de soja destaca-se por seu elevado teor de fosfolipídios e potencial efeito sobre o metabolismo lipídico e a expressão gênica na glândula mamária. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da suplementação dietética com diferentes níveis de lecitina de soja sobre a composição do leite e sobre a expressão de genes relacionados à síntese de gordura em vacas da raça Holandesa. O experimento foi conduzido em delineamento de quadrado latino duplo 4×4, utilizando-se oito vacas Holandesas em lactação, submetidas a dietas contendo 0%, 0,75%, 1,5% e 2,2% de lecitina de soja, com base na matéria seca. A composição do leite foi avaliada quanto aos teores de gordura e proteína, considerando-se também os dias em lactação. A expressão gênica foi quantificada a partir de células somáticas do leite, por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR), avaliando-se os genes *FASN*, *ACACA-α*, *LPL* e *GPAM*. Os resultados indicaram que a suplementação com lecitina de soja não alterou significativamente os teores de gordura e proteína do leite, porém promoveu aumento na expressão dos genes *GPAM* e *FASN* nos animais submetidos ao maior nível de inclusão. Conclui-se que a lecitina de soja pode modular a expressão de genes lipogênicos na glândula mamária, contribuindo para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na síntese de gordura do leite e oferecendo subsídios para o desenvolvimento de estratégias nutricionais mais eficientes na produção leiteira.

Palavras-chave: células somáticas; lecitina de soja; lipogênese; qRT-PCR; vacas leiteiras.

ABSTRACT

The lipid fraction of milk is one of the main determinants of its nutritional, technological, and economic value, being influenced by genetic, physiological, environmental, and nutritional factors. Nutritional strategies capable of modulating milk fat composition, particularly through lipid supplementation, have gained increasing attention in dairy production systems. Among these strategies, soybean lecithin stands out due to its high phospholipid content and its potential effects on lipid metabolism and gene expression in the mammary gland. In this context, the present study aimed to evaluate the effects of dietary supplementation with different levels of soybean lecithin on milk composition and on the expression of genes related to fat synthesis in Holstein cows. The experiment was conducted using a 4 × 4 double Latin square design, involving eight lactating Holstein cows fed diets containing 0%, 0.75%, 1.5%, and 2.2% soybean lecithin on a dry matter basis. Milk composition was evaluated for fat and protein contents, also considering days in milk. Gene expression was quantified from milk somatic cells using quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), assessing the genes *FASN*, *ACACA-α*, *LPL*, and *GPAM*. The results indicated that soybean lecithin supplementation did not significantly affect milk fat and protein contents; however, it increased the expression of the *GPAM* and *FASN* genes at the highest inclusion level. It is concluded that soybean lecithin can modulate the expression of lipogenic genes in the mammary gland, contributing to the understanding of molecular mechanisms involved in milk fat synthesis and providing support for the development of more efficient nutritional strategies in dairy production.

Keywords: dairy cows; lipogenesis; somatic cells; qRT-PCR; soy lecithin.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Via de formação do ácido linoleico conjugado (CLA) em ruminantes. Esquema da biohidrogenação ruminal do ácido linoleico e da conversão do ácido vacênico em CLA na glândula mamária..... 23
- Figura 2** – Síntese de gordura do leite na célula epitelial mamária de ruminantes, evidenciando a participação das proteínas presentes neste processo..... 26
- Figura 3** – Distribuição dos teores de gordura (A) e proteína (B) do leite ao longo dos diferentes estágios da lactação (0–60, 61–120, 121–200 e >200 dias). (* $p < 0,05$). 45
- Figura 4** – Expressão relativa dos genes envolvidos na lipogênese de ácidos graxos *GPAM*, *FASN*, *ACACA- α* e *LPL*, após suplementação com lecitina de soja a 0%, 0,75%, 1,5% e 2,2%. A) *GPAM*; B) *FASN*; C) *ACACA- α* ; D) *LPL*. (**** $p < 0,0001$; * $p < 0,05$). 47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química e percentual dos ingredientes das dietas experimentais contendo diferentes concentrações de lecitina de soja: 0%, 0,75%, 1,5% e 2,2%.....	40
Tabela 2 – Sequências dos primers forward (F) e reverse (R) (orientação 5' → 3'), tamanhos dos amplicons (em pares de bases, pb) e valores de eficiência dos <i>primers</i> (Eff, em %) utilizados para a amplificação dos genes <i>FASN</i> , <i>ACACA-α</i> , <i>LPL</i> , <i>GPAM</i> e <i>ACTB</i>	41
Tabela 3 – Médias descritivas, níveis de probabilidade e equações de regressão para os efeitos linear (L), quadrático (Q) e cúbico (C) da produção diária de leite (PL), teores de gordura e proteína, e erro padrão da média (SEM), de acordo com os níveis de suplementação com lecitina de soja em vacas leiteiras.....	44
Tabela 4 – Efeitos dos dias em lactação (DEL) e dos tratamentos sobre os teores de gordura e proteína do leite.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACACA- α – *Acetyl-CoA Carboxylase Alpha* (Acetil-CoA carboxilase alfa)
- ACC – *Acetyl-CoA Carboxylase* (Acetil-CoA carboxilase)
- ACTB – *Actin Beta* (Beta-actina)
- AG – Ácidos graxos
- AGPAT – *1-Acylglycerol-3-Phosphate Acyltransferase* (1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferase)
- ANOVA – *Analysis of Variance* (Análise de variância)
- BCFA – *Branched-Chain Fatty Acids* (Ácidos graxos de cadeia ramificada)
- BHBA – *β -hydroxybutyrate* (β -hidroxibutirato)
- CCS – Contagem de células somáticas
- CEPEA – Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada
- CLA – *Conjugated Linoleic Acid* (Ácido linoleico conjugado)
- CLD – *Cytoplasmic Lipid Droplet* (Gotícula lipídica citoplasmática)
- Ct – *Cycle threshold* (Ciclo limiar)
- DEL – Dias em lactação
- DGAT – *Diacylglycerol Acyltransferase* (Diacilglicerol aciltransferase)
- DHA – *Docosahexaenoic Acid* (Ácido docosa-hexaenoico)
- DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido desoxirribonucleico)
- EPM – Erro padrão da média
- EPA – *Eicosapentaenoic Acid* (Ácido eicosapentaenoico)
- ER – *Endoplasmic Reticulum* (Retículo endoplasmático)
- FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação)
- FASN – *Fatty Acid Synthase* (Ácido graxo sintase)
- GPAM – *Glycerol-3-Phosphate O-Acyltransferase, Mitochondrial* (Glicerol-3-fosfato O-aciltransferase mitocondrial)
- GPAT – *Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase* (Glicerol-3-fosfato aciltransferase)
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- LPL – *Lipoprotein Lipase* (Lipoproteína lipase)
- MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- MFG – *Milk Fat Globule* (Glóbulo de gordura do leite)
- mRNA – *Messenger Ribonucleic Acid* (RNA mensageiro)

NEFA – *Non-Esterified Fatty Acids* (Ácidos graxos não esterificados)

OBCFA – *Odd- and Branched-Chain Fatty Acids* (Ácidos graxos ímpares e ramificados)

pb – Pares de bases

PL – Produção de leite

PUFA – *Polyunsaturated Fatty Acids* (Ácidos graxos poli-insaturados)

qRT-PCR – *Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real)

RNA – *Ribonucleic Acid* (Ácido ribonucleico)

SOD – *Superoxide Dismutase* (Superóxido dismutase)

SOD1 – *Superoxide Dismutase 1* (Superóxido dismutase 1)

SOD2 – *Superoxide Dismutase 2* (Superóxido dismutase 2)

SOD3 – *Superoxide Dismutase 3* (Superóxido dismutase 3)

SREBP1 – *Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1* (Proteína de ligação ao elemento regulador de esteróis 1)

TAG – Triacilglicerol

VLDL – *Very Low-Density Lipoprotein* (Lipoproteína de muito baixa densidade)

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	12
1.1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1.1 Hipóteses.....	15
1.1.2 Objetivo Geral.....	16
1.2.1 Bovinos da Raça Holandesa.....	16
1.2.2 Composição do Leite.....	17
1.2.2.1 Células somáticas do leite.....	19
1.2.2.2 Proteínas do leite.....	19
1.2.2.3 Lipídios.....	20
1.2.2.3.1 <i>Síntese de gordura do leite na glândula mamária</i>	21
1.2.2.4 Ácidos graxos no leite bovino.....	22
1.2.3 Genes Relacionados ao Metabolismo Lipídico.....	25
1.2.4 Suplementação Lipídica na Dieta de Bovinos Leiteiros.....	28
REFERÊNCIAS.....	30
CAPÍTULO 2 – A LECITINA DE SOJA COMO MODULADORA DA EXPRESSÃO DE FASN E GPAM EM VACAS LEITEIRAS HOLANDESAS.....	34
2.1 INTRODUÇÃO.....	36
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
2.2.1 Delineamento Experimental e Coleta de Amostras.....	38
2.2.2 Desenho dos Primers.....	41
2.2.3 Extração de RNA Total e Ensaio de qRT-PCR.....	42
2.2.4 Análises Estatísticas.....	43
2.3 RESULTADOS.....	44
2.5 CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS.....	52
ANEXO A – PROTOCOLO: EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DE CÉLULAS SOMÁTICAS DO LEITE.....	56
ANEXO B – PROTOCOLO: SÍNTESE DE cDNA.....	58
ANEXO C – PROTOCOLO: DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DOS PRIMERS E ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR qRT-PCR.....	60
ANEXO D – CONTROLE LEITEIRO.....	62

CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura leiteira constitui uma das atividades pecuárias de maior relevância no cenário mundial, tanto do ponto de vista econômico, quanto social e nutricional. O leite é um dos alimentos mais consumidos globalmente e seus derivados representam fontes importantes de proteínas de elevado valor biológico, lipídios, lactose e minerais essenciais, compondo a base da dieta de milhões de pessoas (FAO, 2024). Além do papel nutricional, o setor lácteo impulsiona cadeias industriais, de serviços e de logística, o que reforça sua importância estratégica para o agronegócio mundial (CEPEA, 2024).

De acordo com dados da FAO, a produção global de leite alcançou cerca de 985 milhões de toneladas em 2024, mantendo a tendência de crescimento observada nos últimos anos e com expansão destacada em regiões como Ásia e Oceania (FAO, 2024). No Brasil, a produção de leite também atingiu um patamar histórico, totalizando aproximadamente 35,7 bilhões de litros em 2024, o que representa um aumento de 1,4% em relação a 2023 apesar da redução no número de vacas ordenhadas (IBGE, 2025). A distribuição dessa produção no território nacional, entretanto, continua concentrada nas regiões Sudeste e Sul, que juntas respondem pela maior parte do volume produzido, com Minas Gerais e Paraná entre os principais estados produtores (IBGE, 2025).

No estado do Paraná, a bovinocultura leiteira consolidou-se como uma das atividades agropecuárias mais representativas, com uma produção estimada em cerca de 4,6 bilhões de litros em 2024, respondendo por cerca de 12,9% da produção nacional, e com municípios como Castro, que se destacou com cerca de 484,4 milhões de litros, e Carambeí, com aproximadamente 293,1 milhões de litros, figurando entre os maiores produtores do país (IBGE, 2025). Esses valores refletem ganhos de produtividade e organização da cadeia produtiva leiteira, mesmo frente a desafios como a redução do efetivo de vacas ordenhadas no estado (IBGE, 2025). Essa expressividade decorre da combinação de fatores como a base cooperativista sólida, a adoção de tecnologias de manejo e nutrição, e a utilização de genética especializada, fatores que conferem à região índices produtivos comparáveis aos de países líderes mundiais (Santos *et al.*, 2020; Rocha *et al.*, 2020).

Apesar do alto desempenho observado em polos produtivos como os Campos Gerais, a produção leiteira brasileira ainda apresenta caráter heterogêneo. Estima-se que mais de 70% das propriedades leiteiras nacionais produzam menos de 200 litros por dia, predominantemente em sistemas familiares de baixa escala, o que contrasta com a elevada tecnificação presente em regiões de maior expressão econômica (EMBRAPA, 2022). Essa dualidade evidencia desafios para a cadeia, que precisa conciliar sistemas modernos e competitivos com a inclusão produtiva de pequenos produtores, garantindo sustentabilidade econômica e social.

A valorização da qualidade do leite está intrinsecamente associada à sua composição, especialmente ao teor de sólidos totais, que compreende a fração de gordura, proteína, lactose e minerais. Entre esses componentes, a gordura e a proteína são os principais determinantes do valor econômico do leite, uma vez que influenciam diretamente o rendimento industrial e a qualidade dos derivados lácteos (Walstra, Wouters, Geurts, 2006; Fox *et al.*, 2015). Nesse contexto, modelos de pagamento por sólidos, amplamente adotados por cooperativas e indústrias, remuneram os produtores com base na concentração desses constituintes, incentivando a adoção de estratégias nutricionais e genéticas voltadas ao aumento da densidade composicional do leite (Santos, Fonseca, Zanela, 2020; Souza *et al.*, 2023).

Do ponto de vista industrial, a concentração de sólidos exerce impacto direto sobre a eficiência de processamento, especialmente na produção de queijos, manteiga e leite em pó, nos quais a fração lipídica desempenha papel central na textura, no sabor e no rendimento final dos produtos (Walstra, Wouters, Geurts, 2006; Fox *et al.*, 2015). Dentre os constituintes do leite, a gordura destaca-se como o componente de maior variabilidade, sendo altamente sensível a fatores como dieta, estágio de lactação, balanço energético e condições ambientais (Bauman, Griinari, 2003; Jensen, 2002; Gómez-Cortés *et al.*, 2021). Essa variabilidade confere à gordura do leite um papel estratégico tanto na remuneração do produtor quanto na padronização industrial, tornando-a um dos principais alvos de intervenções nutricionais e estudos voltados à modulação da composição láctea (Palmquist, Jenkins, 1980; Bauman, Griinari, 2003).

A composição do leite, entretanto, é influenciada por múltiplos fatores, incluindo genética, nutrição, estágio de lactação, ambiente e sanidade da glândula mamária (Lindmark-Månsson *et al.*, 2006; Walstra; Wouters; Geurts, 2006). Alterações nesses

parâmetros afetam não apenas o valor pago ao produtor, mas também o rendimento industrial e as propriedades físico-químicas e sensoriais dos derivados (Knight *et al.*, 1998; Fox *et al.*, 2015), reforçando a importância do controle e da compreensão dos determinantes da fração sólida do leite.

Entre as raças bovinas leiteiras, a Holandesa (*Bos taurus*, Holstein-Friesian) ocupa posição de destaque. Presente em mais de 160 países, é considerada a raça de maior expressão mundial, devido à elevada capacidade produtiva, à adaptabilidade a diferentes sistemas de manejo e à composição favorável do leite (Berry *et al.*, 2014; HOLSTEIN ASSOCIATION USA, 2020). No Brasil, a raça Holandesa constitui a base genética predominante nos rebanhos especializados, em especial nas regiões Sul e Sudeste, sendo responsável por parte significativa da produção nacional (Rocha *et al.*, 2020; MAPA, 2021).

Nos Campos Gerais do Paraná, a raça Holandesa tem papel estratégico, pois aliado a práticas de nutrição avançadas e a sistemas de manejo intensivos, permite alcançar padrões de competitividade internacional, reforçando a liderança regional. No entanto, a elevada especialização produtiva dessa raça impõe desafios, como maior susceptibilidade ao estresse térmico em regiões de clima subtropical, incidência de distúrbios metabólicos e necessidade de manejo nutricional rigoroso para manutenção da eficiência reprodutiva e produtiva (Da Silva *et al.*, 2019; Machado *et al.*, 2021).

Além dos fatores genéticos e nutricionais, a saúde da glândula mamária é outro elemento decisivo. A mastite pode reduzir a produção em até 30% e alterar significativamente a composição do leite (Auldist *et al.*, 1998; Leitner *et al.*, 2004). A contagem de células somáticas (CCS) é amplamente utilizada como indicador de saúde do úbere, sendo determinante na avaliação industrial e comercial do leite (Barbano; Clark, 1989; Santos *et al.*, 2020).

Nos estudos moleculares, as células somáticas do leite emergem como modelo experimental não invasivo, capaz de refletir a atividade transcricional da glândula mamária sem a necessidade de biópsias (Boutinad; Jammes, 2002). Trabalhos recentes demonstraram a aplicabilidade das CCS na detecção de genes ligados à lipogênese (*Fatty Acid Synthase* - *FASN*, *Acetyl-CoA Carboxylase Alpha* – *ACACA- α* , *Lipoprotein Lipase* – *LPL*, e *Glycerol-3-Phosphate O-Acyltransferase, Mitochondrial* - *GPAM*) e estresse oxidativo (*Superoxide Dismutase 1* - *SOD1*, *Superoxide Dismutase 2* - *SOD2*, e *Superoxide Dismutase 3* - *SOD3*) (Nogaroto *et al.*, no prelo),

além da avaliação da resposta imune local (Canovas *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2023).

Nesse sentido, estratégias nutricionais voltadas à modulação lipídica do leite têm recebido atenção crescente (Santos *et al.*, 2023). A suplementação com óleos vegetais, ácidos graxos protegidos e lecitina apresenta potencial em modificar o perfil de ácidos graxos, aumentar compostos bioativos como ácido linoleico conjugado (CLA) e ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (ômega-3), além de contribuir para a redução de distúrbios metabólicos em vacas leiteiras (Liu *et al.*, 2018). Entretanto, permanecem limitadas as investigações sobre os efeitos da lecitina na regulação de genes lipogênicos em células somáticas do leite bovino, configurando uma lacuna científica que motiva novas abordagens experimentais.

Portanto, compreender os fatores que influenciam a produção e a composição do leite, especialmente no contexto da raça Holandesa e de regiões líderes como Castro e Carambeí, é essencial para o avanço de estratégias nutricionais e de manejo que visem não apenas a produtividade, mas também a qualidade e o valor agregado do leite.

1.1.1 Hipóteses

A composição lipídica do leite bovino influencia diretamente sua qualidade nutricional e tecnológica, sendo alvo de valorização industrial (Lindmark-Månsson *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2023). O metabolismo de gordura na glândula mamária é regulado por genes como *FASN*, *ACACA- α* , *LPL* e *GPAM*, cujos níveis de expressão podem ser modulados por fatores nutricionais (Medrano *et al.*, 2010; Wickramasinghe *et al.*, 2012). A suplementação lipídica, em especial com lecitina, apresenta potencial para alterar o metabolismo de ácidos graxos e melhorar a composição do leite (Liu *et al.*, 2018), embora seus efeitos moleculares ainda sejam pouco explorados. Nesse contexto, as células somáticas do leite se destacam como modelo experimental não invasivo e representativo da atividade transcricional da glândula mamária (Boutinad; Jammes, 2002; Canovas *et al.*, 2014). Assim, este estudo justifica-se pela necessidade de compreender os efeitos da lecitina na regulação de genes lipogênicos em vacas leiteiras, partindo da hipótese de que sua inclusão na dieta modula a expressão gênica associada à síntese de ácidos graxos,

promovendo alterações na composição do leite e contribuindo para estratégias nutricionais mais eficientes e sustentáveis na bovinocultura.

1.1.2 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão de genes relacionados ao metabolismo de gordura, a partir das células somáticas do leite, em vacas da raça Holandesa, submetidas a dietas com suplementação energética rica em lecitina.

Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de lecitina na dieta de vacas da raça Holandesa, em relação a parâmetros de qualidade do leite;
- Quantificar os níveis de mRNA, por meio da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR), de genes relacionados à biossíntese de ácidos graxos em bovinos da raça Holandesa, submetidos à suplementação com lecitina;
- Avaliar a influência da porcentagem do aditivo lecitina, implementado na dieta, em relação a expressão dos genes *FASN*, *GPAM*, *LPL* e *ACACA- α* .

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 Bovinos da Raça Holandesa

A raça Holandesa é reconhecida mundialmente como a principal raça leiteira, estando presente em mais de 160 países e sendo responsável por elevados níveis de produtividade individual, com médias superiores a 9.000–10.000 kg de leite por lactação em rebanhos controlados de países de clima temperado (Berry *et al.*, 2014; HOLSTEIN ASSOCIATION USA, 2020). Sua ampla difusão geográfica decorre da intensa seleção genética voltada para produção de leite e da infraestrutura consolidada de avaliação genética, como programas de teste de progênie e grandes bancos de dados internacionais, que permitem ganhos genéticos anuais consistentes para produção e composição do leite (VanRaden *et al.*, 2009; Norman *et al.*, 2010).

No cenário global, a raça Holandesa representa o alicerce da indústria láctea moderna, pois seu alto rendimento individual, frequentemente superior a 30 kg de

leite por vaca por dia em sistemas intensivos, garante viabilidade econômica e diluição de custos fixos por unidade de produto, fator essencial para a competitividade (Shook, 2006; Cole *et al.*, 2021). Além disso, a seleção contínua para características de interesse, como produção de gordura e proteína, fertilidade e longevidade, tem assegurado incrementos genéticos simultâneos em volume e qualidade do leite ao longo das últimas décadas (Pryce; Veerkamp, 2019).

No Brasil, a raça Holandesa é amplamente utilizada em rebanhos comerciais, principalmente em sistemas tecnificados de produção, nos quais vacas puras ou de alto grau de sangue podem atingir produções médias entre 7.000 e 9.000 kg de leite por lactação, com teores de gordura em torno de 3,5 a 4% (Santos *et al.*, 2020; EMBRAPA, 2022). Dados oficiais indicam que a região Sul concentra parcela expressiva da produção nacional, especialmente nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, onde as condições climáticas, estruturais e de manejo favorecem a expressão do elevado potencial produtivo da raça (IBGE, 2025; USDA, 2022). Estudos sobre a estrutura populacional de vacas Holandesas nesta região evidenciam forte contribuição genética de animais importados e ressaltam a importância do monitoramento da endogamia e da diversidade genética para manutenção do desempenho produtivo (Lopes *et al.*, 2019; Faria *et al.*, 2020).

A relevância econômica da Holandesa na região Sul está associada à elevada tecnificação dos sistemas, à alta densidade de vacas em lactação com produção individual elevada e à forte tradição leiteira, o que resulta em maiores produtividades por área e por animal quando comparadas a outras regiões do país. A proximidade com cooperativas e indústrias de laticínios fortalece as cadeias produtivas regionais, com impacto direto sobre a geração de renda e empregos (Rocha *et al.*, 2020; MAPA, 2021). Entretanto, desafios relacionados ao estresse térmico em ambientes tropicais e subtropicais podem comprometer a produção e a eficiência reprodutiva da raça, reforçando a importância de programas de melhoramento adaptados à realidade brasileira, bem como do uso de estratégias nutricionais e de manejo que permitam mitigar perdas produtivas (Da Silva *et al.*, 2019; Machado *et al.*, 2021).

1.2.2 Composição do Leite

O leite bovino é uma emulsão biológica complexa constituída predominantemente por água, proteínas, lipídios, carboidratos, minerais e vitaminas, cuja composição reflete a interação entre fatores genéticos, ambientais, fisiológicos

e nutricionais (Lindmark-Månsson *et al.*, 2006). Em termos médios, o leite apresenta aproximadamente 87% de água, 4,6% de lactose, 3,4% de proteínas, 4,2% de lipídios, 0,8% de minerais e pequenas quantidades de vitaminas, embora esses valores possam variar amplamente em função das condições de produção e do animal (Gómez-Cortés *et al.*, 2021).

Ao longo do ciclo lactacional, ocorrem variações naturais na composição do leite, especialmente nos teores de sólidos totais, gordura e proteína. Nas fases iniciais da lactação, são observadas concentrações mais elevadas desses componentes, seguidas por uma redução gradual à medida que a lactação avança, em resposta a adaptações fisiológicas associadas à mobilização de reservas corporais e à dinâmica hormonal da vaca em produção (Lindmark-Månsson *et al.*, 2006; Gómez-Cortés *et al.*, 2021). Essas alterações refletem ajustes metabólicos que visam atender às elevadas exigências energéticas impostas pelo início da lactação (McCarthy *et al.*, 2018; Couvreur *et al.*, 2021).

A paridade também exerce influência significativa sobre a composição e o volume do leite produzido. Vacas primíparas tendem a apresentar menores teores de gordura e proteína, bem como menor produção total, quando comparadas a vacas múltiparas, fenômeno atribuído a diferenças no desenvolvimento do tecido mamário, na capacidade de ingestão alimentar e na eficiência metabólica ao longo das lactações sucessivas (Zang *et al.*, 2020; Hsieh *et al.*, 2022).

Além dos fatores fisiológicos, o manejo de ordenha constitui um elemento determinante da composição do leite. Aspectos como o intervalo entre ordenhas, as técnicas de extração e as condições higiênico-sanitárias influenciam diretamente parâmetros composicionais, incluindo o teor de gordura e a contagem de células somáticas (CCS) (Auldist *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 2020). Sistemas de ordenha com rotinas padronizadas e adequado controle sanitário contribuem para maior estabilidade da composição do leite e para a redução de perdas associadas à mastite subclínica, condição frequentemente relacionada ao aumento da CCS (FAO, 2019; Santos *et al.*, 2020).

De modo geral, os fatores zootécnicos, fisiológicos e ambientais atuam de forma integrada, modulando a expressão fenotípica da composição do leite e interferindo não apenas na qualidade do produto, mas também em aspectos produtivos, reprodutivos e sanitários dos animais. Dessa forma, a análise da composição láctea deve ser interpretada considerando a interação entre essas

múltiplas variáveis, evitando avaliações isoladas dos componentes individuais (Souza *et al.*, 2023; Ziolkowska *et al.*, 2023).

1.2.2.1 Células somáticas do leite

As células somáticas presentes no leite bovino constituem uma população heterogênea formada principalmente por leucócitos oriundos do sistema imune e por células epiteliais descamadas da glândula mamária, as quais desempenham funções distintas relacionadas à defesa imunológica e à atividade secretora do tecido mamário (Bisutti *et al.*, 2023). A proporção relativa desses tipos celulares varia em função do estado fisiológico do animal, do estágio de lactação e, sobretudo, da saúde da glândula mamária, sendo a elevação da CCS amplamente reconhecida como um dos principais indicadores de mastite subclínica e clínica em bovinos leiteiros (Pławińska-Czarnak *et al.*, 2025).

Do ponto de vista funcional, os leucócitos presentes no leite, incluindo neutrófilos, macrófagos e linfócitos, atuam na resposta imune local contra microrganismos patogênicos, enquanto as células epiteliais refletem o estado metabólico e secretor da glândula mamária (Bisutti *et al.*, 2023). Alterações na composição celular do leite, bem como na expressão de genes associados à resposta inflamatória e ao metabolismo, têm sido associadas a modificações na qualidade do leite e à integridade de seus componentes nutricionais (Ćutuk *et al.*, 2026).

Além de sua relevância como indicador sanitário, as células somáticas do leite têm sido amplamente utilizadas como uma fonte biológica representativa e não invasiva para estudos de expressão gênica, uma vez que refletem de forma consistente a atividade transcricional da glândula mamária. Abordagens transcriptômicas recentes demonstram que análises realizadas a partir dessas células permitem investigar mecanismos moleculares relacionados à lactação, à resposta imune e à saúde mamária, reduzindo a necessidade de procedimentos invasivos, como biópsias de tecido mamário (Bisutti *et al.*, 2023; Pławińska-Czarnak *et al.*, 2025).

1.2.2.2 Proteínas do leite

As proteínas do leite, principalmente caseínas e proteínas do soro, desempenham um papel crucial na nutrição humana e nas propriedades

tecnológicas dos derivados lácteos. Swaisgood (1992) discutiu a química das caseínas, ressaltando sua estrutura e funcionalidade no contexto dos produtos lácteos. As caseínas representam cerca de 80% da fração proteica e são essenciais para a fabricação de queijos e iogurtes (Swaisgood, 1992; Knight *et al.*, 1998; Lindmark-Månsson *et al.*, 2006). Já as proteínas do soro, como a beta-lactoglobulina e a alfa-lactoalbumina, têm alto valor biológico e propriedades funcionais importantes (Knight *et al.*, 1998).

A composição e a relação entre essas proteínas também influenciam a digestibilidade e o potencial alergênico do leite, além de sua aplicabilidade tecnológica. Estudos mais recentes têm explorado a bioatividade de peptídeos derivados dessas proteínas, com potencial anti-hipertensivo e imunomodulador (Philippe *et al.*, 2020).

1.2.2.3 Lipídios

A gordura do leite é um componente essencial que contribui para o valor energético e as propriedades sensoriais dos produtos lácteos. Jensen (2002) revisou a composição dos lipídios do leite bovino e destacou a complexidade e a diversidade dos ácidos graxos presentes, enfatizando sua importância nutricional e funcional. Os lipídios são componentes essenciais do leite, correspondendo a cerca de 3-5% da sua composição total. Eles são formados principalmente por triglicerídeos (97–98%), fosfolipídios, colesterol e ácidos graxos livres (Coleman; Mashek, 2011).

A fração lipídica do leite é majoritariamente composta por ácidos graxos saturados, como o palmítico (C16:0), mirístico (C14:0) e butírico (C4:0), que representam cerca de 70% da gordura total. Os monoinsaturados, especialmente o oleico (C18:1), somam aproximadamente 24%, enquanto os poli-insaturados (PUFA), como os ácidos linoleico (omega-6) e linolênico (omega-3), estão presentes em menor proporção, mas são nutricionalmente relevantes (Gómez-Cortés *et al.*, 2021; Hsieh *et al.*, 2022). A presença de ácido linoleico conjugado (CLA) no leite, especialmente o isômero cis-9, trans-11, tem sido associada a potenciais efeitos anticarcinogênicos e antiaterogênicos (Benbrook *et al.*, 2018).

Outro elemento importante é a membrana do glóbulo de gordura, rica em fosfolipídios e glicoproteínas bioativas com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, relevante não só para a integridade do glóbulo lipídico, mas também para a saúde intestinal e cerebral dos consumidores (Snow *et al.*, 2020).

A qualidade e o teor de gordura do leite são influenciados por vários fatores, incluindo a genética do animal e a dieta (Liu *et al.*, 2018). A suplementação lipídica, especialmente com lecitina, tem sido investigada por seu potencial em modular a expressão gênica envolvida na biossíntese e secreção de gordura no leite.

1.2.2.3.1 Síntese de gordura do leite na glândula mamária

A síntese de gordura no leite bovino é um processo bioquímico complexo que envolve múltiplas vias metabólicas, as quais fornecem ácidos graxos (AG) à glândula mamária para a formação de triglicerídeos (TG) (Benoit *et al.*, 2024). Em ruminantes lactantes, os AG que compõem a fração lipídica do leite derivam de três fontes principais: (i) AG pré-formados provenientes da dieta; (ii) AG liberados pela mobilização das reservas corporais; e (iii) AG sintetizados *de novo* na própria glândula mamária a partir de precursores derivados da fermentação ruminal (acetato e β -hidroxibutirato) (Benoit *et al.*, 2024; Rico *et al.*, 2023).

Os AG pré-formados são aqueles de cadeia longa que circulam no plasma associados a lipoproteínas ricas em TG, como quilomícrons e lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), e que podem ser captados diretamente pelas células epiteliais da glândula mamária (Rico *et al.*, 2023). Esses AG alimentares influenciam a composição de AG de cadeia maior que 16 carbonos no leite, e sua contribuição é dependente da disponibilidade dietética e do estado metabólico do animal (Rico *et al.*, 2023).

A mobilização das reservas corporais de AG ocorre principalmente durante períodos de balanço energético negativo, como no início da lactação, quando os ácidos graxos não esterificados (NEFA) liberados do tecido adiposo aumentam sua concentração plasmática e passam a ser incorporados pela glândula mamária (Rico *et al.*, 2023).

Por sua vez, a síntese de AG *de novo* na glândula mamária é responsável pela produção de AG de cadeias curtas e médias (C4:0 a C14:0) e parte dos AG de 16 carbonos, a partir dos precursores acetato e β -hidroxibutirato (BHBA), que são produzidos em grandes quantidades durante a fermentação de carboidratos nos microrganismos do rúmen (Benoit *et al.*, 2024). Especificamente, o acetato é o principal substrato de carbono para a lipogênese *de novo*, contribuindo com elétrons e fragmentos de carbono que serão incorporados nas cadeias de AG (Benoit *et al.*, 2024).

Estudos transcriptômicos em células epiteliais mamárias bovinas têm demonstrado que tanto o acetato quanto o β -hidroxibutirato modulam a expressão de genes envolvidos no processo de lipogênese, incluindo genes relacionados à biossíntese lipídica e à formação de triglicerídeos, reforçando a importância desses precursores na síntese de AG *de novo* (Zhang et al., 2021). Além disso, a regulação da expressão gênica e a atividade enzimática nesta via estão associadas a elementos como o fator de transcrição SREBP1, que estimula a expressão de enzimas lipogênicas como a acetil-CoA carboxilase (ACC) e a ácido graxo sintase (FASN), essenciais para a produção de AG (Benoit *et al.*, 2024).

A integração das três vias metabolizadoras de AG na glândula mamária determina a proporção relativa de AG sintetizados *de novo* e pré-formados incorporados à gordura láctea, influenciando assim o perfil de AG do leite e, consequentemente, suas propriedades físico-químicas e nutricionais (Benoit *et al.*, 2024).

1.2.2.4 Ácidos graxos no leite bovino

A gordura do leite é composta por uma complexa variedade de AG, cuja proporção é influenciada por fatores como dieta, estágio da lactação, microbiota ruminal e genética do animal. De acordo com Stirling *et al.* (2023), mais de 400 diferentes AG podem ser detectados na fração lipídica do leite bovino, sendo os mais relevantes do ponto de vista nutricional e funcional classificados como saturados, monoinsaturados e poli-insaturados.

Os AG de cadeia curta e média, como o butírico (C4:0), capríco (C6:0), caprílico (C8:0) e láurico (C12:0), são sintetizados *de novo* na glândula mamária a partir de precursores ruminiais como o acetato e o β -hidroxibutirato, representando de 50% a 60% da gordura total do leite (Stirling *et al.*, 2023). Já os de cadeia longa, como o oleico (C18:1 cis-9), linoleico (C18:2 ω -6) e linolênico (C18:3 ω -3), têm origem predominantemente dietética ou do tecido adiposo, sendo incorporados diretamente à secreção láctea (Stirling *et al.*, 2023).

O ácido oleico, principal AG monoinsaturado do leite, corresponde a 20–30% da fração lipídica e está associado à melhoria do perfil sensorial e à redução de riscos cardiovasculares (Couvreur *et al.*, 2021). Os poli-insaturados (PUFA), das famílias ômega-3 e ômega-6, embora em menor proporção (2–5%), possuem grande

importância nutricional e podem ser modulados pela dieta, com destaque para fontes como óleo de peixe, soja e algas (Ziółkowska *et al.*, 2023).

Entre os compostos bioativos presentes na gordura do leite, destaca-se o ácido linoleico conjugado (CLA), especialmente o isômero *cis*-9, *trans*-11, cuja concentração pode atingir até 0,8% em sistemas a pasto e que tem sido associado a efeitos benéficos, como ação anti-inflamatória e anticarcinogênica (Gallardo; Teixeira, 2023). A formação desse composto em ruminantes está diretamente relacionada ao metabolismo ruminal de ácidos graxos insaturados, particularmente do ácido linoleico (C18:2 *cis*-9, *cis*-12), que sofre biohidrogenação parcial no rúmen, resultando na formação de intermediários como o próprio CLA e o ácido vacênico (C18:1 *trans*-11).

O ácido vacênico, por sua vez, pode representar até 4% da gordura do leite e atua como importante precursor do CLA, sendo convertido em *cis*-9, *trans*-11 CLA na glândula mamária pela ação da enzima Δ^9 -dessaturase (Gallardo; Teixeira, 2023). Dessa forma, a concentração de CLA no leite não depende apenas da sua síntese ruminal, mas também da conversão endógena a partir do ácido vacênico. A integração dessas vias metabólicas, envolvendo a biohidrogenação ruminal e a modificação enzimática na glândula mamária, esquematizada na figura 1.

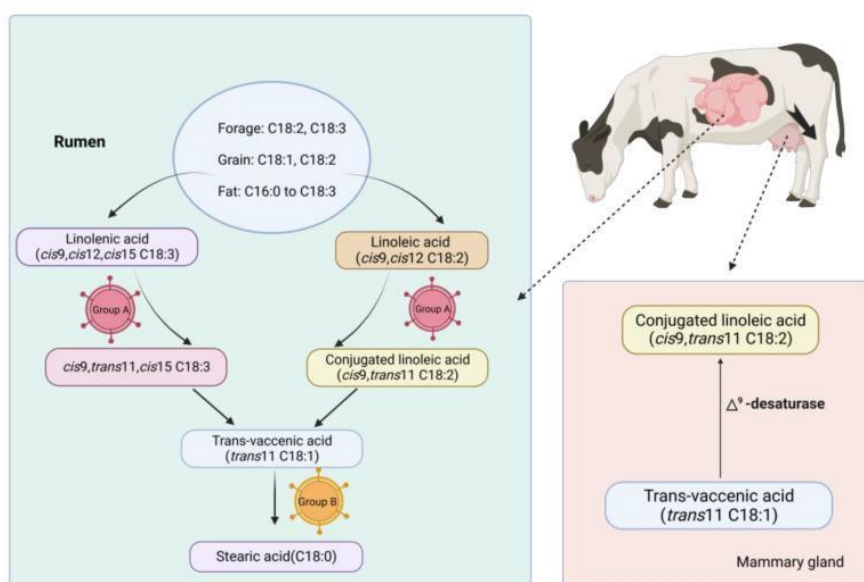


Figura 1 – Via de formação do ácido linoleico conjugado (CLA) em ruminantes. Esquema da biohidrogenação ruminal do ácido linoleico e da conversão do ácido vacênico em CLA na glândula mamária.

Fonte: Adaptado de WANG *et al.* (2023).

O leite também contém ácidos graxos de cadeia ímpar e ramificados (OBCFA, *odd- and branched-chain fatty acids*, e BCFA, *branched-chain fatty acids*), como iso-C15:0 e anteiso-C17:0, originados da fermentação microbiana ruminal. Esses compostos atuam como biomarcadores da dieta e apresentam potencial efeito anti-inflamatório e probiótico na saúde humana, sendo mais abundantes em dietas com alta proporção de forragem (Bainbridge *et al.*, 2021).

A dieta é um dos principais moduladores da composição lipídica do leite. Estratégias nutricionais específicas, como a inclusão de lipídios funcionais (óleos vegetais, lecitina, ácidos graxos poli-insaturados - PUFA), têm sido utilizadas para modificar o perfil de AG de forma positiva. Ziółkowska *et al.* (2023) demonstraram que a adição de óleo de peixe aumentou os teores de EPA e DHA no leite sem prejuízo à produção. Em contrapartida, dietas à base de silagem reduzem os teores de PUFA e compostos bioativos. Sistemas a pasto favorecem maior proporção de ácidos graxos insaturados e melhoram a relação ômega-6/ômega-3 (Gallardo; Teixeira, 2023).

Estudos específicos com lecitina de soja mostram sua capacidade de alterar a composição lipídica do leite. Liu *et al.* (2018) relataram aumento de AG de cadeia longa e alterações nas proteínas da membrana do glóbulo de gordura em vacas suplementadas com lecitina. Schroeder *et al.* (2019) também observaram maior eficiência na secreção de triglicerídeos, resultando em perfil lipídico mais saudável.

O óleo de soja tem sido amplamente estudado como aditivo funcional. Santos *et al.* (2004) identificaram aumento na concentração de ácido linoleico conjugado (CLA) no leite após suplementação. Esses efeitos são atribuídos à modulação da expressão de genes lipogênicos, como *FASN* e *ACACA*, e à maior disponibilidade de precursores para síntese de gordura (Ziółkowska *et al.*, 2023).

A adoção dessas intervenções nutricionais integra os princípios da nutrição de precisão, permitindo ajustes conforme o estágio da lactação e as exigências metabólicas do animal. Além de contribuir para a saúde do consumidor, a modulação dietética promove eficiência produtiva e sustentabilidade na cadeia leiteira (Bauman; Griinari, 2003; Lock; Bauman, 2004; Alves *et al.*, 2023).

1.2.3 Genes Relacionados ao Metabolismo Lipídico

O metabolismo lipídico na glândula mamária bovina é um processo altamente coordenado, responsável pela síntese, modificação, transporte e armazenamento

dos lipídios que compõem a gordura do leite, a qual é formada majoritariamente por triacilgliceróis (TAGs), correspondendo a aproximadamente 96–98% da fração lipídica total (Bauman; Griinari, 2003). Esses TAGs resultam da esterificação de ácidos graxos a uma molécula de glicerol no epitélio mamário, refletindo a integração entre processos metabólicos locais e o suprimento sistêmico de substratos energéticos (Bernard *et al.*, 2013).

Nos ruminantes, os AG presentes no leite têm duas origens principais: a síntese *de novo*, que ocorre nas células epiteliais da glândula mamária a partir de precursores como acetato e β -hidroxibutirato derivados da fermentação ruminal, e a captação de AG pré-formados provenientes da circulação sanguínea, especialmente AG de cadeia longa ($\geq$ C18) oriundos da dieta ou da mobilização de reservas corporais (Bauman; Griinari, 2003; Bernard *et al.*, 2013). A síntese *de novo* é responsável predominantemente pela produção de AG de cadeia curta e média (C4:0 a C14:0 e parte do C16:0), enquanto os AG de cadeia longa são incorporados quase exclusivamente a partir da circulação (Lor *et al.*, 2005).

Nesse contexto, a síntese de gordura do leite envolve a integração de diferentes vias metabólicas na célula epitelial mamária, incluindo a captação de AG circulantes mediada pela lipoproteína lipase (*LPL*) e a síntese intracelular de AG a partir de acetil-CoA e malonil-CoA, catalisada por enzimas-chave como a acetil-CoA carboxilase (*ACC*) e a ácido graxo sintase (*FASN*). Posteriormente, os AG são esterificados em triacilgliceróis (TAG) por meio da ação sequencial de enzimas como a glicerol-3-fosfato aciltransferase (*GPAT*), a 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferase (*AGPAT*) e a diacilglicerol aciltransferase (*DGAT*), culminando na formação de gotículas lipídicas citoplasmáticas e na secreção dos glóbulos de gordura do leite. A integração dessas vias metabólicas, desde a captação dos substratos até a formação e secreção dos TAGs, encontra-se esquematicamente representada na Figura 2.

O gene *FASN* codifica uma enzima multifuncional responsável pela elongação sequencial de unidades de malonil-CoA para a formação de ácidos graxos de cadeia longa, sendo essencial na lipogênese de novo na glândula mamária bovina (Medrano *et al.*, 2010). A expressão de *FASN* aumenta significativamente durante o pico de lactação, sendo regulada por estímulos hormonais, como a insulina, e pela disponibilidade de substratos energéticos, como o acetato (Loor *et al.*, 2005; Medrano *et al.*, 2010).

Entretanto, a resposta da expressão de *FASN* à suplementação lipídica deve ser interpretada à luz do metabolismo ruminal dos ácidos graxos. Em ruminantes, ácidos graxos poli-insaturados, como o ácido linoleico, sofrem extensiva biohidrogenação no rúmen, processo pelo qual são convertidos em ácidos graxos saturados e intermediários bioativos, como o ácido linoleico conjugado (CLA) e o ácido trans-vacênico (Harfoot, Hazlewood, 1997; Bauman; Griinari, 2003). Esses intermediários podem ser absorvidos e atuar na regulação da lipogênese mamária.

Estudos demonstram que determinados intermediários da biohidrogenação, especialmente isômeros do CLA, estão associados à redução da expressão de genes lipogênicos, incluindo *FASN*, em células epiteliais mamárias, caracterizando um mecanismo de regulação negativa da síntese de gordura do leite frente ao suprimento lipídico (Bauman, Griinari, 2003; Wickramasinghe *et al.*, 2012). Assim, os efeitos da suplementação com ácidos graxos poli-insaturados sobre a expressão gênica não decorrem apenas do fornecimento direto desses compostos, mas também dos produtos gerados durante sua transformação no ambiente ruminal.

A enzima *ACACA* catalisa a carboxilação do acetil-CoA para formar malonil-CoA, precursor imediato da síntese de AG. Sua atividade é regulada por mecanismos alostéricos e por fosforilação, sendo altamente sensível ao estado energético do animal e à ingestão dietética de lipídios (Bian, 2006). A repressão transcricional de *ACACA-α* tem sido associada à redução da síntese endógena de lipídios em vacas submetidas à suplementação com fontes ricas em ácidos graxos insaturados (Loor *et al.*, 2005).

O gene *GPAM* participa de uma etapa subsequente da lipogênese, catalisando a acilação inicial do glicerol-3-fosfato e iniciando a formação de TAGs. A expressão de *GPAM* aumenta de forma expressiva durante a lactação, com elevação de até 10 a 15 vezes em relação ao período seco, refletindo sua importância na síntese da gordura do leite (Shen *et al.*, 2021). Evidências indicam que sua expressão também

é modulada por fatores dietéticos, especialmente pela inclusão de fontes lipídicas específicas na dieta (Wickramasinghe *et al.*, 2012).

O gene *LPL* desempenha papel fundamental na hidrólise de TG presentes em lipoproteínas plasmáticas, liberando AG livres que são captados pela glândula mamária para posterior incorporação na gordura do leite (Leroux *et al.*, 2003). Durante a lactação, observa-se aumento da expressão de *LPL* no tecido mamário concomitantemente à sua supressão no tecido adiposo, evidenciando uma priorização metabólica em favor da produção láctea (Nomura *et al.*, 2020). A atividade da *LPL* é modulada pela composição da dieta, sendo influenciada por suplementações com óleo de soja ou gordura protegida, que podem aumentar ou reduzir sua atividade conforme a fonte lipídica utilizada e a fase da lactação (Lock; Bauman, 2004; Kadegowda *et al.*, 2009).

A análise integrada da regulação transcricional de *FASN*, *ACACA*, *GPAM* e *LPL* permite compreender como a glândula mamária responde molecularmente às estratégias de suplementação lipídica. Nesse contexto, a utilização da técnica de qRT-PCR em células somáticas do leite representa uma ferramenta eficiente para avaliar essas respostas, fornecendo subsídios para o desenvolvimento de estratégias nutricionais capazes de conciliar produtividade, qualidade da gordura do leite e sustentabilidade dos sistemas de produção (Wickramasinghe *et al.*, 2012; Cánovas *et al.*, 2014).

1.2.4 Suplementação Lipídica na Dieta de Bovinos Leiteiros

A manipulação nutricional da dieta de vacas leiteiras tem sido amplamente estudada como estratégia para modificar o perfil de ácidos graxos do leite, aumentar a densidade energética das rações e otimizar a saúde metabólica das vacas em lactação (Palmquist; Mattos, 2011; Loores *et al.*, 2005). A suplementação com lipídios, em especial óleos vegetais, sais de cálcio de ácidos graxos e gorduras protegidas da bio-hidrogenação ruminal, demonstrou efeitos relevantes na composição da gordura do leite, promovendo alterações nas proporções de ácidos graxos saturados e insaturados, além de contribuir para o aumento da eficiência produtiva (Shingfield *et al.*, 2013). Tais estratégias são também utilizadas para reduzir distúrbios metabólicos associados ao balanço energético negativo no início da lactação, como a cetose e a lipidose hepática, ao fornecer fontes adicionais de energia sem comprometer a fermentação ruminal (Chilliard *et al.*, 2000).

Entre os diferentes aditivos lipídicos investigados, a lecitina vem despertando interesse pela sua composição e propriedades funcionais. Extraída principalmente da soja, a lecitina é formada predominantemente por fosfolipídios como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilinositol, moléculas que apresentam elevada capacidade emulsificante e desempenham papel essencial na formação de micelas lipídicas durante a digestão (Klein, 2018; Watkins, 2019). Essa característica confere à lecitina a capacidade de favorecer a absorção intestinal de ácidos graxos de cadeia longa, modulando a biodisponibilidade de nutrientes e influenciando o metabolismo lipídico em nível sistêmico (Liu *et al.*, 2018).

Estudos em bovinos leiteiros têm indicado que a suplementação com lecitina pode alterar o perfil de ácidos graxos do leite, com incremento na proporção de compostos insaturados e bioativos, como o ácido linoleico conjugado (CLA), além de potenciais efeitos sobre a eficiência alimentar e parâmetros produtivos (Xu *et al.*, 2020; Rodrigues *et al.*, 2021). Há também relatos de efeitos metabólicos associados à lecitina, incluindo modulação da secreção hepática de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), regulação da atividade de enzimas lipogênicas e propriedades antioxidantes que podem reduzir o estresse oxidativo em vacas leiteiras (Benjamin *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2023).

Apesar dos resultados disponíveis, a literatura ainda apresenta limitações quanto ao conhecimento dos efeitos moleculares da lecitina sobre a glândula mamária, especialmente no que se refere à regulação da expressão gênica em células somáticas do leite. Estudos envolvendo suplementação lipídica de diferentes fontes já demonstraram alterações consistentes em genes como *FASN*, *ACACA- α* , *LPL* e *GPAM*, entre outros (Wickramasinghe *et al.*, 2012; Lv *et al.*, 2021). Contudo, trabalhos específicos sobre a contribuição da lecitina nesse contexto permanecem restritos, caracterizando uma área de investigação ainda em expansão.

REFERÊNCIAS

- ALVES, A. A.; WEISS, W. P.; YAO, Y.; XUE, B.; ZHAO, X.; YAO, J. Nutrition strategies for sustainable dairy production systems. *Animal*, v. 17, p. 100610, 2023.
- AULDIST, M. J.; WILLIAMSON, J. L.; NG-KWAI-HANG, K. F.; WALKER, N. J. Effects of somatic cell count and stage of lactation on raw milk composition and the yield and quality of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research*, v. 65, n. 3, p. 365-373, 1998.
- BAINBRIDGE, M. L.; CESAR, P. T. F.; WRIGHT, A. D. G.; FREEMAN, M. J.; KENIRY, M. A.; MATTHEWS, C.; COCKS, B. G.; GRAHAM, Y. F. Odd- and branched-chain fatty acids in milk fat from pasture-fed cows are associated with milk yield and stage of lactation. *Journal of Dairy Science*, v. 104, n. 4, p. 4171-4186, 2021.
- BARBANO, D. M.; CLARK, J. L. Milk quality: somatic cell counts. *Journal of Dairy Science*, v. 72, n. 2, p. 197-208, 1989.
- BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J. M. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annual Review of Nutrition*, v. 23, p. 203-227, 2003.
- BENJAMIN, S.; SPENER, F. Conjugated linoleic acids as functional food: an insight into their health benefits. *Nutrition & Metabolism*, v. 12, n. 36, 2015.
- BENOIT, A. C.; PELLERIN, C.; LEROUX, C.; BERNARD, L.; LAURENCE, M.; RIOUX, T.; LESSARD, F.; PETIT, H. V.; GAGNON, J.; GILLIS, D. J.; KENNY, D. A.; LERONDELLE, C.; LAURENCE, C. Mammary gland responses to altering the supply of de novo fatty acid substrates and preformed fatty acids on the yields of milk components and milk fatty acids. *Journal of Dairy Science*, v. 107, n. 12, p. 10653-10666, 2024.
- BERNARD, L.; LEROUX, C.; BONNET, M.; CHILLIARD, Y. Nutritional regulation of mammary lipogenesis and milk fat in ruminants. *Animal*, v. 7, suppl. 1, p. s112-s122, 2013.
- BERRY, D. P.; WALL, E.; PRYCE, J. E. Genetics and genomics of reproductive performance in dairy and beef cattle. *Animal*, v. 8, n. 1, p. 105-119, 2014.
- BISUTTI, V.; CHELI, F.; BRAGHIERI, A.; SCANDOLIRA, M.; ESPOSITO, G.; MIRON, J.; GRILLI, E.; PINOTTI, L. Milk somatic cells as a non-invasive source for transcriptomic analysis of the bovine mammary gland. *Frontiers in Genetics*, v. 14, art. 1198456, 2023.
- BOUTINAUD, M.; JAMMES, H. Potential uses of milk epithelial cells: a review. *Reproduction Nutrition Development*, v. 42, n. 2, p. 133-147, 2002.
- CANOVAS, A.; GARRICK, D. J.; HERNANDEZ, A. G.; GARZON, L. C.; HERNANDEZ, N.; TERRAZAS-MUNOZ, E.; RINCON, G.; MEDRANO, J. F. RNA-Seq reveals novel transcriptome of lactation and non-lactation periods in liver and mammary gland of taurine Holstein cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 97, n. 10, p. 6039-6050, 2014.
- CEPEA – Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. *Relatório do setor lácteo brasileiro*. Piracicaba: ESALQ/USP, 2024.
- CHILLIARD, Y.; FERRIÈRE, F.; CABIDDU, A.; REYES-HERRERA, I.; DOREAU, M. Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of fatty acids. *Annales de Zootechnie*, v. 49, n. 3, p. 181-205, 2000.

- COLE, J. B.; MEDRANO, J. F.; LIU, G. E.; VAN TASSELL, C. P.; SONSTEGARD, T. S. The future of dairy cattle breeding. *Journal of Dairy Science*, v. 104, n. 2, p. 1122-1137, 2021.
- COUVREUR, S.; HURTAUD, C.; LOPEZ, C. Modulation of milk fat composition by feeding practices. *Animal*, v. 15, n. 3, art. 100142, 2021.
- ĆUTUK, A.; KARAMATIĆ, K.; BEJDIĆ, P.; HADŽIABDULKADIR, A.; ŠATOVIĆ, E.; DŽEPIROVIC, I.; HASANBEGOVIĆ, A.; BRKANIĆ, E. Seasonal variations in the somatic cell count in cow's milk: a key indicator of mammary gland health. *Croatian Veterinary Journal*, v. 57, n. 2, p. 87-95, 2024.
- DA SILVA, R. G.; VERCELLINO, R. A.; GUIMARÃES, J. D. C.; PEREIRA, M. M.; SILVA, A. C.; MENEZES, R. O.; FERREIRA, R. N. Heat stress effects on milk production and quality. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 48, e20180292, 2019.
- EMBRAPA. *Sistema de produção de leite com vacas da raça Holandesa em regiões subtropicais do Brasil*. Brasília: Embrapa Gado de Leite, 2022.
- FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. *Good dairy farming practices*. Rome: FAO, 2019.
- FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. *FAO statistical yearbook 2024*. Rome: FAO, 2024.
- FARIA, F. J. C.; PEREIRA, R. R.; FREITAS, A. R.; VALENTE, B. D.; FERREIRA, A.; ALENCAR, M. M.; ALVES, J. C. M.; SILVA, F. F. Genetic diversity and inbreeding in Holstein cattle from southern Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, v. 52, p. 1457-1466, 2020.
- FOX, P. F.; UNIACKE-LOWE, T.; MCSWEENEY, P. L. H.; O'MAHONY, J. A. *Dairy chemistry and biochemistry*. 2. ed. Cham: Springer, 2015.
- GALLARDO, M. R.; TEIXEIRA, A. A. Fatty acid profile of milk from pasture-based systems. *Animal Feed Science and Technology*, v. 295, art. 115497, 2023.
- GÓMEZ-CORTÉS, P.; DE LA FUENTE, M. A.; HERNÁNDEZ, M. P. Milk fatty acids as biomarkers of nutritional physiology. *Animals*, v. 11, n. 11, art. 3187, 2021.
- HARFOOT, C. G.; HAZLEWOOD, G. P. Lipid metabolism in the rumen. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. (ed.). *The rumen microbial ecosystem*. 2. ed. London: Blackie Academic & Professional, p. 382–426, 1997.
- HOLSTEIN ASSOCIATION USA. *Holstein breed overview and performance statistics*. Brattleboro: Holstein Association USA, 2020.
- HSIEH, C. W.; CHEN, H. Y.; CHANG, C. J. Influence of parity and stage of lactation on milk yield and composition. *Animals*, v. 12, n. 4, art. 475, 2022.
- IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Pesquisa da Pecuária Municipal 2025*. Rio de Janeiro: IBGE, 2025.
- JENSEN, R. G. Invited review: the composition of bovine milk lipids. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 85, n. 2, p. 295–350, 2002.
- LINDMARK-MÅNSSON, H.; TIMAR, U.; PETTERSSON, H. E. et al. Composition of Swedish dairy milk. *International Dairy Journal*, v. 13, n. 6, p. 409-425, 2003.
- LIU, J.; WANG, J.; ZHU, W.; PU, Y. Y.; GUAN, L. L.; JIANG, C.; WANG, H.; SHEN, W. Effects of dietary lecithin on lipid metabolism in dairy cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 102, n. 2, p. e234-e241, 2018.

- LOPES, F. B.; MAGALHÃES, A. F. B.; FERREIRA, F. M.; MOTA, L. F. M.; PEREIRA, C. S.; MARQUES, L. F. G. Population structure and inbreeding trends in Brazilian Holstein cattle. *Journal of Applied Genetics*, v. 60, n. 3, p. 243-252, 2019.
- MACHADO, F. S.; SILVA, T. M.; TAVARES, L. S.; AMARAL, M. N.; MELO JÚNIOR, O. O.; FERRARI, R. G.; PEREIRA, M. N. Strategies to mitigate heat stress in dairy cattle. *Animal*, v. 15, n. 1, art. 100175, 2021.
- MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. *Anuário estatístico da agropecuária brasileira*. Brasília: MAPA, 2021.
- NORMAN, H. D.; VANRADEN, P. M.; MILLER, P. D.; HUANG, C. International genetic evaluation of dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 93, n. 12, p. 5495-5504, 2010.
- PALMQUIST, D. L.; JENKINS, T. C. Fat in lactation rations: review. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 63, n. 1, p. 1–14, 1980.
- PLAWIŃSKA-CZARNAK, J. Somatic cell count as an indicator of mammary gland health and milk quality in dairy cows. *Animals*, v. 15, n. 2, p. 245, 2025.
- PRYCE, J. E.; VEERKAMP, R. F. The incorporation of fertility traits in dairy cattle breeding programs. *Animal Frontiers*, v. 9, n. 2, p. 17-23, 2019.
- RICO, D. E.; HARMON, D. L.; MA, L.; HARPER, M.; PRESCOTT, S. L.; PRENTICE, R.; ASPROUDI, E.; MCKEE, R. F.; STOUT, M. A. The contribution of adipose stores to milk fat: implications on optimal nutritional strategies to increase milk fat synthesis in dairy cows. *Animal*, v. 17, art. 100735, 2023.
- ROCHA, D. T.; FEIJÓ, R. B.; BOTTURA, C.; BORTOLUZZI, A.; SANTOS, G. T.; SILVA, W. J. Competitiveness of dairy production systems in southern Brazil. *Revista de Economia e Sociologia Rural*, v. 58, n. 3, e20200102, 2020.
- SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L.; ZANELA, M. B. *Qualidade do leite: do campo à indústria*. São Paulo: Manole, 2020.
- SANTOS, S. F.; SANTOS, R. L.; ALMEIDA, I. L.; SANTOS, A. B.; OLIVEIRA, R. L. Inclusão de gordura na alimentação de caprinos e seu efeito sobre o perfil lipídico no leite: revisão. *Pubvet*, v. 10, n. 4, p. 343-351, 2016.
- SHINGFIELD, K. J.; TOIVONEN, V.; KALLIOMA, H.; WALLER, J. C.; HUHTANEN, P.; YARROW, N.; BEVERIDGE, S.; GRUMMER, R. R. Role of trans fatty acids in mammary lipogenesis. *Animal*, v. 7, suppl. 1, p. s37-s51, 2013.
- SNOW, D. R.; SPENCER, J. P. E.; MACIERZANK, A.; MACDONALD, I. A. Milk fat globule membrane: bioactive components and health implications. *Nutrients*, v. 12, n. 6, art. 1717, 2020.
- SWAISGOOD, H. E. Chemistry of the caseins. In: FOX, P. F. (ed.). *Advanced dairy chemistry*. 2. ed. London: Chapman & Hall, 1992. p. 63-110.
- USDA – UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. *Dairy: world markets and trade*. Washington, DC: USDA, 2022.
- VANRADEN, P. M.; VAN DOORMAL, H. J.; FRÉDÉRIC, Q.; DEKKERS, J. C. M.; EASTMAN, T. J.; WEIGEL, K. A. Genomic evaluations and accuracy of predicted transmitting abilities. *Journal of Dairy Science*, v. 92, n. 1, p. 16-24, 2009.
- WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. *Dairy science and technology*. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2006.

- WANG, Kun; XIN, Zimeng; CHEN, Zhi; LI, Huanan; WANG, Diming; YUAN, Yuan. Progress of conjugated linoleic acid on milk fat metabolism in ruminants and humans. *Animals*, v. 13, n. 21, p. 3429, 2023.
- WICKRAMASINGHE, S.; VASTA, V.; SARKAR, M.; et al. Transcriptome profiling of bovine mammary epithelial cells reveals that conjugated linoleic acid induces apoptosis and lipid metabolism changes. *BMC Genomics*, London, v. 13, p. 146, 2012.
- XU, T.; ZHANG, Y.; JIANG, C.; YU, S.; SHENG, Q.; HUANG, Y.; ZHU, W. Effects of dietary soy lecithin on milk fatty acid composition. *Animal Feed Science and Technology*, v. 270, art. 114706, 2020.
- ZHANG, Y.; LIU, J.; ZHAO, X.; WANG, J.; PANG, X.; LI, Z. Nutrigenomic role of acetate and β -hydroxybutyrate in bovine mammary epithelial cells. *Journal of Dairy Science*, v. 104, n. 2, p. 2003-2016, 2021.
- ZHANG, Y.; WU, H.; LIU, Y.; YE, D.; LIU, G.; JIN, T.; ZHU, X.; WANG, L. Effects of lipid supplementation on oxidative stress in dairy cows. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 10, art. 113567, 2023.
- ZIÓŁKOWSKA, A.; WÓJTOWSKI, J.; BRONIATOWSKA, E.; SALAMON, S.; SZCZEPKOWSKA, A.; GROCHOWSKA, E.; GRZESIAK, W. Multifactorial determinants of milk composition in dairy cows: interactions among nutrition, physiology and management. *Animals*, v. 13, n. 4, art. 612, 2023.

CAPÍTULO 2 – A LECITINA DE SOJA COMO MODULADORA DA EXPRESSÃO DE *FASN* E *GPAM* EM VACAS LEITEIRAS HOLANDEASAS

RESUMO

A fração lipídica do leite desempenha papel crucial na determinação do valor nutricional, sabor, textura e estabilidade dos produtos lácteos. Em vacas leiteiras, a glândula mamária sintetiza ácidos graxos *de novo* por meio de múltiplas vias metabólicas, dependendo de uma regulação gênica coordenada e específica. Suplementos dietéticos, como a lecitina, podem influenciar a síntese e o transporte de ácidos graxos na glândula mamária, alterando, assim, a composição lipídica do leite. O experimento foi conduzido em delineamento de quadrado latino duplo 4×4, utilizando-se oito vacas Holandesas em lactação, submetidas a dietas suplementadas com 0%, 0,75%, 1,5% e 2,2% de lecitina de soja com base na matéria seca, sendo os dados analisados por meio de regressão, considerando efeitos linear, quadrático e cúbico dos níveis de suplementação. Neste estudo, quantificou-se a expressão de quatro genes lipogênicos: Acetil-CoA carboxilase (*ACACA-α*), Ácido graxo sintase (*FASN*), Lipoproteína lipase (*LPL*) e Glicerol-3-fosfato aciltransferase (*GPAM*). O RNA total foi extraído de células somáticas do leite de vacas Holandesas, e a expressão gênica foi determinada por qRT-PCR. Além disso, foram analisados os teores de gordura e proteína do leite, juntamente com o estágio de lactação, entre os tratamentos. Vacas suplementadas com 2,2% de lecitina de soja apresentaram regulação positiva significativa de *GPAM* e *FASN*, genes que codificam enzimas-chave envolvidas nos processos lipogênicos, enquanto a expressão de *ACACA-α* e *LPL* não foi afetada. Embora a maioria dos genes lipogênicos esteja sob os mesmos sinais regulatórios, eles apresentaram um perfil de expressão diferencial dos genes envolvidos na síntese de triacilgliceróis. A síntese de gordura do leite é um mecanismo regulatório altamente complexo; portanto, a quantificação dos níveis de mRNA de vários genes é essencial para se obter conclusões robustas sobre a composição físico-química do leite.

Palavras-chave: Células somáticas do leite; suplementação lipídica; expressão de genes lipogênicos; qRT-PCR

ABSTRACT

The lipid fraction of milk plays a crucial role in determining the nutritional value, flavor, texture, and stability of dairy products. In dairy cows, the mammary gland synthesizes fatty acids *de novo* through multiple metabolic pathways, depending on coordinated and specific gene regulation. Dietary supplements, such as lecithin, may influence the synthesis and transport of fatty acids in the mammary gland, thereby altering the lipid composition of milk. The experiment was conducted using a 4×4 double Latin square design, with eight lactating Holstein cows subjected to diets supplemented with 0%, 0.75%, 1.5%, and 2.2% soybean lecithin on a dry matter basis, and the data were analyzed using regression, considering linear, quadratic, and cubic effects of supplementation levels. In this study, the expression of four lipogenic genes was quantified: *Acetyl-CoA carboxylase* (*ACACA-α*), *Fatty acid synthase* (*FASN*), *Lipoprotein lipase* (*LPL*), and *Glycerol-3-phosphate acyltransferase* (*GPAM*). Total RNA was extracted from milk somatic cells of Holstein cows, and gene expression was determined by qRT-PCR. Additionally, milk fat and protein contents were analyzed, along with the stage of lactation, among treatments. Cows supplemented with 2.2% soybean lecithin showed significant upregulation of *GPAM* and *FASN*, genes that encode key enzymes involved in lipogenic processes, while the expression of *ACACA-α* and *LPL* was not affected. Although most lipogenic genes are under the same regulatory signals, they exhibited a differential expression profile among genes involved in triacylglycerol synthesis. Milk fat synthesis is a highly complex regulatory mechanism; therefore, quantifying mRNA levels of multiple genes is essential to obtain robust conclusions about the physicochemical composition of milk.

Keywords: Dietary lipid supplementation; lipogenic genes; milk somatic cells; qRT-PCR

2.1 INTRODUÇÃO

A qualidade do leite é determinada por uma complexa interação de fatores genéticos, nutricionais, fisiológicos e ambientais. Nos sistemas modernos de produção leiteira, o valor do leite vai além do volume produzido e envolve a composição físico-química e suas propriedades tecnológicas, influenciando diretamente a eficiência do processamento industrial e a aceitação pelo consumidor (Lindmark-Månsson *et al.*, 2003; Gómez-Cortés *et al.*, 2021). Nesse contexto, a fração lipídica do leite é particularmente importante, pois afeta o valor nutricional, o sabor, a textura e a estabilidade dos produtos lácteos (Lindmark-Månsson *et al.*, 2003).

Em ruminantes, aproximadamente 99% da gordura do leite está presente na forma de gotículas lipídicas, sendo que os TAGs correspondem a cerca de 98% dessas gotículas, enquanto os 2% restantes consistem em monoglicerídeos, diacilgliceróis, colesterol e ácidos graxos livres (Lucena *et al.*, 2003). A síntese de gordura na glândula mamária pode ocorrer por três vias: (i) por meio de ácidos graxos (AG) provenientes da dieta, conhecidos como ácidos graxos pré-formados, caracterizados como a principal via para a síntese desse componente; (ii) pela mobilização das reservas corporais do animal; e (iii) a partir de AG sintetizados na glândula mamária a partir do β -hidroxibutirato e do acetato, produzidos durante a fermentação ruminal. Essa via é denominada síntese *de novo* de ácidos graxos (Urrutia *et al.*, 2019).

A síntese e a secreção de lipídios na glândula mamária são controladas por múltiplas vias metabólicas e pela expressão gênica coordenada e específica. A acetil-CoA carboxilase (ACACA- α) é uma enzima regulatória chave da lipogênese *de novo*, pois catalisa a carboxilação do acetil-CoA para formar malonil-CoA, um passo comprometido da via biossintética de ácidos graxos, fornecendo o principal substrato para a enzima ácido graxo sintase. Além disso, a enzima ácido graxo sintase (FASN) está envolvida na síntese de AGs de cadeia curta e média, um processo que ocorre exclusivamente na glândula mamária de vacas em lactação (Christie, 1981).

A lipoproteína lipase (LPL), produzida e secretada pelas células epiteliais mamárias, é essencial para a hidrólise e a captação de TAGs circulantes. A glicerol-3-fosfato aciltransferase (GPAM) desempenha um papel crucial na formação de TAG, catalisando a ligação do acil-CoA de ácidos graxos ao glicerol-3-fosfato,

iniciando a via biossintética. A expressão e a atividade desses genes são moduladas por fatores hormonais e metabólicos e, de forma importante, pela dieta (Bionaz e Loor, 2008).

A suplementação lipídica na dieta de ruminantes pode aumentar a densidade energética da dieta, afetando positivamente o desempenho reprodutivo e a composição de ácidos graxos da carne e do leite (Shingfield *et al.*, 2013; Scollan *et al.*, 2014). A inclusão de componentes dietéticos nas dietas de vacas leiteiras, como óleos vegetais, ácidos graxos protegidos e aditivos (por exemplo, lecitina de soja), tem como objetivo modificar o perfil de ácidos graxos, aumentar a proporção de compostos bioativos, como o ácido linoleico conjugado (CLA), associado a efeitos benéficos à saúde humana, incluindo propriedades anticarcinogênicas, antiaterogênicas e moduladoras do metabolismo lipídico (Badinga *et al.*, 2006; Koba e Yanagita, 2014), e os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (ômega-3), além de reduzir a ocorrência de distúrbios metabólicos associados à alta produção de leite em vacas especializadas (Liu *et al.*, 2018). A lecitina, em particular, destaca-se por seu elevado teor de fosfolipídios e por suas propriedades emulsificantes, que melhoram a digestão e o metabolismo lipídico (Klein, 2018; Watkins, 2019). Nesse sentido, tem sido sugerido que sua suplementação pode modular a síntese e o transporte de ácidos graxos na glândula mamária, influenciando diretamente a composição lipídica do leite (Liu *et al.*, 2018).

A soja é a principal oleaginosa utilizada como fonte de lecitina, devido à sua ampla disponibilidade e reconhecida capacidade emulsificante. A lecitina de soja é composta predominantemente por fosfolipídios, como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilinositol, além de pequenas quantidades de glicolipídios, triglicerídeos e carboidratos. Estudos anteriores têm relatado os efeitos da suplementação com lecitina de soja sobre o desempenho de bovinos de corte, características de carcaça, qualidade da carne e microbiota ruminal (Jenkins, 1990; Li *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2020).

A saúde da glândula mamária também exerce impacto decisivo sobre a composição do leite. Além de seu papel diagnóstico como indicador essencial da saúde do úbere, as células somáticas do leite têm ganhado destaque como modelo experimental em estudos moleculares (Medrano *et al.*, 2010; Cánovas *et al.*, 2014; Nogaroto *et al.*, no prelo). Por se originarem da descamação de células epiteliais secretoras e incluírem células do sistema imune, as células somáticas do leite

refletem a atividade transcricional da glândula mamária, permitindo a realização de análises de expressão gênica de forma prática e não invasiva, em comparação com biópsias de tecido mamário (Medrano *et al.*, 2010; Wickramasinghe *et al.*, 2012; Cánovas *et al.*, 2014). Essa abordagem tem sido utilizada para investigar genes envolvidos em vias lipogênicas e antioxidantes (Nogaroto *et al.*, no prelo), bem como em respostas inflamatórias e imunes (Fonseca *et al.*, 2011), mostrando-se uma ferramenta de alto valor para estudos de biologia funcional em bovinos leiteiros (Cánovas *et al.*, 2014).

Apesar desses avanços, poucos estudos avaliaram os efeitos da suplementação com lecitina de soja sobre a produção e composição do leite, bem como sua relação com a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico em vacas da raça Holandesa. A nutrição é reconhecida como um dos principais fatores ambientais que influenciam a produção de gordura do leite e representa uma estratégia importante para modificar tanto a produção quanto a composição de ácidos graxos do leite (Bauman *et al.*, 2006). Nesse contexto, a suplementação das dietas de vacas leiteiras com lecitina de soja pode auxiliar na redução do balanço energético negativo, comumente observado em vacas de alta produção.

A síntese de gordura do leite em ruminantes é regulada por uma complexa rede de fatores de transcrição e proteínas de sinalização (Mu *et al.*, 2021). A identificação desses fatores é essencial, uma vez que intervenções direcionadas que integrem dieta e manejo alimentar podem ser mais eficazes na melhoria da qualidade do leite (Mu *et al.*, 2021). Diante da escassez de estudos que integrem estratégias nutricionais com análises moleculares, este estudo teve como objetivo quantificar a expressão dos genes lipogênicos *FASN*, *ACACA-α*, *LPL* e *GPAM* em células somáticas do leite em resposta à suplementação dietética com diferentes níveis de lecitina de soja na dieta de vacas da raça Holandesa.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Delineamento Experimental e Coleta de Amostras

O experimento foi conduzido entre agosto e dezembro de 2023 na Fazenda Experimental Capão da Onça (FESCON) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), localizada em Ponta Grossa, Paraná, Brasil (25°05'43" S, 50°03'26" W; altitude aproximada de 880 m). O clima da região é classificado como subtropical

úmido. Durante o período experimental, que abrangeu o final do inverno e a primavera de 2023, as temperaturas na região central do Paraná variaram aproximadamente entre 8,1 e 28,1 °C, enquanto a precipitação mensal variou de 31 a 226 mm, conforme dados do Sistema de Tecnologia e Monitoramento Ambiental do Paraná (SIMEPAR, 2023), referentes à região na qual se insere o município de Ponta Grossa. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UEPG (SEI 23.000017438-0).

Foram utilizadas oito vacas da raça Holandesa, multíparas, com média de $95 \pm 39,22$ dias em lactação (DEL) e produção aproximada de $28,7 \pm 6,6$ kg de leite/animal/dia. Os animais foram mantidos em um estábulo de alvenaria semifechado, com piso emborrachado coberto por serragem. As vacas receberam a alimentação em canzins, com comedouros de madeira adaptados à instalação. A instalação dispunha de dois bebedouros com capacidade de 250 L cada.

As vacas foram alimentadas duas vezes ao dia: imediatamente após a ordenha da manhã, às 7h30, e antes da ordenha da tarde, às 15h00. O alimento era disponibilizado em cochos individuais e o consumo foi monitorado diariamente, sendo consideradas eventuais sobras para ajuste da oferta alimentar. Após a ordenha da tarde, os animais eram conduzidos a piquetes com pastagem de Tifton-85 (*Cynodon sp.*), sem sombreamento e com acesso a bebedouro, onde permaneciam durante a noite até a manhã seguinte. Para reduzir e/ou evitar o consumo de forragem, os piquetes foram roçados para diminuir a altura do pasto um dia antes do início do experimento e ao longo de todo o período experimental. Apesar disso, não se pode descartar completamente a ingestão de forragem pelos animais durante o período noturno.

O delineamento experimental adotado foi o de quadrado latino duplo 4×4, composto por quatro tratamentos e quatro períodos experimentais. Cada período teve duração de 25 dias, sendo 20 dias de adaptação às dietas experimentais e ao manejo alimentar e 5 dias destinados à coleta de dados e amostras biológicas, totalizando 100 dias de avaliação. Os tratamentos consistiram na suplementação com lecitina de soja nos níveis de inclusão de 0% (dieta sem lecitina), 0,75%, 1,5% e 2,2%, com base na matéria seca (MS) (Tabela 1). As dietas foram formuladas para atender às exigências nutricionais de vacas em lactação, sendo isoproteicas e isoenergéticas (NASEM, 2021). A dieta basal foi composta por silagem de milho como volumoso, além de milho moído, farelo de soja, farelo de trigo, concentrado

comercial PEC 20 (contendo núcleo mineral e vitamínico) e lecitina de soja, incluída de acordo com cada tratamento (Tabela 1).

Tabela 1 – Composição química e percentual dos ingredientes das dietas experimentais contendo diferentes concentrações de lecitina de soja: 0%, 0,75%, 1,5% e 2,2%.

Lecitina de soja				
Ingredientes	0%	0,75%	1,5%	2,2%
Silagem de milho	51.22	51.25	51.24	51.29
Grão de milho	7.42	7.42	7.42	7.43
Farelo de soja	7.50	7.50	7.51	7.51
Farelo de trigo	3.70	2.89	2.15	1.29
Concentrado PEC 20	30.13	30.15	30.15	30.17
Lecitina de soja	0	0.75	1.50	2.20
MS(%)	46.55	46.54	46.54	46.53
PB (%)	17.93	17.87	17.81	17.75
FDN (%)	35.12	35.05	35.02	34.96
FDA (%)	17.23	17.48	17.72	17.98
EE (%)	3.81	3.89	3.98	4.07

MS = matéria seca; PB = proteína bruta; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; EE = extrato etéreo.

Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

As amostras de leite foram coletadas uma vez em cada período experimental, durante as ordenhas da manhã e da tarde, utilizando copos coletores, e armazenadas em frascos identificados por animal e período. A análise dos teores de proteína e gordura do leite foi realizada por espectrofotometria no infravermelho (B 2300 Combi, Bentley Instruments) (AOAC, 2016), no Laboratório de Análise de Leite da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCPRH). Além disso, a composição do leite foi avaliada em função das classes de dias em lactação (DEL): 0–60 dias (início da lactação – pós-parto), 61–120 dias (pico de lactação), 121–200 dias (meia-lactação) e >200 dias (final da lactação).

Para a coleta de células somáticas, 500 mL de leite de cada animal foram coletados manualmente em frascos estéreis durante a ordenha da manhã, no 21º dia

de cada período experimental. As amostras biológicas foram mantidas sob refrigeração até o processamento.

2.2.2 Desenho dos *Primers*

Os *primers* para os genes-alvo *FASN*, *ACACA- α* , *LPL* e *GPAM*, bem como para o gene de referência β -actina (*ACTB*), foram desenhados com base em sequências do transcriptoma de *Bos taurus* disponíveis no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), por meio da ferramenta *Primer-BLAST* disponibilizada pela plataforma NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) (Tabela 2). A eficiência dos *primers* foi determinada de acordo com Bustin et al. (2009), por meio da construção de curvas-padrão a partir de diluições seriadas de uma solução estoque de cDNA molde (Tabela 2). Apenas conjuntos de *primers* com eficiência entre 90% e 110% foram utilizados nos ensaios de qRT-PCR (Lobo; Lobo, 2014).

Tabela 2 – Sequências dos *primers forward* (F) e *reverse* (R) (orientação 5' → 3'), tamanhos dos *amplicons* (em pares de bases, pb) e valores de eficiência dos primers (Eff, em %) utilizados para a amplificação dos genes *FASN*, *ACACA- α* , *LPL*, *GPAM* e *ACTB*.

Gene	Accession number	Primer F	Primer R	Amplicon	Eff	Reference
<i>FASN</i>	NM_001012669.1	AAGGCGTGCGT	ATACAGTTGGCCG	81	95.18	Nogaroto et al., no prelo
		GACACTT	TCACCAG			
<i>ACACA-α</i>	NM_174224.2	CCTGCACTGGC	CATCCACCGAGGG	127	104.11	O Autor
		TGTCTTACA	TCATACG			
<i>LPL</i>	NM_001075120.1	TCACTTCAACCA	GATGACGTTGGAG	127	109.95	O Autor
		CAGCAGCA	TCCGGTT			
<i>GPAM</i>	NM_001012282.1	CCGTTTCACCG	GCGGCAAATTCGT	132	101.66	Nogaroto et al., no prelo
		GCAATGATC	CTCAGTC			
<i>ACTB</i>	NM_007393.5	GGCTGTATTCCC	CCAGTTGGTAACA	153	107.01	Nogaroto et al., no prelo
		CTCCATCG	ATGCCATGT			

Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

2.2.3 Extração de RNA Total e Ensaio de qRT-PCR

As células somáticas do leite foram isoladas de acordo com o protocolo descrito por Nogaroto *et al.* (no prelo). As células somáticas foram sedimentadas por centrifugação a $2700 \times g$, a 4°C , por 15 min. A camada de gordura do sobrenadante foi removida, e o precipitado celular foi lavado três vezes com 5 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) / 0,5 M de EDTA, a $2700 \times g$, a 4°C , por 10 min. Por fim, 250 μL de PBS foram adicionados ao tubo, e o precipitado foi obtido por centrifugação a $6000 \times g$, a 4°C , por 15 min.

A extração de RNA total das células somáticas do leite foi realizada utilizando-se o reagente *TRIzol*[®] (Invitrogen, Waltham, MA, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A quantidade e a pureza do RNA foram avaliadas utilizando-se um espectrofotômetro *NanoDrop Ultra* (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EUA), e apenas amostras de RNA com razão A_{260}/A_{280} entre 1,8 e 2,0 foram utilizadas. Aproximadamente 2 μg de RNA total foram empregados para a síntese de cDNA, utilizando-se o kit *GoScript*[™] *Reverse Transcription System* (Promega, Madison, WI, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante.

Os ensaios de expressão gênica foram realizados por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real após transcrição reversa (qRT-PCR) no sistema *QuantStudio*[™] 5 *Real-Time PCR* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA), utilizando-se o kit *GoTaq*[®] *qPCR Master Mix* (Promega). As reações de amplificação foram realizadas em duplicata e consistiram em $2\times$ *GoTaq master mix*, 0,3 μM de *primers forward* e *reverse*, 40 ng de cDNA molde e água livre de nucleases q.s.p. 20 μL . O programa de amplificação incluiu uma desnaturação inicial a 95°C por 2 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 s e 60°C por 30 s, além da análise da curva de dissociação (*melting curve*) ($0,01^\circ\text{C/s}$).

2.2.4 Análises Estatísticas

As análises das variáveis de composição do leite, incluindo os teores de gordura e proteína, em função do DEL e dos níveis de suplementação com lecitina de soja, foram realizadas utilizando a soma de quadrados para efeitos linear, quadrático e cúbico (Campos *et al.*, 2022), com posterior ajuste das equações de regressão linear. Os coeficientes de determinação (R^2) foram expressos como a razão entre a soma de quadrados dos efeitos e a soma de quadrados dos

tratamentos. Adotou-se um nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o *software* R (R Core Team, 2023), no ambiente RStudio (RStudio Team, 2023). A análise de variância (ANOVA) foi aplicada para avaliar os efeitos principais e as interações entre DEL e tratamento para os teores de gordura e proteína, adotando-se um nível de significância de $p < 0,05$. As análises foram conduzidas por meio de modelos lineares mistos (lme4), considerando os efeitos de tratamento e DEL como fixos, e os efeitos de animal e período como aleatórios, de acordo com o delineamento em quadrado latino. As médias ajustadas foram comparadas pelo método de Tukey (emmeans). As pressuposições do modelo foram avaliadas por meio da inspeção dos resíduos. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (*standard error of the mean* - SEM).

Para os ensaios de expressão gênica, foi obtido o valor médio do *cycle threshold* (C_t) de cada amostra, e a quantificação relativa foi calculada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak; Schmittgen, 2001). O valor médio das amostras do tratamento sem suplementação com lecitina (0%) foi definido como calibrador (valor = 1), e os níveis relativos de expressão dos demais tratamentos foram comparados. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro–Wilk ($p < 0,05$), e as diferenças entre os grupos foram analisadas por ANOVA de uma via, seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o *software* GraphPad Prism® 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os resultados foram expressos como média $\pm$ SEM.

2.3 RESULTADOS

A suplementação com lecitina de soja não promoveu alterações na produção de leite, assim como nos teores de gordura e proteína ($p > 0,05$) (Tabela 3). Entretanto, foi observado efeito quadrático para o teor de proteína em função dos níveis de inclusão de lecitina na dieta, com valor máximo estimado em 1,26% de inclusão na matéria seca. Esse valor representa um ponto teórico obtido por regressão, não correspondendo a um nível diretamente avaliado experimentalmente, mas indicando uma possível faixa de resposta à suplementação. O teor médio de gordura no leite foi de 3,15%, valor ligeiramente inferior ao intervalo normalmente observado para vacas da raça Holandesa (3,3 a 3,7%) (NRC, 2001), sendo

observada uma inversão na relação gordura/proteína nos três níveis de suplementação.

Tabela 3 – Médias descritivas, níveis de probabilidade e equações de regressão para os efeitos linear (L), quadrático (Q) e cúbico (C) da produção diária de leite (PL), teores de gordura e proteína, e erro padrão da média (SEM), de acordo com os níveis de suplementação com lecitina de soja em vacas leiteiras.

Item	Nível de Suplementação				Valor de P			
	0%	0.75%	1.5%	2.2%	L	Q	C	SEM
PL (kg/vaca/dia)	30.28	29.21	29.13	28.97	NS	NS	NS	1.79
Gordura (%)	3.32	3.14	3.05	3.09	NS	NS	NS	0.30
Proteína (%)	3.11	3.21	3.2	3.14	NS	0.05 ¹	NS	0.10

¹ $P_{m\acute{a}x} = 2,697 + 0,13906x - 0,05565x^2 = 1,26$ ($R^2 = 94,18\%$);

NS = não significativo – teste de Tukey ($p > 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

Considerando o efeito do DEL sobre os teores de gordura ($p = 0,556$) e proteína ($p = 0,014$), evidencia-se uma influência fisiológica significativa do DEL sobre os níveis de proteína (Tabela 4). O teor de gordura apresentou ampla variação entre os períodos, com tendência de redução ao longo da lactação, apresentando variação significativa no intervalo de 121 a 200 DEL ($p < 0,05$) (Figura 3A). Para o teor de proteína, o modelo linear misto indicou efeito significativo do DEL ($p = 0,022$), demonstrando variação associada ao estágio da lactação. No entanto, quando o DEL foi categorizado em classes (0–60, 61–120, 121–200 e >200 dias), as comparações múltiplas entre os grupos não revelaram diferenças significativas ($p = 0,117$) (Figura 3B).

Tabela 4 – Efeitos dos dias em lactação (DEL) e dos tratamentos sobre os teores de gordura e proteína do leite.

Variável	Efeito	GL	SQ	QM	Valor de F	Valor de P
Gordura	DEL	1	0.501	0.501	0.35	0.557
	Tratamento	3	2.536	0.845	0.60	0.622
	DEL × Tratamento	3	1.723	0.574	0.41	0.749
	Resíduo	24	33.868	1.411	-	-
Proteína	DEL	1	1.132	1.132	7.00	0.014*
	Tratamento	3	0.233	0.078	0.48	0.699
	DEL × Tratamento	3	1.056	0.352	2.18	0.117
	Resíduo	24	3.881	0.162	-	-

GL = graus de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio.

DEL = dias em lactação; * $p < 0,05$.

Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

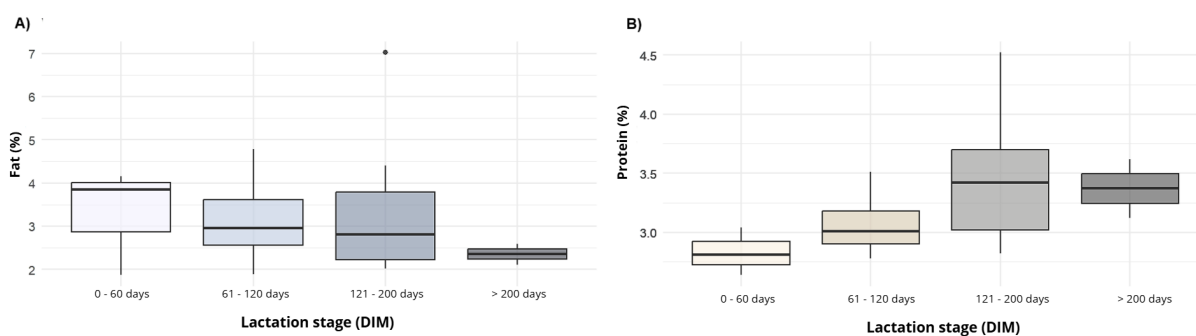


Figura 3 – Distribuição dos teores de gordura (A) e proteína (B) do leite ao longo dos diferentes estágios da lactação (0–60, 61–120, 121–200 e >200 dias). (* $p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

A análise dos níveis de mRNA em células somáticas do leite revelou aumento significativo da expressão dos genes *GPAM* ($p < 0,0001$) e *FASN* ($p < 0,05$) após a suplementação com 2,2% de lecitina de soja, em comparação aos demais tratamentos (Figuras 4A e 4B). Observou-se baixa variabilidade entre as

observações para *GPAM*, com padrão consistente entre os animais avaliados. Por outro lado, a expressão dos genes *ACACA- α* e *LPL* não apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos com suplementação de lecitina, embora tenha sido observada uma tendência de maior expressão desses genes quando houve suplementação com 0,75% de lecitina de soja (Figuras 4C e 4D).

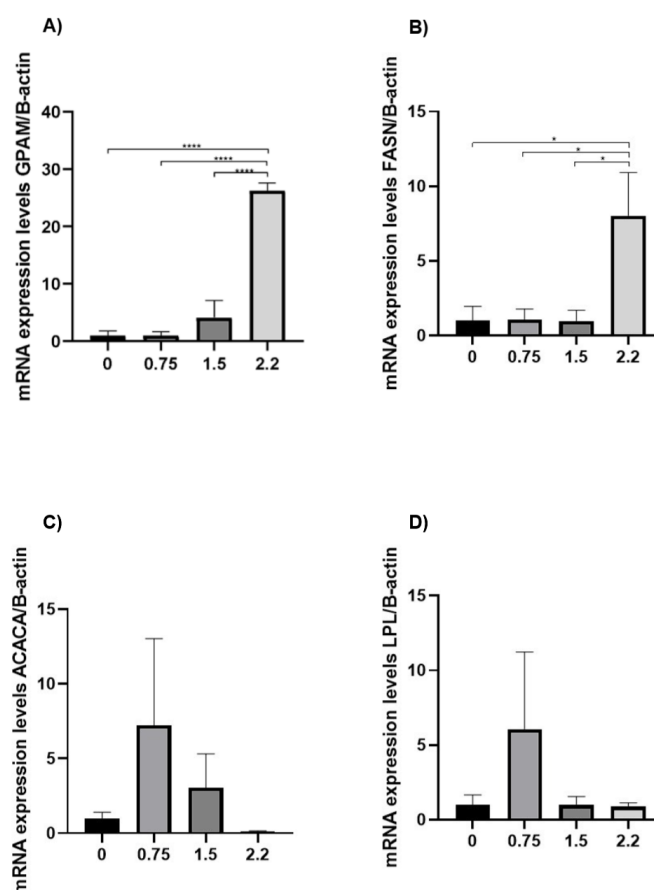


Figura 4 – Expressão relativa dos genes envolvidos na lipogênese de ácidos graxos *GPAM*, *FASN*, *ACACA- α* e *LPL*, após suplementação com lecitina de soja a 0%, 0,75%, 1,5% e 2,2%. **A)** *GPAM*; **B)** *FASN*; **C)** *ACACA- α* ; **D)** *LPL*. (**** $p < 0,0001$; * $p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

2.4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a suplementação com lecitina de soja na dieta de vacas leiteiras promoveu efeitos distintos sobre os parâmetros produtivos e a expressão de genes lipogênicos. De modo geral, as respostas observadas variaram em função dos níveis de inclusão do aditivo na dieta.

Os níveis de inclusão de lecitina (0%, 0,75%, 1,5% e 2,2% da MS) foram definidos com base em estudos anteriores, que indicaram que a suplementação entre 0,5% e 2,5% é segura para vacas leiteiras, não compromete a fermentação ruminal e permite a avaliação dos efeitos dose–resposta da fosfatidilcolina e de outros fosfolipídios presentes na lecitina sobre a síntese de gordura do leite (Jenkins, 1990; Li *et al.*, 2017). Nossos dados indicaram que a suplementação com lecitina de soja, em diferentes níveis, não afetou o teor de gordura do leite das vacas avaliadas, sendo observada a inversão da relação gordura/proteína. Durante o período experimental, foram registradas temperaturas ambientais superiores a 30 °C, atingindo até 36 °C (SIMEPAR, 2024), caracterizando uma condição climática típica da região no período avaliado e não um fator experimental controlado. Nessas condições, é provável que os animais tenham sido submetidos a estresse térmico, o que pode ter reduzido o consumo alimentar e influenciado o metabolismo energético, contribuindo para a inversão da relação gordura/proteína. Cabezas-Garcia *et al.* (2021) sugeriram que a redução do teor de gordura do leite e a inversão dessa relação podem estar associadas a diversos fatores, como baixo escore de condição corporal (ECC), altos níveis de carboidratos não fibrosos (CNF), inclusão de suplementos lipídicos e condições climáticas. Além disso, a ausência de resposta fenotípica na composição da gordura do leite, mesmo diante de alterações na expressão de genes lipogênicos observadas neste estudo, pode estar relacionada à complexidade da regulação metabólica da glândula mamária, envolvendo mecanismos pós-transcricionais, possíveis defasagens temporais entre expressão gênica e resposta produtiva, bem como à priorização do uso de energia para manutenção em condições de estresse térmico.

Estudos indicam que a variabilidade individual e os dias em lactação (DEL) podem exercer maior influência sobre o teor de gordura do leite do que o próprio tratamento dietético, sugerindo que a síntese lipídica do leite está intimamente relacionada ao balanço energético e ao perfil fisiológico das vacas (Bauman; Griinari,

2003; Palmquist; Jenkins, 2017). Nossos dados indicaram que o estágio de lactação exerceu influência significativa sobre o teor de proteína do leite quando considerado como variável contínua no modelo estatístico, refletindo a natureza gradual das variações fisiológicas ao longo da lactação. No entanto, essa influência não se traduziu em diferenças estatisticamente significativas entre as classes categorizadas de DEL, o que pode estar relacionado, em parte, à distribuição não uniforme do número de observações entre os intervalos avaliados. Além disso, embora o delineamento em quadrado latino permita o controle dos efeitos de animal e período, ele não elimina completamente o avanço fisiológico da lactação, o que pode influenciar variáveis diretamente associadas à lipogênese mamária. Dessa forma, as alterações na composição proteica parecem ocorrer de maneira progressiva, sem contrastes abruptos entre fases específicas da lactação, estando mais relacionadas ao metabolismo endógeno e à progressão dos DEL do que à ingestão de lipídios na dieta (Ingvarsen; Moyes, 2013; Bernabucci *et al.*, 2015). Nesse contexto, a inclusão de DEL como covariável em modelos futuros pode contribuir para uma melhor discriminação entre efeitos nutricionais e fisiológicos. Estudos indicam que o estágio de lactação é um fator crítico na regulação da composição do leite, afetando as concentrações de lipídios e proteínas (Bauman; Griinari, 2003; Ingvarsen; Moyes, 2013; Bernabucci *et al.*, 2015).

A quantificação do mRNA de múltiplos genes e de suas interações dentro de uma ou mais vias metabólicas é essencial para a compreensão do funcionamento dos processos metabólicos. As células somáticas do leite são viáveis e transcritionalmente ativas, sendo capazes de se adaptar às condições e exigências do estágio de lactação (Wickramasinghe *et al.*, 2012). À medida que os componentes das redes regulatórias transcricionais e pós-transcricionais são identificados, intervenções direcionadas que combinem a modulação de fatores de transcrição com o manejo nutricional e alimentar podem ser mais eficazes na melhoria da qualidade do leite (Mu *et al.*, 2021).

Os genes *GPAM*, *FASN*, *ACACA- α* e *LPL* são genes-chave envolvidos na síntese de gordura do leite em ruminantes (Mu *et al.*, 2021). A expressão de *GPAM* e *FASN* aumentou significativamente em resposta à dieta suplementada com 2,2% de lecitina de soja, em comparação aos demais tratamentos. Em contraste, *ACACA- α* e *LPL* não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos. A gordura do leite existe na forma de glóbulos lipídicos e é composta

quase exclusivamente por TAGs (Bionaz; Loor, 2008), sendo a GPAM considerada a enzima limitante da primeira etapa dessa reação catalítica (Ren *et al.*, 2018). Os níveis de mRNA da GPAM aumentam aproximadamente aos 60 dias pós-parto, e sua elevada expressão durante a lactação tem sido identificada como um fator-chave para a síntese de TAGs (Palmquist, 2006).

ACACA- α e FASN são enzimas fundamentais na síntese de ácidos graxos *de novo* e apresentam aumento de expressão durante a lactação (Lee *et al.*, 2017). A ACACA- α converte acetil-CoA em malonil-CoA, o substrato para a FASN. Surpreendentemente, nossos dados mostraram que ACACA- α não acompanhou a superexpressão de FASN após a suplementação lipídica, indicando que outros fatores devem ser investigados e podem estar envolvidos na regulação lipídica da síntese de ácidos graxos *de novo*. O gene LPL também não apresentou diferenças significativas de expressão após os tratamentos. A atividade da LPL é crucial para a hidrólise de TAGs no sangue e é regulada pela dieta e por hormônios. Em vacas leiteiras, antes do parto, a atividade da LPL aumenta significativamente e pode ser mantida em níveis elevados durante a lactação (Bonnet *et al.*, 2000). De acordo com Zhao *et al.* (2014), a expressão do gene LPL no início da lactação é significativamente maior do que no período tardio, e experimentos de *knockout* do gene LPL demonstraram redução na expressão dos genes FASN e ACACA- α em células epiteliais mamárias.

Na glândula mamária, aproximadamente 70% dos genes relacionados ao metabolismo lipídico apresentaram correlação negativa com a expressão da FASN (incluindo ACACA- α e GPAM), enquanto apenas 6,5% mostraram correlação positiva (Tadmor-Levi; Argov-Argaman, 2025), embora a maioria dos genes lipogênicos esteja sob os mesmos sinais regulatórios (Shimano, 2001). Rudolph *et al.* (2010) demonstraram que genes lipogênicos na glândula mamária de camundongos durante a lactação também não são coexpressos, o que pode explicar parcialmente o perfil diferencial de expressão dos genes GPAM, FASN, ACACA- α e LPL observado neste estudo. Um perfil distinto de expressão de genes envolvidos na síntese de TAGs é evidente, podendo influenciar sua utilização e partição no leite (Tadmor-Levi; Argov-Argaman, 2025).

Nossos dados indicam que a suplementação com lecitina foi eficaz em aumentar a expressão de GPAM e FASN, embora as análises do teor de gordura do leite não tenham refletido esse resultado. O metabolismo da gordura do leite pode

ser dividido em cinco processos distintos: captação de ácidos graxos, síntese de ácidos graxos *de novo*, dessaturação de ácidos graxos, esterificação de ácidos graxos e secreção da gordura do leite (Wickramasinghe *et al.*, 2012). Wickramasinghe *et al.* (2012) analisaram genes expressos em células somáticas do leite de vacas Holandesas durante os estágios de transição da lactação: dia 15 – do início da lactação até o pico de produção; pico/dia 90 – maior produção de leite; e tardio/dia 250 – leite produzido por uma glândula mamária em involução ou em estágio inicial desse processo.

A maioria dos genes envolvidos no metabolismo lipídico apresentou elevada expressão nas células somáticas do leite durante os estágios de transição e pico da lactação (Wickramasinghe *et al.*, 2012).

De acordo com Mu *et al.* (2021), a síntese de gordura do leite é um mecanismo regulatório altamente complexo, que não envolve apenas a expressão de um número relativamente pequeno de genes que codificam proteínas essenciais, mas também resulta de interações complexas entre múltiplos órgãos do animal. Portanto, a adoção de uma abordagem integrada de biologia dos sistemas é fundamental para compreender os mecanismos subjacentes à síntese de gordura do leite (Mu *et al.*, 2021). A quantificação do mRNA de múltiplos genes, bem como de suas interações dentro de redes metabólicas, é essencial para a formulação de conclusões robustas sobre seus produtos finais, como a composição físico-química do leite. Além disso, a presença de diversos mecanismos regulatórios pós-transcricionais e pós-traducionais deve ser considerada, pois eles podem influenciar significativamente a síntese e a abundância do produto final.

2.5 CONCLUSÃO

A suplementação dietética com lecitina de soja, nos níveis avaliados, não promoveu alterações significativas na composição da gordura do leite de vacas da raça Holandesa, embora tenha sido observada a reversão da relação gordura/proteína ao longo do período experimental. Por outro lado, a inclusão de lecitina, especialmente no nível de 2,2% da matéria seca da dieta, promoveu aumento da expressão dos genes *FASN* e *GPAM* em células somáticas do leite, indicando modulação de vias lipogênicas em nível transcricional. A expressão dos genes *ACACA-α* e *LPL* não foi influenciada pela suplementação, evidenciando

respostas diferenciadas entre genes envolvidos no metabolismo lipídico. De modo geral, os resultados demonstram que a lecitina de soja pode atuar na regulação molecular da lipogênese mamária, sem necessariamente promover alterações imediatas na composição da gordura do leite nas condições avaliadas.

REFERÊNCIAS

- AOAC INTERNATIONAL. *Official methods of analysis*. 20th ed. Gaithersburg: AOAC International, 2016.
- BADINGA, L.; GREENE, E. S. Physiological properties of conjugated linoleic acid and implications for human health. *Nutrition in Clinical Practice*, v. 21, n. 4, p. 367–373, 2006.
- BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J. M. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annual Review of Nutrition*, v. 23, p. 203-227, 2003.
- BAUMAN, D. E.; MATHER, I. H.; WALL, R. J.; LOCK, A. L. Major advances associated with the biosynthesis of milk. *Journal of Dairy Science*, v. 89, n. 4, p. 1235-1243, 2006.
- BERNABUCCI, U.; BASIRICÒ, L.; MORERA, P. Impact of hot environment on milk protein fractions in lactating cows and goats. *Animal Frontiers*, v. 5, n. 1, p. 36-42, 2015.
- BIONAZ, M.; LOOR, J. J. Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. *BMC Genomics*, v. 9, art. 366, 2008.
- BONNET, M.; LEROUX, C.; CHILLIARD, Y.; MARTIN, P. Rapid communication: nucleotide sequence of the ovine lipoprotein lipase cDNA. *Journal of Animal Science*, v. 78, n. 11, p. 2994, 2000.
- BUSTIN, S. A.; BENKOVA, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANN, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; NUNES, R. M.; NORTON, T.; WITTEWER, C. T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.
- CABEZAS-GARCIA, E. H.; LØNNE, S. B.; ØDEGÅRD, J.; KLEMETSAAL, G.; HALSE, T.; JOHANSEN, T. H.; HANSEN, T. P.; NORDVIK, H.; KJELDSEM, L. I. Revisiting the relationships between fat-to-protein ratio in milk and energy balance in dairy cows of different parities and at different stages of lactation. *Animals*, v. 11, n. 11, art. 3256, 2021.
- CAMPOS, R.; VALADARES FILHO, S. C.; VALADARES, R. V.; COSTA, S. M.; SILVA, J. F. C.; SILVA, F. V.; RIBEIRO, L. S. O.; COSTA, M. G. Statistical analysis alternatives to validate hematic parameters in dairy cattle under tropical conditions. *Revista de Ciências Agrárias*, v. 39, e193, 2022.
- CÁNOVAS, A.; CAMERON, B.; LÓPEZ, A. Somatic cells as a tool for mammary gland gene expression studies. *Journal of Dairy Science*, v. 97, n. 5, p. 3148-3157, 2014.
- CHEN, G. J.; SULLIVAN, M. L.; WU, S.; LI, W.; XU, M. Effects of soybean lecithin supplementation on growth performance, serum metabolites, ruminal fermentation and microbial flora of beef steers. *Livestock Science*, v. 240, art. 104121, 2020.
- CHRISTIE, W. W. The effects of diet and other factors on the lipid composition of ruminant tissues and milk. In: CHRISTIE, W. W. (ed.). *Lipid metabolism in ruminant animals*. Oxford: Pergamon Press, 1981. p. 193-226.

- FONSECA, I.; SILVA, P. V.; RIBEIRO, F.; SANTOS, M. V.; FERREIRA, M. L.; SANTOS, J. E. P.; FONSECA, L. F.; FERREIRA, F. M. Expression profile of genes associated with mastitis in dairy cattle. *Genetics and Molecular Biology*, v. 32, n. 4, p. 776-781, 2009.
- GÓMEZ-CORTÉS, P.; DE LA FUENTE, M. A.; HERNÁNDEZ, M. P. Milk fatty acids as biomarkers of nutritional physiology in dairy cattle. *Animals*, v. 11, n. 11, art. 3187, 2021.
- INGVARTSEN, K. L.; MOYES, K. M. Nutrition, immune function and health of dairy cattle. *Animal*, v. 7, supl. 1, p. 112-122, 2013.
- JENKINS, T. C. Nutrient digestion, ruminal fermentation and plasma lipids in steers fed combinations of hydrogenated fat and lecithin. *Journal of Dairy Science*, v. 73, n. 10, p. 2934-2939, 1990.
- JENSEN, R. G. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *Journal of Dairy Science*, v. 85, n. 2, p. 295-350, 2002.
- JOHNSTON, C.; DE VRIES, T. J. Associations of feeding behavior and milk production in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 101, n. 4, p. 3367-3373, 2018.
- KLEIN, M.; LINDMARK-MÅNSSON, H.; PETTERSSON, H. E. Milk phospholipids: isolation, characterization, and their role in dairy products. *International Dairy Journal*, v. 85, p. 1-10, 2018.
- KOBA, K.; YANAGITA, T. Health benefits of conjugated linoleic acid (CLA). *Obesity Research & Clinical Practice*, v. 8, n. 6, p. e525–e532, 2014.
- LEE, J. N.; AHN, S. J.; KO, J. Y.; KIM, J. W.; PAIK, O. D.; KIM, I. H.; JANG, A.; LEE, S. K. Characterization of gene expression related to milk fat synthesis in the mammary tissue of lactating yaks. *Journal of Dairy Research*, v. 84, n. 3, p. 283-288, 2017.
- LI, X. Z.; YAN, C. G.; CHUN, S. S.; JIN, G. L.; LONG, R. J. Effect of soy lecithin on total cholesterol content, fatty acid composition and carcass characteristics in Hanwoo steers. *Animal Science Journal*, v. 88, n. 5, p. 847-853, 2017.
- LINDMARK-MÅNSSON, H.; FONDÉN, R.; PETTERSSON, H. E. Composition of Swedish dairy milk. *International Dairy Journal*, v. 13, n. 6, p. 409-425, 2003.
- LIU, J.; WANG, J.; ZHU, W.; PU, Y. Y.; GUAN, L. L.; JIANG, C.; WANG, H.; SHEN, W. Effects of dietary lecithin on lipid metabolism and milk fatty acid composition in dairy cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 102, n. 2, p. 401-410, 2018.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- LOBO, A. M. B. O.; LOBO, R. N. B. Statistical considerations in the analysis of gene expression data generated by RT-qPCR. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2014.
- LUCENA, G. S.; SOARES, L. F. F.; SOARES, M. M. C. N.; SILVA JÚNIOR, J. O. C. Caracterização físico-química e microbiológica do leite cru refrigerado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, n. 1, p. 95-100, 2003.
- MEDRANO, J. F.; KAPETANOVIC, B.; THOMPSON, A.; LOOR, J. J. Analysis of the bovine milk transcriptome using RNA sequencing. *Journal of Dairy Science*, v. 93, n. 10, p. 4494-4504, 2010.
- MU, T.; ZHANG, Y.; LIU, J.; ZHAO, X.; WANG, J. Regulatory networks controlling milk fat synthesis in ruminants: a systems biology perspective. *Journal of Dairy Science*, v. 104, n. 2, p. 1356-1371, 2021.

- NOGAROTO, V.; SOUZA, C. F. C.; COUTO, J. G.; SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. Gene expression of lipogenic and antioxidant pathways in milk somatic cells of Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. In press.
- NRC – NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Nutrient requirements of dairy cattle*. 7th rev. ed. Washington, DC: National Academies Press, 2001.
- PALMQUIST, D. L. Milk fat: origin of fatty acids and influence of nutrition factors thereon. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. (eds.). *Advanced dairy chemistry: volume 2: lipids*. 3rd ed. New York: Springer, 2006. p. 43-92.
- PALMQUIST, D. L.; MATTOS, W. Fat in lactation rations: review. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURERS; 2011; Syracuse. *Proceedings...* Syracuse: Cornell University, 2011. p. 116-125.
- PALMQUIST, D. L.; JENKINS, T. C. A 100-year review: Fat feeding of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 100, n. 12, p. 10061-10077, 2017.
- REN, J.; TAREKEGN, J.; ZHANG, Y.; LIU, J.; WANG, J.; ZHAO, X. Role of glycerol-3-phosphate acyltransferase in triglyceride synthesis and milk fat production in mammary epithelial cells. *Journal of Dairy Science*, v. 101, n. 2, p. 1416-1426, 2018.
- R CORE TEAM. *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2023.
- RUDOLPH, M. C.; RUSSELL, T. D.; ROHRER, D. C.; QUARLES, D. L.; DOERING, T. F.; SHAPIRO, J. L.; SEGAL, N. A.; NEVILLE, M. C. Lipogenic gene expression in the mammary gland is not coordinately regulated during lactation in mice. *Journal of Dairy Science*, v. 93, n. 4, p. 1409-1418, 2010.
- SCOLLAN, N. D.; DANDENEAU, M.; CASSIDY, M. C.; DUNNE, P. G.; KEATING, S.; KENNY, D. A.; KIELY, J.; LORENZO, J. M.; MCCORMACK, M.; MEE, J. F.; MOONEY, M.; MULLEN, A.; PATTON, J.; RICHARDSON, I.; RYAN, S. M.; SULLIVAN, M.; WALDRON, S.; WHAN, J.; WOODS, V. B.; YEO, J. Enhancing the nutritional and health value of beef lipids and their relationship with meat quality. *Meat Science*, v. 97, n. 3, p. 384-394, 2014.
- SHIMANO, H. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Progress in Lipid Research*, v. 40, n. 6, p. 439-452, 2001.
- SHINGFIELD, K. J.; AHVENJÄRVI, S.; TOIVONEN, V.; AROLA, A.; NÄSI, M.; HUHTANEN, P.; KUMAR, S.; GRUMMER, R. R. Role of trans fatty acids in the nutritional regulation of milk fat synthesis. *Journal of Dairy Science*, v. 96, n. 8, p. 4817-4831, 2013.
- SIMEPAR – SISTEMA DE TECNOLOGIA E MONITORAMENTO AMBIENTAL DO PARANÁ. *Climatological data report for Paraná State*. Curitiba, 2024.
- TADMOR-LEVI, R.; ARGOV-ARGAMAN, N. Coordinated and non-coordinated regulation of milk fat synthesis in the bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science*, v. 108, n. 1, p. 1-15, 2025.
- URRUTIA, N. L.; HARMON, D. L.; RICO, D. E.; BARBANO, D. M.; NIELSEN, N. I. De novo fatty acid synthesis and uptake of preformed fatty acids in the bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science*, v. 102, n. 3, p. 2178-2192, 2019.
- WATKINS, B. A. Role of phospholipids in nutrition and health. *Advances in Nutrition*, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2019.
- WICKRAMASINGHE, S.; HUA, S.; RINCON, G.; ISLAM, H. R.; GONZALEZ, M. N.; GONZALEZ, F. J.; MEDRANO, J. F.; LEI, X. J.; MCMAHON, D. J.; TEIXEIRA, J. C. Transcriptome profiling of bovine milk somatic cells during lactation. *Journal of Dairy Science*, v. 95, n. 8, p. 4413-4425, 2012.

ZHAO, X.; WANG, J.; LIU, J.; PANG, X.; ZHANG, Y.; WU, S. Lipoprotein lipase gene expression and its relationship with milk fat synthesis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 97, n. 3, p. 1705-1715, 2014.

ANEXO A – PROTOCOLO: EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DE CÉLULAS SOMÁTICAS DO LEITE

A.1 Materiais e reagentes

- Amostras de leite contendo células somáticas
- Solução PBS / EDTA
- Reagente TRIzol® (Invitrogen, EUA)
- Clorofórmio
- Isopropanol
- Etanol 75% (preparado com água livre de RNase)
- Água livre de RNase
- Tubos RNase-free (1,5 mL e 2,0 mL)
- Micropipetas e ponteiros estéreis RNase-free
- Centrífuga refrigerada
- Cabine de segurança biológica

A.2 Procedimento

1. Centrifugar 500 mL de leite a $2700 \times g$, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 15 min, para sedimentação das células somáticas.
2. Remover cuidadosamente a camada de gordura do sobrenadante.
3. Lavar o pellet celular três vezes com 5 mL de PBS/EDTA, centrifugando a $2700 \times g$, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 10 min em cada lavagem.
4. Ressuspender o pellet final em 250 μL de PBS e centrifugar a $6000 \times g$, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 15 min.
5. Descartar o sobrenadante e adicionar 1 mL de TRIzol® ao pellet celular. Homogeneizar vigorosamente por pipetagem.
6. Incubar a amostra por 5 min em temperatura ambiente para completa dissociação dos complexos nucleoproteicos.
7. Adicionar 200 μL de clorofórmio (0,2 mL por 1 mL de TRIzol®), agitar vigorosamente por 15 s e incubar por 5 min em temperatura ambiente.
8. Centrifugar a $12.000 \times g$, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 15 min, para separação das fases.

9. Transferir cuidadosamente a fase aquosa (superior) para um novo tubo RNase-free.
10. Adicionar 500 μ L de isopropanol, homogeneizar por inversão e incubar por 10 min em temperatura ambiente para precipitação do RNA.
11. Centrifugar a $12.000 \times g$, a 4°C , por 10 min.
12. Descartar o sobrenadante e lavar o pellet de RNA com 1 mL de etanol 75%, seguido de centrifugação a $7500 \times g$, a 4°C , por 5 min.
13. Remover o etanol e deixar o pellet secar ao ar por 5–10 min, evitando ressecamento excessivo.
14. Ressuspender o RNA em 20 μ L de água livre de RNase.
15. Quantificar e avaliar a pureza do RNA em espectrofotômetro (A_{260}/A_{280}) e armazenar as amostras a -80°C até a síntese de cDNA.

ANEXO B – PROTOCOLO: SÍNTESE DE cDNA

A síntese de cDNA foi realizada a partir de RNA total extraído de células somáticas do leite utilizando o kit *GoScript™ Reverse Transcription System* (Promega, Madison, WI, EUA), conforme protocolo do fabricante, com pequenas adaptações.

B.1 Desnaturação do RNA e anelamento dos primers

Em microtubos livres de RNase, foram adicionados, para cada reação:

- RNA total: 5 µL ($\approx$ 2 µg)
- Oligo(dT): 1 µL
- Random primers: 1 µL
- Água livre de nucleases: 3 µL
- Volume final: 10 µL

A mistura foi homogeneizada, incubada a 70 °C por 5 min para desnaturação das fitas de RNA, seguida de resfriamento imediato em gelo por 5 min e rápida centrifugação (spin down).

B.2 Preparo do mix de transcrição reversa (RT mix)

Para cada reação, foi preparado o seguinte mix:

- Água livre de nucleases: 3,5 µL
- *GoScript™ 5× Reaction Buffer*: 4,0 µL
- MgCl₂: 2,0 µL
- dNTP mix: 1,0 µL
- *Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor*: 0,5 µL
- *GoScript™ Reverse Transcriptase*: 1,0 µL

Volume do RT mix: 12 µL

Foram adicionados 10 μ L do RT mix a cada tubo contendo os 10 μ L da mistura RNA + primers, totalizando um volume final de 20 μ L por reação.

B.3 Condições de incubação para síntese de cDNA

As reações foram incubadas em termociclador nas seguintes condições:

- 25 °C por 5 min (anelamento dos primers)
- 42 °C por 60 min (síntese do cDNA)
- 70 °C por 15 min (inativação da transcriptase reversa)

Ao final, os tubos foram resfriados a 4 °C, e o cDNA obtido foi armazenado a -20 °C até a utilização nos ensaios de qRT-PCR.

ANEXO C – PROTOCOLO: DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DOS PRIMERS E ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR qRT-PCR

C.1 Materiais e reagentes

- cDNA obtido a partir de RNA total de células somáticas do leite
- *GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega)
- *Primers* específicos para os genes *FASN*, *ACACA-α*, *LPL*, *GPAM* e para o gene de referência *β-actina* (*ACTB*)
- Água livre de nucleases
- Placas ópticas e selos adesivos
- Sistema *QuantStudio™ 5 Real-Time PCR* (*Applied Biosystems*)

C.2 Curva padrão e eficiência dos primers

A eficiência de amplificação de cada par de primers foi determinada a partir de curvas padrão obtidas por diluições seriadas do cDNA, nas proporções 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10.000 e 1:100.000.

Cada ponto da curva foi amplificado em duplicata, e os valores de C_t foram plotados em função do logaritmo da concentração relativa de cDNA. A eficiência (E) foi calculada de acordo com a equação:

$$E (\%) = (10^{-1/slope} - 1) \times 100$$

Somente primers com eficiência entre 90% e 110% e coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99 foram considerados adequados para as análises de expressão gênica, conforme recomendado por Bustin *et al.* (2009).

C.3 Condições das reações de qRT-PCR

As reações de qRT-PCR foram realizadas em duplicata em volume final de 10 μ L, contendo:

- 5,0 µL de *GoTaq® qPCR Master Mix* (2×)
- 0,3 µL de *primer forward* (0,3 µM final)
- 0,3 µL de *primer reverse* (0,3 µM final)
- 2,0 µL de cDNA (40 ng)
- 2,4 µL de água livre de nucleases

As amplificações foram conduzidas no sistema *QuantStudio™ 5* com o seguinte programa térmico: desnaturação inicial a 95 °C por 2 min, seguida de 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 30 s. Ao final, foi realizada a análise da curva de dissociação (*melting curve*) de 60 a 95 °C, com rampa de 0,01 °C/s, para verificação da especificidade dos amplicons.

Reações controle (sem molde) foram incluídas para todos os pares de primers.

ANEXO D – CONTROLE LEITEIRO

Tabela D1 – Controle leiteiro 1 das vacas Holandesas utilizadas no experimento.

Data de realização: 20/09/2023.

Animal (Apelido)	DEL (dias)	Produção de leite (kg/dia)	Gordura (%)	Proteína (%)	Lactose (%)
Adriana	44	40,0	3,85	2,64	4,63
Andrea	132	24,1	2,43	3,42	4,66
Daisy	120	32,1	2,79	2,96	4,86
Edite	95	33,8	2,78	2,78	4,43
Fabi	51	38,6	4,16	2,81	4,87
Helena	64	25,4	2,48	3,19	4,74
Julia	151	23,3	2,04	3,02	4,29
Nicky	107	28,4	4,00	3,51	4,81

Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

Tabela D2 – Controle leiteiro 2 das vacas Holandesas utilizadas no experimento.

Data de realização: 17/10/2023.

Animal (Apelido)	DEL (dias)	Produção de leite (kg/dia)	Gordura (%)	Proteína (%)	Lactose (%)
Adriana	71	40,1	3,63	2,86	4,61
Andrea	159	24,8	2,02	3,62	4,74
Daisy	147	30,4	7,02	2,82	4,77
Edite	122	30,3	2,81	2,96	4,49
Fabi	78	34,5	4,79	2,88	4,87
Helena	91	27,2	1,89	3,15	4,66
Julia	178	24,0	2,57	3,47	4,73
Nicky	134	28,0	3,83	3,50	4,65

Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

Tabela D3 – Controle leiteiro 3 das vacas Holandesas utilizadas no experimento.
Data de realização: 08/11/2023.

Animal (Apelido)	DEL (dias)	Produção de leite (kg/dia)	Gordura (%)	Proteína (%)	Lactose (%)
Adriana	93	39,1	3,11	3,06	4,38
Andrea	181	22,8	2,22	3,80	4,51
Daisy	169	30,3	3,79	3,16	4,81
Edite	144	31,3	1,87	3,04	4,42
Fabi	100	32,8	3,57	2,96	4,74
Helena	113	25,2	1,99	3,21	4,55
Julia	200	25,2	2,33	3,23	4,56
Nicky	156	26,1	4,41	3,74	4,62

Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

Tabela D4 – Controle leiteiro 4 das vacas Holandesas utilizadas no experimento.
Data de realização: 07/12/2023.

Animal (Apelido)	DEL (dias)	Produção de leite (kg/dia)	Gordura (%)	Proteína (%)	Lactose (%)
Adriana	122	37,3	3,26	2,90	4,47
Andrea	210	21,4	2,11	3,62	4,49
Daisy	198	31,8	2,03	2,97	4,70
Edite	173	7,7	3,71	4,52	3,05
Fabi	129	29,0	3,19	2,85	4,03
Helena	142	25,6	2,10	3,22	4,55
Julia	229	22,6	2,59	3,12	4,55
Nicky	185	26,2	4,38	3,70	4,72

Fonte: Elaborado pelo autor (2026).